

Universidade federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia

FERNANDA ELIZABETHE DOS RAMOS ALVES

**CILOSTAZOL, UM INIBIDOR DA PDE3, MELHORA FUNÇÃO VASCULAR EM
ANIMAIS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS: PAPEL DA VIA DO ÓXIDO
NÍTRICO**

RECIFE
2016

FERNANDA ELIZABETHE DOS RAMOS ALVES

CILOSTAZOL, UM INIBIDOR DA PDE3, MELHORA FUNÇÃO VASCULAR EM ANIMAIS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS: PAPEL DA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Área de Concentração Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em bioquímica e fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier

RECIFE
2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4-1895

A474c Alves, Fernanda Elizabeth dos Ramos.
Cilostazol, um inibidor da PDE3, melhora função vascular em animais espontaneamente hipertensos: papel da via do óxido nítrico/ Fernanda Elizabeth dos Ramos Alves. – Recife: o autor, 2016.
82 f.: 30 cm.

Orientador: Fabiano Elias Xavier
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2016.
Inclui referências e anexos.

1.Hipertensão. 2.Endotélio vascular. 3. Óxido nítrico. I. Xavier, Fabiano Elias (Orientador). II. Título.

577.1 CDD (23. ed.)

UFPE (CCS 2017-282)

FERNANDA ELIZABETHE DOS RAMOS ALVES

CILOSTAZOL, UM INIBIDOR DA PDE3, MELHORA FUNÇÃO VASCULAR EM ANIMAIS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS: PAPEL DA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Área de Concentração Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em bioquímica e fisiologia.

Aprovada em: 29/09/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Professor Dr. Fabiano Elias Xavier – UFPE

Professora Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte – UFPE

Professor Dr. Leucio Duarte Vieira Filho – UFPE

Professora Dra. Cristina de Oliveira Silva – UFPE

Professora Dra. Dayane Aparecida Gomes – UFPE

A meus pais e a Tiago.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para minha formação pessoal e acadêmica ao longo desses anos.

Ao meu orientador, o professor Fabiano Elias, que sempre confiou em meu potencial, oferecendo-me diversas oportunidades para crescer cientificamente.

Aos amigos do laboratório pela ajuda em experimentos e pelo compartilhamento de ideias e saberes: Hicla, Geórgia Leal, Diego, Juliana Dantas, Francine, Jean, Leonardo, Jairo, Fabiano Ferreira, Odair, Marcelo, Rebeca, Luciana, Geórgia Félix e a todos os outros que participaram dos diversos trabalhos do nosso grupo. Agradeço em especial à amiga Juliana Rocha, pois seu apoio e empenho na confecção dos experimentos finais foram imprescindíveis.

À professora Glória pelas orientações e ensinamentos.

Aos professores Cristina, Alex, Dayane e Eduardo que dividiram seus conhecimentos comigo.

Aos professores da banca por aceitarem o convite e contribuírem de forma singular na melhoria do trabalho.

A José Antônio e a Cláudia pelo cuidado oferecido aos animais.

À CAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro direcionado à realização das pesquisas.

RESUMO

Os inibidores das fosfodiesterases têm sido apontados como ferramentas terapêuticas promissoras em algumas doenças cardiovasculares. O cilostazol é um inibidor da fosfodiesterase 3 (PDE3) que além de apresentar efeitos antiplaquetários, possui atividade antioxidante, antiproliferativa, anti-inflamatória e vasodilatadora. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento crônico com cilostazol sobre pressão arterial e a função vascular de animais espontaneamente hipertensos (SHR). Aos quatro meses, os animais foram divididos em dois grupos experimentais, um controle (SHR-CON) e um grupo tratado com cilostazol (100mg/kg/dia, durante 8 semanas) (SHR-Cilo). A pressão arterial foi medida nos animais acordados a partir de cateter inserido na artéria femoral. A função vascular foi avaliada em artérias mesentéricas de resistência, através do método descrito por Mulvany & Halpern (1977). A produção de óxido nítrico e de ânions superóxido foi medida através da fluorescência emitida pelo DAF-2 e pelo DHE, respectivamente. A expressão da PDE3 e da eNOS foi medida através de *Western blot*. A pressão arterial não foi alterada após o tratamento com cilostazol. Entretanto, no grupo tratado com cilostazol houve um aumento no relaxamento dependente do endotélio induzido por acetilcolina. A pré-incubação das artérias com apamina (1 μ M), TRAM-34 (1 μ M) ou L-NAME (100 μ M) inibiu o relaxamento em maior proporção nas artérias de animais tratados. O relaxamento ao isoproterenol foi maior no grupo SHR-Cilo, sendo essa diferença bloqueada na presença de L-NAME. O relaxamento ao nitroprussiato de sódio, NPS (1 nmol/L - 10 μ mol/L), foi maior nas artérias do grupo SHR-Cilo, sugerindo maior sensibilidade do músculo liso ao óxido nítrico. A resposta contrátil à noradrenalina (0.1 nmol/L to 10 μ mol/L) foi semelhante entre os grupos SHR-CON e SHR-Cilo, porém a potencialização desta resposta em presença de L-NAME foi maior no grupo SHR-Cilo. A resposta vasodilatadora à forskolina (1 nmol/L to 10 μ mol/L) foi semelhante entre os grupos. Embora, as expressões das isoformas das enzimas PDE3A e eNOS não tenham apresentado diferenças entre os grupos, a detecção de NO foi maior nas artérias do grupo SHR-Cilo. Por outro lado, a produção de ânions superóxido foi semelhante entre os grupos SHR-CON e SHR-Cilo. Esses dados em conjunto sugerem que o tratamento com cilostazol em SHR promove melhora na função vascular, apesar de não interferir na redução da pressão arterial. É possível sugerir que o tratamento com cilostazol melhora a sinalização endotélio-músculo liso através de uma maior produção de óxido nítrico e da maior sensibilidade do músculo liso vascular a este fator vasodilatador derivado do endotélio.

Palavras chave: hipertensão; endotélio vascular; óxido nítrico; nucleotídeo cíclico fosfodiesterase do tipo 3.

ABSTRACT

Phosphodiesterase (PDE) inhibitors have been suggested as promising therapeutic tools in some cardiovascular diseases. Cilostazol is a selective PDE3 inhibitor that besides presenting antiplatelet effects, has antioxidant, antiproliferative, anti-inflammatory and vasodilator activity. The present study aimed to evaluate the effect of chronic treatment with cilostazol on blood pressure (BP) and the vascular function of spontaneously hypertensive animals (SHR). Four-month-old SHR were divided into two experimental groups, control (SHR-CON) and cilostazol-treated rats (SHR-Cilo) (100 mg/kg/day, for 8 weeks). BP was measured in awake rats from a catheter inserted in the femoral artery. Vascular function was evaluated in mesenteric arteries of resistance (MRA), using the method described by Mulvany & Halpern (1977). The nitric oxide (NO) production and superoxide anions (O_2^-) generation were measured through DAF-2- and DHE-emitted fluorescence, respectively. PDE3 and eNOS expressions were measured by Western blot. BP was unaltered by cilostazol treatment. However, SHR-Cilo showed increased endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in MRA. Preincubation of arteries with apamin (1 μ M), TRAM-34 (1 μ M) or L-NAME (100 μ M) inhibited relaxation to a greater extent in MRA from SHR-Cilo. Relaxation to isoproterenol was greater in SHR-Cilo, but this difference was blocked in the presence of L-NAME. Relaxation to sodium nitroprusside was also greater in MRA of SHR-Cilo. Contractile responses to noradrenaline were similar between SHR-CON and SHR-Cilo, but the potentiation of this response by L-NAME was greater in SHR-Cilo MRA. The vasodilatory response to forskolin was similar in both groups. Although the expression of PDE3A and eNOS showed no differences between groups, the NO detection production was greater in SHR-Cilo arteries. On the other hand, the O_2^- generation was similar between SHR-CON and SHR-Cilo. Taken together these data suggest that cilostazol treatment reverses endothelial function in SHR by a NO/cGMP-dependent mechanism and fortifies the existence of a crosstalk between AMPc and GMPc. In conclusion, this actions of cilostazol may, in part, contribute to the beneficial effect for the prevention/treatment of vascular disorders that occur in hypertension.

Key words: hypertension; vascular endothelium; nitric oxide; cyclic nucleotide phosphodiesterase type 3

LISTA DE ABREVIATURAS

•NO	- Óxido nítrico
•O ₂	- Ânion superóxido
•OH	- Radical hidroxil
15-HETE	- Ácido 15-s-hidroieicosatetraenoico
ADMA	- Dimetilarginina assimétrica
Akt	- Proteína quinase B
AMPc	- Adenosina monofosfato cíclico
AT ₁	- Receptor de angiotensina II tipo 1
AT ₂	- Receptor de angiotensina II tipo 2
BK _{Ca}	- Canais para K ⁺ ativados por Ca ²⁺ de alta condutância
Ca ²	- Cálcio
CNG	- Canais iônicos ativados por nucleotídeos cíclicos
COX	- Ciclooxygenase
COX-1	- Ciclooxygenase-1
COX-2	- Ciclooxygenase-2
DAF	- Diaminofluoresceína
DAG	- Diacilglicerol
DCV	- Doenças cardiovasculares
DHE	- Dihidroetídio
ECA	- Enzima conversora de angiotensina
EDCF	- Fatores vasoconstritores derivados do endotélio
EDHF	- Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	- Fatores vasorrelaxantes derivados do endotélio
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
EP	- Receptor específico da Prostaglandina E2
EPAC	- Proteínas de troca diretamente ativadas por AMPc
FP	- Receptor específico da Prostaglandina F2α
GC	- Guanilato ciclase
GCs	- Guanilato ciclase solúvel
G _i	- Proteína G inibitória

GMPC	- Guanosina monofosfato cíclico
GPCR	- Receptor acoplado à proteína G
G _q	- Proteína G que regula a fosfolipase C
G _s	- Proteína G estimulatória
GTP	- Guanosina trifosfato
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
H ₂ S	- Sulfeto de hidrogênio
HB-EGF	- Fator de crescimento semelhante ao fator de crescimento epidermal ligado a heparina
IK _{Ca}	- Canais para K ⁺ ativados por Ca ²⁺ de intermediária condutância
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzível
IP ₃	- Inositol trifosfato
K ⁺	- Potássio
K _{ir}	- canais para K ⁺ retificadores de entrada
K _{Ca}	- Canais para K ⁺ ativados por Ca ²⁺
LOX	- Lipooxigenase
LPS	- Lipopolissacarídeos derivados de bactérias
NAD(P)H	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-κB	- Fator nuclear kappa B
nNOS	- Óxido nítrico sintase neuronal
NO	- Óxido nítrico
NOS	- Óxido nítrico sintase
OMS	- Organização Mundial de Saúde
ONOO	- Peroxinitrito
PDE	- Fosfodiesterase
PDGF	- Fator de crescimento derivado das plaquetas
PGE ₂	- Prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	-Prostaglandina F _{2α}
PGH ₂	- Prostaglandina H ₂
PGI ₂	- Prostaciclina
PKA	- Proteína quinase dependente de AMPc
PKG	- Proteína quinase dependente de GMPc
PLC	- Fosfolipase C

RAS	- Sistema renina-angiotensina
SK _{Ca}	- Canais para K ⁺ ativados por Ca ²⁺ de baixa condutância
SOD	- Superóxido dismutase
TNF- α	- Fator de necrose tumoral α
TP	- Receptor específico do tromboxano A ₂
TxA ₂	- Tromboxano A ₂

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 Hipertensão arterial	16
2.1.1 Controle do tônus vascular e hipertensão	18
2.2 Fosfodiesterases	26
2.3 Inibição das PDEs e função vascular	27
2.4 Cilostazol	28
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Geral	31
3.2 Específicos	31
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
5. ARTIGO A SER SUBMETIDO AO EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY.....	44
6. CONCLUSÕES	82

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica é uma doença multifatorial de alta prevalência, representando um grande desafio para a saúde pública no Brasil e no mundo (Malta *et al.*, 2017). Na maioria dos casos, desconhece-se a causa da hipertensão arterial. Seu curso progride com o envelhecimento, aumentando o risco para ocorrência de acidente vascular cerebral, doença coronariana, insuficiência cardíaca e renal, dentre outras complicações.

Estudos experimentais e epidemiológicos mostram que indivíduos hipertensos apresentam, com maior frequência, perfil lipídico desfavorável e maior tendência à trombogenese em comparação ao restante da população (NOZUE *et al.*, 2012;). Esta alteração pode acelerar o desenvolvimento de aterosclerose, levando ao agravamento da doença hipertensiva e o aparecimento de diversos eventos cardiovasculares, como a hipertrofia miocárdica e acidentes vasculares cerebrais.

No que diz respeito à função endotelial, sabe-se que o relaxamento dependente do endotélio se encontra prejudicado na hipertensão (BERNATOVA, 2016; VANHOUTTE *et al.*, 2005). A disfunção endotelial é atribuída ao aumento de fatores contráteis (EDCF) e redução de fatores vasorrelaxantes (ECRF). Esse desequilíbrio envolve uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, maior ativação das ciclooxigenases 1 e 2 (COX-1 e 2), e subsequente difusão desses EDCFs para as células da camada muscular dos vasos, provocando vasoconstrição através da ativação de receptores específicos (YANG *et al.*, 2002; 2003).

Dentre os fármacos utilizados no tratamento da hipertensão e de outras desordens cardiovasculares, encontram-se as drogas que são capazes de reduzir os níveis pressóricos e simultaneamente melhorar a função endotelial, fornecendo benefícios na redução da morbidade e mortalidade. Entre os anti-hipertensivos mais comuns, é possível citar os bloqueadores dos canais para cálcio, como o nifedipino e o verapamil, os antagonistas dos receptores adrenérgicos, como atenolol e o propranolol e os inibidores do sistema renina-angiotensina-aldosterona, como o enalapril, a losartana e a espironolactona, os quais agindo em diferentes pontos dessa via são capazes de diminuir a pressão arterial através da inibição dos efeitos da angiotensina II e/ou da aldosterona.

No entanto, estudos recentes apontam para a necessidade de se associar diferentes fármacos com mecanismos de ação distintos e não apenas reduzir os níveis pressóricos *per se*, a fim de obter efeitos positivos sobre a função cardiovascular. Nesse sentido, a associação de anti-hipertensivos a antiagregantes plaquetários se mostra eficiente e cada vez mais promissora, como mostram diversos trabalhos (BERTOLUCI *et al.*, 2017; LIP *et al.*, 2011). Isso se explica pelo fato de que o processo hipertensivo se encontra intimamente relacionado a um aumento da agregação plaquetária e consequentemente da aterogênese.

Nos últimos anos, foram adicionados diversos fármacos à terapia adjuvante para hipertensão, dentre eles os inibidores das fosfodiesterases. Tal fato ocorre porque estes demonstram ação vasodilatadora direta, antiplaquetária e podem ser utilizadas em outros tipos de hipertensão. Os inibidores das fosfodiesterases (PDEs) apresentam ações diretas e indiretas sobre a função endotelial e seu uso em algumas doenças cardiovasculares têm aumentado (CHAO *et al.*, 2012; MORI *et al.*, 2016). Por exemplo, o sildenafil, um inibidor da PDE5, melhora a função endotelial em modelo de camundongos com hipertensão renovascular (FAHNING *et al.*, 2015). Outro fármaco desta classe, o cilostazol, um inibidor da PDE3, foi capaz de promover aumento da perfusão tecidual da microcirculação cerebral após isquemia em animais SHR, fato que indica a função protetora desse fármaco sobre o endotélio vascular (OYAMA *et al.*, 2011).

As PDEs são um grupo de enzimas que catalisa a degradação hidrolítica do AMP cíclico (AMPC) e/ ou de GMP cíclico (GMPc) - os dois segundos mensageiros intracelulares essenciais que modulam diversos processos biológicos em células vivas. Um total de 11 famílias de PDE foram identificadas (CONTI *et al.*, 2007). A distribuição destas isoenzimas varia entre diferentes tecidos e tipos de células. Uma outra diferença importante entre as isoformas de PDE é a sua especificidade para o AMPC em relação ao GMPc (TAUSSIG & GILMAN, 1995). Na maioria das células, a PDE3 e a PDE4 promovem uma maior hidrólise do AMPC (FRANCIS *et al.*, 2011). Este é um mensageiro intracelular envolvido na vasodilatação, que pode atuar diretamente nas células musculares lisas vasculares (VSMC) diminuindo a concentração de cálcio intracelular, e ainda na células endoteliais, aumentando a síntese e liberação de óxido nítrico (FELDMAN & GROS, 2006).

Os níveis de AMPC em uma célula é regulado através do controle de sua síntese e degradação. Nos vasos sanguíneos, a degradação do AMPC é controlada

pela PDE3 e PDE4 nas células musculares lisas, e pela PDE2, PDE4 e PDE5 nas células endoteliais (POLSON & STRADA, 1996; ASHIKAGA *et al.*, 1997; DEGERMAN *et al.*, 1997). Sabe-se que a ativação de receptores beta-adrenérgicos na vasculatura ativa a adenilil ciclase e aumenta os níveis intracelulares de AMPc através do acoplamento à uma proteína G_s , o que leva a vasodilatação; uma falha na presente via de sinalização é pontada como um mecanismo importante no desenvolvimento e manutenção do processo hipertensivo, já que esta falha pode estar associada ao aumento da resistência vascular periférica (FELDMAN & GROS 2006). Adicionalmente, estudos mostraram que o aumento da degradação do AMPc pelas PDEs pode desempenhar papel importante no estabelecimento da hipertensão arterial. Sendo assim, estas PDEs passaram a ser consideradas alvos terapêuticos importantes; em doenças como a hipertensão pulmonar e a doença arterial periférica a inibição das PDEs tem mostrado resultados promissores (MATSUMOTO *et al.*, 2003; HOUSLAY *et al.*, 2005). No entanto, as informações sobre alterações na sinalização de AMPc e a hipertensão arterial ainda são escassas.

O cilostazol é um derivado quinolinônico classificado como antiagregante plaquetário e antitrombótico com ação vasodilatadora (KAMBAYASHI *et al.*, 2003). Este fármaco causa inibição potente e seletiva da PDE3, promovendo um aumento do AMPc nos trombócitos e nas células musculares lisas, diminuindo o cálcio intracelular com consequente inibição plaquetária e vasodilatação (IGAWA *et al.*, 1990; MATSUMOTO *et al.*, 2005). Além disso, estudos recentes demonstram que seu uso está associado à prevenção de apoptose de células endoteliais e a uma menor produção de radicais livres em condições de hiperlipidemia e choque (PARK *et al.*, 2010; ABDEELSAMEA *et al.*, 2016).

Diversos estudos comprovaram o efeito do cilostazol sobre a produção de fatores vasorrelaxantes derivados do endotélio. Embora a maioria dos trabalhos enfatize seu efeito sobre a produção de NO, uma vez que níveis sustentados de GMPc e AMPc provocados pela inibição da PDE3 implicam aumento da atividade da eNOS, há outras vias envolvidas na proteção vascular promovida pelo cilostazol. NAKAMURA *et al.* (2005) estudaram o efeito desse fármaco no relaxamento de arteríolas cerebrais pré-contraídas com tromboxano A_2 ou serotonina e verificaram que havia uma potencialização do efeito relaxante da adenosina. Recentemente, HASHIMOTO *et al.* (2016) demonstram que o cilostazol atua estimulando a síntese de PGI_2 , um vasodilatador derivado do metabolismo da ciclooxigenase. CHAO *et al.*

(2016) comprovaram em estudos clínicos que o tratamento com cilostazol aumenta a mobilização de células progenitoras endoteliais em indivíduos com alto risco para doença cardiovascular, como hipertensão e aterosclerose, fato que esteve intimamente relacionado a uma melhora da função vascular desses indivíduos.

Portanto, estes efeitos do cilostazol podem ser úteis para a proteção vascular em situações onde a função vascular está comprometida. Uma vez que o processo de lesão vascular apresenta diversas etiologias e é comum entre vários tipos de doenças cardiovasculares, torna-se importante investigar os efeitos promovidos pela inibição da PDE3 em um modelo de hipertensão essencial. Dessa forma, os objetivos do presente estudo foram estudar os efeitos cardiovasculares de um tratamento crônico com o cilostazol sobre a pressão arterial em animais hipertensos (SHR), bem como investigar possíveis mecanismos vasculares dependentes do endotélio envolvidos no processo de proteção vascular promovido por esse fármaco.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Hipertensão arterial

A hipertensão arterial é uma doença progressiva de curso lento que afeta aproximadamente um bilhão de pessoas em todo o mundo. A elevação da pressão arterial é o principal fator de risco para outras doenças cardiovasculares, como o infarto do miocárdio, os acidentes vasculares cerebrais (AVC), as doenças coronarianas e a insuficiência cardíaca, sendo capaz de causar cerca de 9,4 milhões de mortes por ano, segundo dados da *World Health Organization* (2013). De acordo com dados da Sociedade Brasileira de Hipertensão, as doenças cardiovasculares são a primeira causa de morte no Brasil (DATASUS).

Uma vez que a hipertensão arterial é considerada uma doença multifatorial, o entendimento de sua fisiopatologia é complexo. A hipertensão idiopática (primária ou essencial) acomete a maioria dos casos diagnosticados, enquanto que no restante é possível identificar as condições que resultam nesses níveis pressóricos elevados como doença renal, uso de contraceptivos orais, alterações hormonais, síndrome da apneia do sono ou alguma doença adquirida, como coarctação de aorta. Existem inúmeros estudos clínicos e experimentais referentes à hipertensão essencial, porém sua causa ainda permanece desconhecida na maioria dos casos visto que há alguns fatores que, em conjunto ou sozinhos, podem aumentar o risco de desenvolvimento da hipertensão primária em humanos, os quais incluem fatores genéticos e ambientais (BROOK, 2017).

Nessa perspectiva, em alguns modelos experimentais em roedores são produzidas modificações ambientais ou genéticas para melhor entender as causas e consequências da hipertensão em humanos. Sendo assim, o modelo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) se destaca pelo fato de os animais apresentarem hipertensão primária, em vários aspectos semelhantes à encontrada em humanos (LERMAN *et al.*, 2005). Esses animais manifestam a hipertensão logo após o desmame e em cerca de 10 semanas os níveis pressóricos elevados estão estabelecidos (WEXLER *et al.*, 1976).

É bem documentado que o aumento da resistência vascular periférica é uma das principais características da hipertensão primária. Uma vez que o controle do

tônus vascular é realizado por mecanismos neuro-humorais e locais, a participação de substâncias que agem ao nível das células musculares lisas e do endotélio é de suma importância para a compreensão das desordens vasculares presentes no processo hipertensivo.

No que se refere à sinalização envolvendo segundos mensageiros intracelulares, sabe-se que existem alterações do metabolismo do AMPc em ratos hipertensos que parecem contribuir para as alterações morfológicas e fisiológicas decorrentes do processo hipertensivo. Em 1996, Wu & Champlain demonstraram que baixos níveis de AMPc após estimulação adrenérgica em células musculares lisas de SHR estavam intimamente relacionados ao aumento da via do IP_3 , implicando na predominância da resposta alfa-adrenérgica (vasoconstritora) nos animais SHR e, conseqüentemente, nos níveis pressóricos elevados. Além disso, um prejuízo na função adrenoceptora tem sido registrado em diversos modelos animais de hipertensão (MARCIL *et al.*, 1998; TAKATA & KATO, 1996; WERSTIUK & LEE, 2000; MACDONNELL, 2007), quer seja caracterizado por um aumento na resposta vasoconstritora (resposta alfa), quer seja por dificuldade no relaxamento (resposta beta). Como demonstrado por BORKOWSKI *et al.* (1992), o desenvolvimento da hipertensão em ratos SHR está intimamente relacionado à atenuação da resposta adrenérgica vasorrelaxante em aortas. Além disso, estudos em humanos também mostram uma estreita relação entre a hipertensão arterial e o prejuízo no mecanismo de atuação de receptores adrenérgicos (ASANO *et al.*, 1988; ANDRE *et al.*, 2014).

Vale ressaltar que em artérias de SHR há um desequilíbrio entre a função da proteína G_s e da proteína G_i , sendo que ambas funcionam de modo interdependente, porém antagônico. Em 1996, Anand-Srivastava demonstrou que os níveis de G_{sq} em SHR eram semelhantes aos de ratos normotensos Wistar Kyoto (WKY), no entanto, a resposta da adenilil ciclase após ativação hormonal encontrava-se alterada em SHR. Nesse sentido, após a análise do RNAm verificou-se que havia um aumento na expressão das isoformas $G_{i\alpha 2}$ e $G_{i\alpha 3}$ (inibidoras da adenilil ciclase) o que poderia levar à diminuição dos níveis de AMPc. Diante desses achados, pode-se prever que esse desequilíbrio na proteína G_i poderia ser uma das causas que precede o prejuízo das funções vasculares mediadas pelo AMPc, que por sua vez pode contribuir na patogênese da hipertensão arterial. Neste sentido, SAHA *et al.* (2008)

demonstraram em SHR uma relação inversa entre os níveis de AMPc, a atividade da NADPH oxidase (uma das principais fontes geradoras de radicais livres na parede vascular) e a produção de ânions superóxido. Nestes animais a exposição ao análogo do AMPc, o 8Br-cAMP, reduziu a atividade da NADPH oxidase e a produção de ânions superóxido, sugerindo que o AMPc é capaz de proteger e melhorar a função vascular através da atenuação do estresse oxidativo.

É importante destacar que níveis de pressão aumentados estão intimamente associados ao aparecimento e estabelecimento de processos ateroscleróticos e trombóticos. No que tange aos mecanismos intracelulares, sabe-se que existe uma estreita relação entre a maior atividade das PDEs, a hipertensão arterial e a aterosclerose (TOMITA *et al.*, 1980; LOMINADZE *et al.*, 1997), fato que torna a manutenção de níveis adequados de AMPc um fator chave para o equilíbrio da função vascular. Níveis elevados de pressão diastólica e sistólica se correlacionam com as complicações ateroscleróticas e são fatores que aceleram o processo de senescência vascular (YIN & PICKERING, 2016). Além disso, estudos demonstram que a maioria dos pacientes com hipertensão essencial apresentam risco cardiovascular adicional e aumento da ativação plaquetária (GKALIAGKOUSI *et al.*, 2015).

Tratar a hipertensão arterial é fundamental, e o manejo deve englobar a proteção vascular e o equilíbrio da função endotelial. Em modelos animais e em humanos, a disfunção endotelial, além de prejudicar o vasorrelaxamento, provoca eventos isquêmicos e lesões em órgãos alvo. Nesse sentido, fármacos usados para tratamento/ prevenção de eventos isquêmicos são frequentemente associados a anti-hipertensivos, no sentido de reduzir o risco de eventos fatais e não fatais (ABOYANS *et al.*, 2015; MYINAMOTO *et al.*, 2015). Vale ressaltar que o *American College of Cardiology Foundation* recomenda a terapia antiplaquetária em várias DCVs.

2.1.1 Controle do tônus vascular: alterações na hipertensão

O tônus vascular é controlado através da atuação de vários mecanismos sobre a musculatura lisa vascular, dos quais se destacam: o sistema nervoso

simpático, o sistema angiotensina-aldosterona (RAS), o mecanismo miogênico, os fatores derivados do endotélio, dentre outros. Sabe-se que existe uma grande heterogeneidade na reatividade dos diferentes territórios vasculares, a qual varia de acordo com os tipos e densidade de receptores farmacológicos e com os mecanismos de transporte de íons no músculo liso (MULVANY & ASLHJAEER, 1990). Além disso, há uma série de trabalhos demonstrando que a liberação de fatores endoteliais pode variar dependendo do tamanho e localização dos vasos sanguíneos (CLARK & FUCHS, 1997; LAGAUD *et al.*, 1999).

A parede das artérias e veias é formada por vários constituintes celulares e proteínas da matriz extracelular que se distribuem em três camadas distintas: a). A camada íntima, composta pelas células endoteliais e membrana basal; b). A camada média, composta majoritariamente por células musculares lisas e c). A adventícia, o segmento mais externo do vaso, principalmente composta por fibroblastos, terminações nervosas e pequenos vasos. A parede arterial ainda é formada por duas camadas de tecido elástico: uma localizada entre a camada íntima e a média, a lâmina elástica interna, e a outra entre a camada média e a adventícia, a lâmina elástica externa.

Em relação à função desempenhada, as artérias são subdivididas em artérias de condutância (artérias elásticas), artérias musculares, artérias de resistência e arteríolas, e se diferenciam a partir do conteúdo da camada média, que cresce à medida que ocorrem as ramificações sendo maior nessas últimas. Além disso, esses vasos apresentam peculiaridades quanto à sensibilidade a hormônios e outras substâncias vasoativas locais ou circulantes. As pequenas artérias de resistência estão situadas entre as artérias de condutância e as arteríolas na parte distal da vasculatura, possuindo luzes relativamente estreitas e paredes musculares espessas, sendo considerados um dos principais reguladores da resistência periférica total. Essas artérias podem ser definidas como vasos pré-arteriolas que contribuem passivamente e ativamente para a manutenção da resistência basal e para o controle do fluxo sanguíneo durante alterações hemodinâmicas (FEIH *et al.*, 2008). Nesses locais ocorre dissipação da energia necessária para superar a resistência vascular, evidenciada por um acentuado declínio na pressão arterial, pois seus diâmetro são em torno de 400 μm (BORDERS & GRANGER, 1986; CHRISTENSEN & MULVANY, 2001; MULVANY & AALKJAER, 1990). Nos últimos

anos, o leito arterial mesentérico tem sido extensivamente estudado, pois a manutenção e regulação da resistência e do fluxo sanguíneo intestinal contribuem de forma efetiva para a resistência vascular periférica e dessa forma para a pressão arterial.

Alterações funcionais e estruturais nas artérias de resistência têm sido bem documentadas na hipertensão arterial (AGABITI *et al.*, 2003; HEAGERTY *et al.*, 2007). Espessura da camada média aumentada e aumento da relação parede/lumen em artérias mesentéricas de resistência de SHR têm sido observadas antes mesmo do desenvolvimento da hipertensão. Essas alterações vasculares representam um dos principais fatores para o aumento da resistência vascular periférica e incluem espessamento da parede arterial e redução do diâmetro interno nas artérias de resistência. Tais mudanças estruturais têm sido observadas em diversos leitos vasculares como em tecidos subcutâneo, omental, mesentérico e cerebral de ratos hipertensos (RIZZONI *et al.*, 2001; RIZZONI *et al.*, 2009). A disfunção das células endoteliais é outro processo bastante evidente em artérias de animais e pacientes com hipertensão arterial. Entretanto, é preciso levar em consideração que o papel do endotélio nos diferentes vasos tem suas peculiaridades, o que leva a diferenças fisiológicas ou fisiopatológicas dependendo do leito vascular estudado. Estudos mostram que em vasos considerados de condutância, o NO tem papel chave no relaxamento dependente do endotélio, enquanto em vasos mesentéricos, o EDHF parece ser o principal fator envolvido nesta resposta (LAGAUD *et al.*, 1999).

Independente do leito arterial, em condições fisiológicas o endotélio libera fatores vasorrelaxantes (EDRF) e vasoconstritores (EDCF), os quais são fundamentais para a manutenção do estado contrátil (tônus) da parede vascular. Na hipertensão arterial e em outras doenças cardiovasculares existe uma predominância na liberação de fatores vasoconstritores, associada com diminuição da liberação ou da atuação de fatores vasodilatadores. Dentre estes fatores contráteis liberados pelo endotélio se destacam os prostanoídes derivados do metabolismo do ácido araquidônico pela ciclooxigenase (COX), a endotelina 1 e a angiotensina II. Óxido nítrico, EDHF e prostacilina (PGI_2) estão entre os principais fatores vasodilatadores de origem endotelial (FÉLÉTOU *et al.*, 2010).

O ácido araquidônico quando oxidado pela COX produz o endoperóxido cíclico (PGH₂) que servirá de precursor para a produção da prostaglandina E₂ (PGE₂), da prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), da prostaglandina D₂ (PGD₂), da PGI₂ e do tromboxano A₂ (TxA₂). Quando metabolizado pela lipoxigenase, o ácido araquidônico é transformado em ácido 15- s-hidroxieicosatetraenóico (15-HETE), uma substância que é capaz de produzir contração vascular (VANHOUTTE & EBER, 1991). A relação entre o aumento da expressão da COX e o estabelecimento da disfunção endotelial tem sido demonstrada em vários modelos de hipertensão e em humanos. Em aortas de animais espontaneamente hipertensos (SHR), as contrações dependentes do endotélio são associadas ao aumento na expressão de COX-1, e a uma maior liberação de prostaciclina e tromboxano A₂ (BAGI *et al.*, 2005; FÉLÉTOU *et al.*, 2009; GUO *et al.*, 2005). Estes agentes contráteis interagem com receptores acoplados à proteína G, e provocam aumento dos níveis intracelulares de cálcio nas células musculares lisas levando à contração destas (ALFRANCA *et al.*, 2006; FELETOU *et al.*, 2010; TSUBOI *et al.*, 2002). Vale ressaltar que além das prostaglandinas citadas, a ativação da COX também pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio, como os ânions superóxido, e de isoprostanos (WATKINS *et al.*, 1999; TANG *et al.*, 2007). Espécies reativas de oxigênio diminuem a biodisponibilidade de óxido nítrico (RUBANYI & VANHOUTTE, 1986) e como um ciclo de retroalimentação positiva, há estimulação da COX produzindo mais prostanóides provocando mais vasoconstrição e menos vasorrelaxamento (MORITA *et al.*, 2002).

O •NO é um radical gasoso lipofílico, com meia vida *in vivo* menor que 5 segundos, o qual é sintetizado no endotélio a partir da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS/ NOS III). Sua produção é dependente da biodisponibilidade de alguns cofatores, da fosforilação da eNOS em sítios específicos e é sujeita à regulação por feedback negativo (FORSTEMAN *et al.*, 2012). O receptor endógeno para o •NO é a enzima guanilil ciclase solúvel (GCs), encontrada em várias células, dentre elas as células musculares lisas vasculares. Esta enzima é um heterodímero que contém o grupo prostético heme que catalisa a conversão de GTP em GMPc. Os efeitos celulares e fisiológicos do GMPc incluem vasodilatação, inibição da proliferação das células musculares lisas, prevenção de fibrose e efeitos antitrombóticos e anti-inflamatórios, os quais são mediados por três principais alvos:

a proteína quinase dependentes de GMPc (PKG), os canais iônicos e as fosfodiesterases. O efeito vasodilatador do GMPc é mediado através de mecanismos que reduzem os níveis de cálcio e dessensibilizam o aparato contrátil. A PKG ativa a fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), levando à desfosforilação desta, ativa canais para potássio dependentes de cálcio e a bomba de sódio, levando à hiperpolarização e inibição dos canais para cálcio voltagem dependentes (tipo L). Reduções na produção desse gás ou na sua biodisponibilidade têm sido associadas a eventos trombóticos, proliferativos, pró-oxidativos, pro-inflamatórios e vasoconstritores (DAYAL *et al.*, 2015).

Outro fator vasodilatador que merece destaque é o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), cuja ação também se traduz em vasorrelaxamento. Sua identidade química ainda permanece desconhecida, mas alguns fatores têm sido propostos por agirem como EDHF, como os ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o peptídeo-C natriurético, a anandamida, os íons K^+ , o H_2S , o nitroxil e a adenosina. Entretanto, há uma marcante heterogeneidade nos mecanismos que provocam a hiperpolarização das células musculares lisas, além disso, essa hiperpolarização varia com os diferentes leitos e espécies e condições experimentais de estudo (ELLINSWORTH *et al.*, 2014). Sabe-se, por exemplo, que a contribuição do EDHF no relaxamento de artérias de resistência é maior que em artérias de condutância (TOMIOKA *et al.*, 1999). O EDHF tem como função reduzir a concentração endotelial de Ca^{2+} , a qual é mediada através da hiperpolarização gerada pela abertura de canais para K^+ dependentes de Ca^{2+} de baixa e de intermediária condutâncias (SKCa, IKCa). Porém, é possível ainda indicar a participação de outros canais para K^+ nessas respostas como os canais para K^+ retificadores de entrada (Kir), os canais para K^+ voltagem dependentes, os canais para K^+ sensíveis a ATP e ainda a Na^+/K^+ ATPase e as junções mioendoteliais tipo Gap (VADZIUK, 2014).

Nessa perspectiva, vale salientar a existência de uma interdependência entre a ação do NO e a hiperpolarização mediada por EDHF. A enzima eNOS ao produzir •NO também produz ânions superóxido, os quais posteriormente sofrem redução pela superóxido dismutase (SOD) e isso conduz à formação de EDHF/ H_2O_2 levando à hiperpolarização seguida de vasodilatação (CAPETINNI *et al.*, 2011).

Conforme comentado anteriormente, na correlação existente entre o desequilíbrio na função endotelial e a hipertensão primária, vê-se que há uma ruptura dos mecanismos que levam à vasodilatação, e tal fato está intimamente relacionado ao ciclo de retroalimentação positiva no qual elevados níveis pressóricos causam aumento de EDCFs e redução de EDRF/ EDHF reciprocamente. No que se refere ao efeito da acetilcolina para promover vasorrelaxamento, estudos mostram que em ratos normotensos jovens, parece não existir distinção entre a via do •NO de outros agentes vasodilatadores, porém em SHR, o relaxamento mediado pelo •NO é dominante (BACHSCHMID *et al.*, 2013; HAN *et al.*, 2013). No entanto, há certa contradição a cerca do papel do óxido nítrico no estabelecimento da disfunção endotelial em SHR, uma vez que há trabalhos mostrando uma produção de óxido nítrico compensatória nesse modelo (GLUAIS *et al.*, 2005; MORI *et al.*, 2006) enquanto outros demonstram menor expressão da eNOS acompanhada de menor disponibilidade do NO como sendo as causas da disfunção endotelial (CHOU *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 2011).

Embora os fatores citados até agora sejam relativos ao equilíbrio da função endotelial, o mensageiro intracelular AMPc tem papel fundamental no funcionamento adequado tanto em células musculares lisas como nas células endoteliais, de grandes e pequenos vasos, porém os mecanismos exatos no que diz respeito ao vasorrelaxamento ainda precisam ser esclarecidos devido à diversidade de ações que essa molécula propicia. Sabe-se que a vasculatura expressa três diferentes classes de proteínas efetoras do AMPc: a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), canais iônicos ativados por nucleotídeos cíclicos (CNG) e proteínas de troca ativadas por AMPc (Epac). O AMPc é sintetizado por uma família de enzimas, denominadas adenilil ciclases (ACs) e tem seus níveis intracelulares regulados através da sua síntese e degradação. Em mamíferos pelo menos dez isoformas da adenilil ciclase já foram identificadas e caracterizadas (BUCK *et al.*, 1999; TANG & HURLEY, 1998). De forma geral, o AMPc induz relaxamento através da redução do cálcio citossólico nas células musculares lisas ou por alterar a sensibilidade das proteínas contráteis a esse íon, sendo a maioria desses efeitos atribuídos à ativação da PKA.

Após ativação da adenilil ciclase, o AMPc formado se liga à subunidade regulatória da PKA (BRODDE *et al.*, 1993), induzindo mudanças conformacionais

que induzem à subunidade catalítica a desencadear respostas funcionais como aumento da recaptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, bem como redução do influxo de cálcio através da membrana plasmática (AKATA *et al.*, 2007; MUNDINA-WEILENMANN *et al.*, 2000). Tem-se o desencadeamento de correntes de K^+ hiperpolarizantes e redução da atividade de canais para Ca^{2+} voltagem-dependentes (NELSON *et al.*, 1990). Adicionalmente atribui-se a esse nucleotídeo uma diminuição da sensibilidade da cadeia leve da miosina (MLC) ao cálcio, levando a uma menor intensidade de interações actina-miosina e consequentemente relaxamento (AKATA *et al.*, 2007).

Nas células endoteliais, o AMPc atua através da ativação dos canais CNG, levando a um aumento de cálcio e consequente ativação de sinais intracelulares Ca^{2+} -dependentes (CHENG *et al.*, 2008; SERBAN *et al.*, 2010), por exemplo, um aumento na produção de $\bullet NO$, via fosforilação da eNOS e aumento da interação cálcio-calmodulina (FERRO *et al.*, 2004). Há ainda produção de EDHF, envolvendo a ativação dos canais SK_{Ca} e IK_{Ca} e a geração de correntes hiperpolarizantes nessas células, as quais se propagam para a camada de músculo liso via junções mioendoteliais (EDWARDS *et al.*, 2010; GRIFFITH *et al.*, 2002), onde o próprio AMPc tem sido apontado como facilitador da permeabilidade e condutância destas junções. (CHAYTOR *et al.*, 2002).

Mais recentemente, foi identificado mais um efector para o AMPc, as Epacs, proteínas trocadoras de nucleotídeos de guanina com outras proteínas regulatórias como GTPases, Rap1 e Rap2, as quais são abundantes na vasculatura (PARNELL *et al.*, 2012; PURVES *et al.*, 2009). O papel das Epacs na regulação do tônus pelo AMPc envolve alterações na sensibilidade da MLC e no nível de IP_3 (PURVES *et al.*, 2009; ZIEBA *et al.*, 2011). ROBERTS *et al.* (2013), demonstraram que as Epacs ativam os canais SK_{Ca} e IK_{Ca} levando à hiperpolarização do endotélio e consequentemente das células musculares, simultaneamente à ativação da eNOS e independente da ativação da PKA.

Outro segundo mensageiro importante em células musculares lisas e endoteliais é o GMPc, o qual é sintetizado através de dois tipos de guanilil ciclases, a presente na membrana plasmática GCp, cuja ativação pode ser desencadeada pelos peptídeos natriuréticos atrial, cerebral e tipo C (ANP, BNP e CNP,

respectivamente), e a guanilil ciclase solúvel ativada pelo NO endotelial ou pelos doadores de NO (CARY *et al.*, 2006; POTTER *et al.*, 2006). Suas ações devem-se à ativação da PKG, uma quinase que fosforila diversos alvos intracelulares e é autorregulada pela concentração de GMPc.

Entretanto, é importante mencionar que os nucleotídeos citados podem ativar tanto a PKA quanto a PKG. Para ativar a PKG é necessária uma concentração de AMPc dez vezes maior que a de GMPc, similarmente, para ativar a PKA é necessária uma concentração de GMPc dez vezes maior que a de AMPc. Nesse sentido, em células do músculo liso a concentração de AMPc é dez vezes maior que a de GMPc, por isso, alterações na concentração citosólica de AMPc podem ativar potencialmente tanto a PKA como a PKG, enquanto GMPc ativa apenas a PKG. Portanto, existe uma ativação da PKG pelo AMPc e tal fato seria mais uma explicação para o efeito vasodilatador do AMPc, além disso, tem-se comprovado que o GMPc exerce efeitos estimulatórios sobre a atividade da PKA (CORNWELL *et al.*, 1994; ECKLY-MICHE *et al.*, 1997; HARRAZ *et al.*, 2014). Sabe-se ainda que há um *crosstalk* entre o AMPc e o GMPc, e ambos são capazes de modular a atividade de canais iônicos, e por conseguinte, o tônus vascular. Ambos mensageiros são importantes moduladores dos canais para K^+ , e isso implica no controle do vasorrelaxamento. VELASCO (1998) demonstrou que tanto o AMPc quanto o GMPc estimulam a atividade dos canais para K^+ de larga condutância, através de uma via dependente da fosforilação da PKG, enquanto SCHUBERT *et al.* (1999) comprovam a participação da PKA na manutenção do tônus miogênico em artérias de resistência.

Dessa forma, o balanço entre a produção e a degradação tanto do AMPc quanto do GMPc é de suma importância na manutenção do tônus e da função vascular. Assim, o grupo de enzimas chamadas fosfodiesterases que atuam metabolizando esses nucleotídeos e as alterações em sua atividade têm sido associadas a vários processos patológicos.

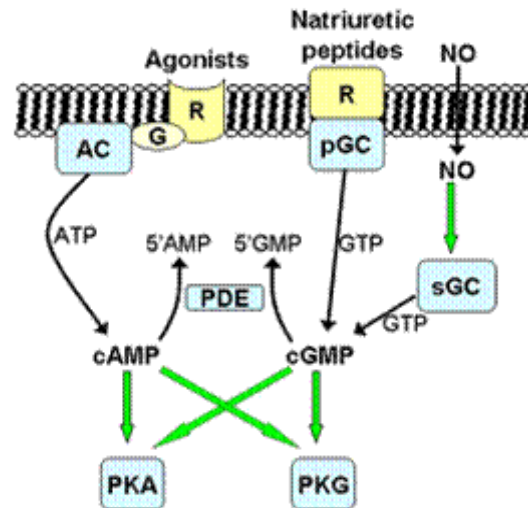


Figura 1. Mecanismos envolvidos na regulação dos níveis de nucleotídeos cíclicos e ativação das quinases por esses nucleotídeos. Morgado *et al.*, 2012.

2.2 As fosfodiesterases

As PDEs se apresentam em diferentes isoformas e são classificadas em onze sub-famílias dependendo da afinidade do nucleotídeo e de suas propriedades regulatórias. Algumas classes de PDE metabolizam AMPc e GMPc, como a PDE3, enquanto as PDE5, PDE6 e PDE9 hidrolizam apenas GMPc e as PDE4, PDE7 e PDE8 metabolizam seletivamente AMPc (MATSUMOTO *et al.*, 2003). Os vasos sanguíneos expressam quatro formas dominantes de PDE: a PDE1, a PDE2, a PDE3 e a PDE4 (HUBERT *et al.*, 2014). A PDE3 existe sob as isoformas PDE3A e PDE3B, tendo a PDE3A maior expressão em células musculares lisas e no aparelho cardiovascular, apresentando maior afinidade pelo GMPc do que pelo AMPc, mas hidrolisando o AMPc dez vezes mais que o nucleotídeo de guanosina, visto que o último se comporta como um inibidor competitivo da PDE3 (BELTMAN, *et al.*, 1995; BUSCH, *et al.*, 2010). Tal efeito comprova ainda mais a comunicação entre as ações do AMPc e do GMPc.

O papel das PDEs nos fenômenos de contração e relaxamento vasculares parece apresentar-se de maneira indireta, pois esses estágios são regidos por mecanismos intra e extracelulares fortemente relacionados. Além disso as ações dessas enzimas são mediadas pela regulação na concentração intracelular de AMPc. Assim, em condições patológicas, como na hipertensão arterial, o

desequilíbrio da função endotelial, sobretudo do óxido nítrico, associado à deficiência na sinalização intracelular do AMPc e/ou do GMPc, podem ser a causa e simultaneamente serem consequências do processo hipertensivo. Portanto, o tratamento dessa complicação deve passar por ações que vão desde a simples redução dos níveis pressóricos, como a promoção de fatores de proteção do equilíbrio vascular.

2.3 Inibição das PDEs e a função vascular

Os inibidores das fosfodiesterases apresentam diversas ações como, aumento da contratilidade miocárdica, redução da resistência vascular periférica e pulmonar, sendo estas ações dependentes da especificidade tecidual. Como principais representantes dessa classe, têm-se o sildenafil (inibidor da PDE5), a milrinona (inibidor da PDE3) e o cilostazol (inibidor da PDE3).

Ao inibir as PDEs os níveis de AMPc e de GMPc são elevados, produzindo atividade depressora sobre a função das plaquetas e uma ação antitrombótica. A elevação de nucleotídeos cíclicos bloqueia o arranjo do citoesqueleto plaquetário, a ativação do receptor para o fibrinogênio, a degranulação e a expressão de mediadores pro-inflamatórios (DANIEL, *et al.*, 2002), sendo portanto, de fundamental importância na prevenção de eventos aterotrombóticos. Além disso, o acúmulo de AMPc desencadeia uma série de reações nas células musculares lisas, via antioncogenes p53 e p21 e via fator de crescimento de hepatócitos (HGF) levando à apoptose das células, o que culmina em efeito antiproliferativo (MOSHIRITA *et al.*, 1997).

A inibição das PDEs pode também ser feita de forma não seletiva, através de metilxantinas e da pentoxifilina, e diversos estudos comprovam a eficácia dessas substâncias. Inibidores da PDE2 têm sido usados principalmente em pesquisas, mas já existem resultados mostrando seus efeitos sobre a melhora da permeabilidade vascular na inflamação (BENDER *et al.*, 2006). Já os inibidores da PDE5, como o sildenafil, vardenafil e tadalafil, são comumente usados no tratamento da disfunção erétil. O sildenafil sozinho não exerce efeito sobre a função plaquetária, porém potencializa a inibição feita pelo nitroprussiato de sódio (WALLIS, *et al.*, 1999).

Enquanto o tadalafil, ao aumentar os níveis de GMPc reduzem a expressão de selectinas em plaquetas (DE BON, 2010).

Como inibidores da PDE3, têm-se a milrinona, o dipiridamol e o cilostazol. A milrinona é um inibidor específico para a PDE3A, inibe a agregação plaquetária e melhora a função endotelial, aumenta a contratilidade cardíaca, o que na clínica se traduz para seu uso na insuficiência cardíaca congestiva (OIKAWA, *et al.*, 2013; RUDZINSKI, *et al.*, 2013). Já o dipiridamol é um inibidor das PDE3 e PDE5, age como antioxidante e aumenta a biossíntese de PGI₂, e previne proliferação celular (CHAKRABARTI, *et al.*, 2008; KIM e LIAO, 2008).

2.4 Cilostazol

O Cilostazol (6-(4-(1-ciclohexil-1H-tetrazol-5-yl)butoxi)-3,4-dihidro-2(1H)-quinolinona) – figura 3, é um inibidor reversível da PDE3 que teve seu uso aprovado nos EUA em 1999 para o tratamento de claudicação intermitente, situação que, por si só, é uma importante marcadora de aterosclerose sistêmica (KUMAR *et al.*, 2007). Essa molécula é rapidamente absorvida por via oral, e tem meia vida de aproximadamente 10 horas. Sofre metabolismo hepático através das CYP3A5 e CYP2C19 (isoformas do citocromo P450) e apresenta excreção renal (SCHROR *et al.*, 2002; ABBAS *et al.*, 2000). Além disso, esse fármaco tem sido apontado como tendo ações superiores às da aspirina e da ticlodipina, pois possui ação antiagregante sem aumentar o tempo de sangramento (TAMAI *et al.*, 1999; KORK, *et al.*, 2015). Adicionalmente se mostra mais efetivo na prevenção de AVC secundário.

Similar aos outros membros dessa classe, o cilostazol tem como efeitos aumentar os níveis de AMPc em plaquetas, em células musculares lisas e endoteliais e em outros tecidos que expressam essa enzima, levando a inúmeros benefícios. Dentre esses efeitos benéficos, têm-se vasodilatação devido maior produção de •NO (HASHIMOTO *et al.*, 2006) inibição da proliferação celular, retardando o processo de remodelamento vascular (HAYASHI *et al.*, 2000) e bloqueando a liberação de interleucina-1 em células musculares lisas (TAKAGURI, 2015; SANGANALMATH *et al.*, 2008), aumento dos níveis plasmáticos de HDL e

simultaneamente, redução dos níveis de triglicerídeos, fatores que em conjunto contribuem para o processo aterosclerótico (ITO *et al.*, 2012; UENO, 2011). Adicionalmente, reduz a progressão de processos inflamatórios e de senescência vascular (WADA *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2015).

Como vasodilatador, sua ação pode ser dependente da PKA e atua reduzindo a concentração de Ca^{2+} intracelular, suprimindo a vasoconstrição (HASHIMOTO *et al.*, 2006; NISHIOKA, *et al.*, 2011). NAKAMURA *et al.* (2001), demonstraram que o relaxamento induzido por cilostazol em artérias precontraídas com fenilefrina é em parte dependente do endotélio, o qual é mediado por uma aumento da atividade da eNOS como consequente aumento da liberação de $\bullet\text{NO}$. Mais recentemente, LI *et al.* (2015) demonstraram que a vasodilatação induzida pelo cilostazol ocorria também através da ativação de canais para K^+ dependentes de cálcio (BK_{Ca}).

Em relação aos seus efeitos independente da PKA, um estudo recente mostrou que o cilostazol induz a produção de PGI_2 através da cascata de sinalização das Epac-Rap1 em células endoteliais humanas (HASHIMOTO, *et al.*, 2015) e tal fato favorece a compreensão para as diferentes vias que levam ao relaxamento vascular induzidas pelo cilostazol. Além disso, há mais um mecanismo de ação para esse composto, fato que o diferencia de outros inibidores de PDE3 e justifica seu uso em eventos isquêmicos. Esse fármaco, em plaquetas e em células do músculo liso inibe a captação de adenosina do meio extracelular, melhorando suas ações via receptores A_1 e A_2 com consequente aumento nas concentrações intracelulares de AMPc (SCHRÖR, *et al.*, 2002; BICETTI *et al.*, 2015).

É válido ressaltar que os efeitos neuroprotetores do cilostazol são mediados tanto pelo seu efeito vasodilatador como por sua função antiagregante plaquetária. Estudos *in vivo* indicaram que o cilostazol protege os neurônios em modelo de infarto cerebral, além disso, sua administração aguda reduz a área de infarto, preservando as funções motoras, espaciais e cognitivas em ratos espontaneamente hipertensos (OMOTE *et al.*, 2012). Recentemente, um estudo clínico (UCHIYAMA *et al.*, 2015) demonstrou que o tratamento com cilostazol reduziu eventos vasculares como hemorragias e isquemia, e sugeriu uma terapia combinada de cilostazol e aspirina para controlar danos em artérias estenosadas. Além disso, as perspectivas para o uso do cilostazol parecem bastante promissoras, pois seu efeito sobre a

proliferação celular, sobre as alterações na permeabilidade vascular e barreira hematoencefálica, e até mesmo sobre doenças que cursam com disfunção endotelial, como a demência por hipoperfusão e Alzheimer, têm sido investigado (KWON *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2016; TAGAKI & HARA, 2016).

Dessa forma, pode-se dizer que o cilostazol apresenta efeitos pleitrópicos, pois se veem ações positivas em diversos órgãos, as quais são associadas à melhora da função vascular. KIM *et al.* (2016) demonstraram que o tratamento com cilostazol proporciona melhora do quadro de retinopatia diabética, sendo esta doença considerada fator chave para o declínio da qualidade de vida. Tais resultados são promissores visto que servem de suporte para modificações na terapêutica dessa condição clínica, principalmente pelo fato de outros antiagregantes plaquetários como a aspirina, serem contra indicados em diabéticos. Outra ação que vale ressaltar é o efeito do cilostazol em modelos de taquicardia atrial. Cães tratados com cilostazol por duas semanas tiveram remodelamento estrutural e fibrose intersticial atenuados, sendo estes efeitos atribuídos a modulações na expressão gênica regulada por MEK/REK (ZHAO *et al.*, 2016).

Sendo assim, inibir ou ainda prevenir as desordens cardiovasculares, principalmente no que se refere ao endotélio, presentes na hipertensão é fator chave na progressão da hipertensão. Nas últimas décadas, inúmeros estudos tem sido conduzidos a fim de compreender a disfunção endotelial e a aterosclerose observada na hipertensão essencial. Uma vez que modelos experimentais como os SHR, exibem desequilíbrio na função endotelial, lesões em órgãos-alvo, aumento na formação de trombos, é válido investigar os mecanismos envolvidos em uma terapia antitrombótica durante o processo hipertensivo. Assim, a terapia de inibição da PDE3 mostra-se bastante promissora devido à gama de ações que o AMPc apresenta sobre o sistema cardiovascular.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

O presente estudo objetivou estudar os efeitos cardiovasculares do tratamento crônico com um inibidor da PDE3, o cilostazol, analisando seus efeitos sobre a pressão arterial e a reatividade vascular em ratos hipertensos (SHR).

3.2. Específicos

- Investigar a ação do tratamento crônico com cilostazol sobre a pressão arterial sistólica, diastólica e média, e sobre a frequência cardíaca em modelo animal de hipertensão essencial;

- Analisar em artérias de resistência desses animais se o tratamento com cilostazol é capaz de alterar:

1. O relaxamento dependente e independente do endotélio
2. A resposta contrátil à noradrenalina.
3. O relaxamento adrenérgico mediado pelo isoproterenol.

- Identificar o efeito da inibição da PDE3 sobre a participação de fatores vasoativos como o NO, o EDHF e os canais para K^+ ativados por Ca^{2+} nessas artérias, bem como da participação da via endotelial NO/ GMPc;

- Verificar o efeito do tratamento sobre a produção de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio (ROS) *in situ* nessas artérias de resistência;

- Avaliar o efeito do tratamento com cilostazol sobre a expressão na sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) em artérias de resistência;

- Identificar se há diferenças entre a expressão da PDE3 (PDE3A) nesses vasos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, R.; CHOW, C. P.; BROWDER, N. J.; et al. In vitro metabolism and interaction of cilostazol with human hepatic cytochrome P450 isoforms. *Hum Exp Toxicol*, v. 19, p. 178-84, 2000.
- ABDELSAMEEA, A. A.; MOHAMED, A. M.; AMER, M. G.; ATTIA, S. M. Cilostazol attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol*, v. 68, p. 247-53, 2016.
- ABOYANS, V.; BRODMANN, M.; DE CARLO, M.; CLEMENT, D.; MAZZOLAI, L.; VAN BORTEL, L.; VAN SAMBEEK, M. R.; VLACHOPOULOS, C. The year in cardiology 2014: peripheral circulation. *Eur Heart J*, v. 36, p. 591-7, 2015.
- AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca²⁺ mobilization and/or myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle cells. *J Anesth*, v. 21, n.2, p.232-42, 2007.
- ANAND-SRIVASTAVA, M. B. G-proteins and adenylyl cilase signalling in hypertension. *Mol Cell Biochem*, v. 157, p. 163-70, 1996.
- ANDRÉ G.; SANDOVAL, J. E.; RETAILLEAU, K.; LOUFRANI, L.; TOUMANIANTZ, G.; OFFERMANN, S.; ROLLI-DERKINDEREN, M.; LOIRAND, G.; SAUZEAU, V. Smooth muscle specific Rac1 deficiency induces hypertension by preventing p116RIP3-dependent RhoA inhibition. *J Am Heart Assoc*, v. 3, p. 000852, 2014.
- ASANO, M.; MASUZAWA, K.; MATSUDA, T. Role of stimulatory GTP-binding protein (Gs) in reduced beta-adrenoceptor coupling in the femoral artery of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*, v. 95, p. 241-51, 1988.

- BELTMAN, J.; BECKER, D. E.; BUTT, E.; et al. Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases with cyclic GMP analogs: topology of the catalytic domains. *Mol Pharmacol*, v. 47, p. 330–39, 1995.
- BERNATOVA, I. Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: cause or consequence? *Biomed Res Int*, v. 2014, p. 598271, 2014.
- BERTOLUCI, M. C.; MOREIRA, R. O.; FALUDI, A.; IZAR, M. C.; SCHAAAN, B. D.; VALERIO, C. M.; BERTOLAMI, M. C.; CHACRA, A. P.; MALACHIAS, M. V. B.; VENCIO, S.; SARAIVA, J. F. K.; BETTI, R.; TURATTI, L.; FONSECA, F. A. H.; BIANCO, H. T.; SULZBACH, M.; BERTOLAMI, A.; SALLES, J. E. N.; HOHL, A.; TRUJILHO, F.; LIMA, E. G.; MINAME, M. H.; ZANELLA, M. T.; LAMOUNIER, R.; SÁ, J. R.; AMODEO, C.; PIRES, A. C.; SANTOS, R. D. Brazilian guidelines on prevention of cardiovascular disease in patients with diabetes: a position statement from the Brazilian Diabetes Society (SBD), the Brazilian Cardiology Society (SBC) and the Brazilian Endocrinology and Metabolism Society (SBEM). *Diabetol Metab Syndr*, p. 14, n. 9, p. 9 -53, 2017.
- BIAN, K.; DOURSOUT, M. F.; MURAD, F. Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, v. 10, p. 304-10, 2008.
- BISCETTI, F.; FERRACCIOLI, G.; FLEX, A. New therapeutic effects of cilostazol in patients with ischemic disorders. *Curr Vasc Pharmacol*, v. 13, p. 399-404, 2015.
- BORKOWSKI, K. R.; GROS, R.; SCHNEIDER, H. Vascular beta-adrenoceptor-mediated responses in hypertension and ageing in rats. *J Auton Pharmacol*, v. 12, p. 389–401, 1992.
- BROOK R. D. The Environment and Blood Pressure. *Cardiol Clin*, v. 32, n. 2, p. 213-221, 2017.

- BUSCH, C. J.; GRAVELINE, A. R.; JIRAMONGKOLCHAI, K.; LIU, H.; SANCHEZ, L. S.; BLOCH, K. D. Phosphodiesterase 3A expression is modulated by nitric oxide in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J Physiol Pharmacol*, v. 61, p. 663-9, 2010.
- CARY, S.P.; WINGER, J.A.; DERBYSHIRE, E. R.; MARLETTA, M. A. Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. *Trends Biochem Sci*, v. 31, p. 231–9, 2006.
- CHAKRABARTI, S.; FREEDMAN, J. E. Dipyridamole, cerebrovascular disease, and the vasculature. *Vasc Pharmacol*, v. 48, p. 143–9, 2008.
- CHAO, T. H.; TSENG, S. Y.; LI, Y. H.; LIU, P. Y.; CHO, C. L.; SHI, G. Y.; WU, H. L.; CHEN, J. H. A novel vasculo-angiogenic effect of cilostazol mediated by cross-talk between multiple signalling pathways including the ERK/p38 MAPK signalling transduction cascade. *Clin Sci (Lond)*, v. 123, p. 147–59, 2012.
- CHAO, T. H.; CHEN, I. C.; LEE, C. H.; CHEN, J. Y.; TSAI, W. C.; LI, Y. H.; TSENG, S. Y.; TSAI, L. M.; TSENG, W. K. Cilostazol enhances mobilization of circulating endothelial progenitor cells and improves endothelium-dependent function in patients at high risk of cardiovascular disease. *Angiology*, v. 67, p. 638-46, 2016.
- DE BON, E.; BONANNI, G.; SAGGIORATO, G.; BASSI, P.; CELLA, G. Effects of tadalafil on platelets and endothelium in patients with erectile dysfunction and cardiovascular risk factors: a pilot study. *Angiology*, v. 61, p. 602–6, 2010.
- ECKLY-MICHEL, A.; MARTIN, V.; LUGNIER, C. Involvement of cyclic nucleotide-dependent protein kinases in cyclic AMP-mediated vasorelaxation. *Br J*

Pharmacol, v. 122, p. 158–164, 1997.

FAHNING, B. M.; DIAS, A. T.; OLIVEIRA, J. P.; GAVA, A. L.; PORTO, M. L.; GOMES, I. B.; NOGUEIRA, B. V.; CAMPAGNARO, B. P.; PEREIRA, T. M.; VASQUEZ, E. C.; BALARINI, C. M.; MEYRELLES, S. S. Sildenafil improves vascular endothelial structure and function in renovascular hypertension. *Curr Pharm Biotechnol*. v. 16, p. 823-31, 2015.

FELDMAN, R. D.; GROS, R. Defective vasodilatory mechanisms in hypertension: a G-proteincoupled receptor perspective. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, v. 15, p. 135–140, 2006.

GKALIAGKOUSI, E.; GAVRIILAKI, E.; DOUMA, S. Antiplatelet treatment in essential hypertension: where do we stand? *Curr Hypertens Rep*, v. 17, p. 536, 2015.

GOWRISANKAR YV, CLARK MA. Angiotensin II induces interleukin-6 expression in astrocytes: Role of reactive oxygen species and NF-κB. *Mol Cell Endocrinol*, v. 437, p. 130-41, 2016.

GREGOIRE, S. M.; BROWN, M. M.; KALLIS, C.; JAGER, H. R.; YOUSRY, T. A; WERRING, D. J. MRI detection of new microbleeds in patients with ischemic stroke: five-year cohort follow-up study. *Stroke*, v. 41, p. 184–6, 2010.

GRIFFITH, T. M.; CHAYTOR, A. T.; TAYLOR, H. J.; GIDDINGS, B. D; EDWARDS, D. H. cAMP facilitates EDHF-type relaxations in conduit arteries by enhancing electronic conduction via gap junctions. *Proc Natl Acad Sci USA*, v, 99, p. 6392–7, 2002.

HARRAZ, O. F.; BRETT, S. E.; WELSH, D. G. Nitric oxide suppresses vascular voltage-gated T-type Ca²⁺ channels through cGMP/PKG signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 306, p. H279-85, 2014.

HASHIMOTO, A.; TANAKA, M.; TAKEDA, S.; ITO, H.; NAGANO K. Cilostazol induces PGI₂ production via activation of the downstream Epac-1/Rap1 signaling cascade to increase intracellular calcium by PLC ϵ and to activate p44/42 MAPK in human aortic endothelial cells. *PLoS One*, v. 10, p. e0132835, 2015.

HASHIMOTO, A.; MIYAKODA, G.; HIROSE, Y.; et al. Activation of endothelial nitric oxide synthase by cilostazol via a cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism. *Atherosclerosis*, v. 189, p. 350-7, 2006.

HUBERT, F.; BELACEL-OUARI, M.; MANOURY, B.; ZHAI, K.; DOMERGUE-DUPONT, V.; MATEO, P.; JOUBERT, F.; FISCHMEISTER, R.; LEBLAIS, V. Alteration of vascular reactivity in heart failure: role of phosphodiesterases 3 and 4. *Br J Pharmacol*, n. 171, p. 5361-75, 2014.

ITO, H.; UEHARA, K.; MATSUMOTO, Y.; HASHIMOTO, A.; NAGANO, C.; NIIMI, M.; MIYAKODA, G.; NAGANO, K. Cilostazol inhibits accumulation of triglyceride in aorta and platelet aggregation in cholesterol-fed rabbits. *PLoS One*, v. 7, p. e39374, 2012.

KIM, H. H.; LIAO, J. K. Translational therapeutics of dipyridamole. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.28, p. s39–42, 2008.

KIM, H. D.; LEE, S. H.; KIM, Y. K.; OH, J. R.; OHN, Y. H. The effect of cilostazol on electrophysiologic changes in non-proliferative diabetic retinopathy patients. *Doc Ophthalmol*, n.133, p. 49-60, 2016.

KWON, K. J.; LEE, E. J.; KIM, M. K.; KIM, S. Y.; KIM, J. N.; KIM, J. O.; et al. Diabetes augments cognitive dysfunction in chronic cerebral hypoperfusion by

increasing neuronal cell death: implication of cilostazol for diabetes mellitus-induced dementia. *Neurobiol Dis*, n. 73, p. 12e23, 2015.

KWOK, C. S.; SHOAMANESH, A.; COPLEY, H. C.; MYINT, P. K.; LOKE, Y. K.; BENAVENTE, O. R. Efficacy of antiplatelet therapy in secondary prevention following lacunar stroke: pooled analysis of randomized trials. *Stroke*, v. 46, p. 1014-23, 2015.

KUMAR, M.; BHATTACHARYA, V. Cilostazol: a new drug in the treatment intermittent claudication. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, v. 2, p. 181-5, 2007.

LEE, K.; YOO, S. Y.; SUH, J.; PARK, K. H.; PARK, Y.; TANTRY, U. S.; PARK, K.S.; HAN, S. H.; KANG, W. C.; SHIN, D. H.; LEE, C.; CHOI, S. W.; LEE, J. H.; CHO, Y. H.; LEE, N. H.; JEONG, M. H.; AHN, Y.; KUBICA, J.; GURBEL, P. A.; PARK, J. H.; JEONG, Y. H. Efficacy of cilostazol on inhibition of platelet aggregation, inflammation and myonecrosis in acute coronary syndrome patients undergoing percutaneous coronary intervention: The ACCEL-LOADING-ACS (ACCELeRated Inhibition of Platelet Aggregation, Inflammation and Myonecrosis by Adjunctive Cilostazol Loading in Patients With Acute Coronary Syndrome) study. *Int J Cardiol*, v. 190, p. 370 -5, 2015.

LERMAN, L. O.; CHADE, A. R.; SICA, V.; NAPOLI C. Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med*, v. 146, p. 160-173, 2005.

LI, H.; HONG, D. H.; SON, Y. K.; NA, S. H.; JUNG, W. K.; BAE, Y. M.; SEO, E. Y.; KIM, S. J.; CHOI, I. W.; PARK, W. S. Cilostazol induces vasodilation through the activation of Ca(2+)-activated K(+) channels in aortic smooth muscle. *Vascul Pharmacol*, v. 70, p. 15-22, 2015.

LIP, G. Y.; FELMEDEN, D. C.; DWIVEDI, G. Antiplatelet agents and anticoagulants for hypertension. *Cochr Data Syst Rev*, v. 7, p. 12, 2011.

- MACDONNELL, S. M.; KUBO, H.; HARRIS, D. M.; CHEN, X.; BERRETTA, R.; BARBE, M. F.; KOLWICZ, S.; REGER, P. O.; ECKHART, A.; RENNA, B. F.; KOCH, W. J.; HOUSER, S. R.; LIBONATI, J. R. Calcineurin inhibition normalizes beta-adrenergic responsiveness in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 293, p. H3122-9, 2007.
- MALTA, D. C.; BERNAL, R. T.; ANDRADE, S. S. C. A.; SILVA, M. M. A. D.; VELASQUEZ-MELENDZ G. Prevalence of and factors associated with self-reported high blood pressure in Brazilian adults. *Rev Saude Publica*, v. 51(suppl 1), p. 11, 2017.
- MATSUMOTO, T.; KOBAYASHI, T.; KAMATA, K. Phosphodiesterases in the vascular system. *J Smooth Muscle Res*, v. 39, p. 67–86, 2003.
- MIYAMOTO, M.; KOTANI, K.; TANIGUCHI, N. Effect of non-antihypertensive drugs on endothelial function in hypertensive subjects evaluated by flow-mediated vasodilation. *Curr Vasc Pharmacol*, v. 13, p. 121-7, 2015.
- MOK, V.; KIM, J. S. Prevention and management of cerebral small vessel disease. *J Stroke*, v. 17, p. 111-22, 2015.
- MORGADO, M.; CAIRRÃO, E.; SANTOS-SILVA, A. J.; Verde, I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell Mol Life Sci*, v. 69, n. 2, p. 247-66, 2012.
- MORI, H.; MAEDA, A.; WAKABAYASHI, K.; SATO, T.; SASAI, M.; TASHIRO, K.; ISO, Y.; EBATO, M.; SUZUKI, H. The Effect of Cilostazol on Endothelial Function as Assessed by Flow-Mediated Dilation in Patients with Coronary Artery Disease. *J Atheroscler Thromb*, v. 23, 2016.
- MORISHITA, R.; HIGAKI, J.; HAYASHI, S.; YO, Y.; AOKI, M.; NAKAMURA, S.; MORIGUCHI, A.; MATSUSHITA, H.; MATSUMOTO, K.; NAKAMURA, T.; OGIHARA, T. Role of hepatocyte growth factor in endothelial regulation:

prevention of high D-glucose-induced endothelial cell death by prostaglandins and phosphodiesterase type 3 inhibitor. *Diabetologia*, v.6, n. 40, p. 1053-61, 1997.

MORISHITA R. A scientific rationale for the CREST trial results: evidence for the mechanism of action of cilostazol in restenosis. *Atheroscler Suppl*, v. 15, n. 6, p. 41-6, 2005).

NISHIOKA, K.; NISHIDA, M.; ARIYOSHI, M.; JIAN, Z.; SAIKI, S.; HIRANO, M.; NAKAYA, M.; SATO, Y.; KITA, S.; IWAMOTO, T.; HIRANO, K.; INOUE, R.; KUROSE, H. Cilostazol suppresses angiotensin II-induced vasoconstriction via protein kinase A-mediated phosphorylation of the transient receptor potential canonical 6 channel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 31, p. 2278-86, 2011.

OIKAWA, M.; WU, M.; LIM, S.; KNIGHT, W. E.; MILLER, C. L.; CAI, Y.; LU, Y.; BLAXALL, B. C.; TAKEISHI, Y.; ABE, J.; YAN, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A1 protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, v. 64, p. 11-9, 2013.

OYAMA, N.; YAGITA, Y.; KAWAMURA, M.; SUGIYAMA, Y.; TERASAKI, Y.; OMURA, E.; SASAKI, T.; KITAGAWA, K. Cilostazol, not aspirin, reduced ischemic brain injury via endothelial protection in spontaneously hypertensive rats. *Stroke*, v. 42, p. 2571-17, 2011.

PARK, W. S.; JUNG, W. K.; LEE, D. Y.; MOON, C.; YEA, S. S.; PARK, S. G.; SEO, S. K.; PARK, C.; CHOI, Y. H.; KIM, G. Y.; CHOI, J. S.; CHOI, I. W. Cilostazol protects mice against endotoxin shock and attenuates LPS-induced cytokine expression in RAW 264.7 macrophages via MAPK inhibition and NF-kappaB inactivation: not involved in cAMP mechanisms. *Int Immunopharmacol*, n. 10, p. 1077-85, 2010.

PARK, S. Y.; LEE, H. R.; LEE, W. S.; SHIN, H. K.; KIM, H. Y.; HONG, K. W.; KIM, C. D. Cilostazol modulates autophagic degradation of β -amyloid peptide via SIRT1-coupled LKB1/AMPK α signaling in neuronal cells. *PLoS One*, v. 11, p. e0160620, 2016.

- PARNELL E, SMITH BO, PALMER TM, TERRIN A, ZACCOLO M, YARWOOD SJ. Regulation of the inflammatory response of vascular endothelial cells by EPAC1. *Br J Pharmacol*. 2012 May;166(2):434-46.
- POTTER, L. R.; ABBEY-HOSCH. S.; DICKEY, D. M. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate dependent signaling functions. *Endocr Rev*, v. 27, p. 47–72, 2006.
- ROGERS, K. C; FAIRCLOTH, J. M.; FINKS, S. W. Use of cilostazol in percutaneous coronary interventions. *Ann Pharmacother*, v. 46, n. 6, p. 839-50, 2012.
- ROOKE, T. W.; HIRSCH, A. T.; MISRA, S.; et al. American College of Cardiology Foundation; American Heart Association; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions; Society of Interventional Radiology; Society for Vascular Medicine; Society for Vascular Surgery. 2011 ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with peripheral artery disease (updating the 2005 guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society for Vascular Medicine, and Society for Vascular Surgery. *Catheter Cardiovasc Interv*, v. 79, p. 501–31, 2012.
- RUDZINSKI, P.; WEGRZYN, P.; LIS, G. J.; PIATEK, J.; KONSTANTY-KALANDYK, J.; NOSALSKI, R.; MIKOLAJCZYK, T.; JASINSKA, M.; PYKA-FOSCIAK, G.; GUZIK, T.; LITWIN, J. A.; KORBUT, R.; SADOWSKI, J. Vasodilatory effect and endothelial integrity in papaverine- and milrinone-treated human radial arteries. *J Physiol Pharmacol*, v. 64, p. 41-5, 2013.
- RUIZ-VELASCO, V.; ZHONG, J.; HUME, J. R.; KEEF, K. D. Modulation of Ca^{2+} channels by cyclic nucleotide cross activation of opposing protein kinases in rabbit portal vein. *Circ Res*, v. 82, p. 557-65, 1998.

- SANGANALMATH, S. K.; BABICK, A. P.; BARTA, J.; KUMAMOTO, H.; TAKEDA, N.; DHALLA, N. S. Antiplatelet therapy attenuates subcellular remodelling in congestive heart failure. *J Cell Mol Med*, v. 12, p. 1728-38, 2008.
- SAHA, S.; LI, Y.; ANAND-SRIVASTAVA, M. B. Reduced levels of cyclic AMP contribute to the enhanced oxidative stress in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol*, v. 86, n.4, p. 190-98, 2008.
- SCHRÖR, K. The pharmacology of cilostazol. *Diabetes Obes Metab*, v. 4, p. S14-19, 2002.
- SCHUBERT, R.; LEHMANN, G.; SEREBRYAKOV, V. N.; MEWES, H.; HOPP, H. H. cAMP-dependent protein kinase is in an active state in rat small arteries possessing a myogenic tone. *Am J Physiol*, v. 277, p. H1145-55, 1999.
- SHIRAISHI, Y.; KANMURA, Y.; ITOH, T. Effect of cilostazol, a phosphodiesterase type III inhibitor, on histamine-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ and force in middle cerebral artery of the rabbit. *Brit J Pharmacol*, v. 123, p. 869–78. 1998.
- SMITH, C. J.; HUANG, R.; SUN, D.; RICKETTS, S.; HOEGLER, C.; DING, J. Z.; MOGGIO, R. A.; HINTZE, T. H. Development of decompensated dilated cardiomyopathy is associated with decreased gene expression and activity of the milrinone-sensitive cAMP phosphodiesterase PDE3A. *Circulation*, v. 96, p. 3116–23, 1997
- TAIRA, M.; HOCKMAN, S. C.; CALVO, J. C.; TAIRA, M.; BELFRAGE, P.; MANGANIELLO, V. C. Molecular cloning of the rat adipocyte hormone- sensitive cyclic GMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J Biol Chem*, v. 268, p. 18573–9, 1993.
- TAKAGI, T.; HARA, H. Protective effects of cilostazol against hemorrhagic stroke: Current and future perspectives. *J Pharmacol Sci*, v. 131, p.155-61, 2016.

- TAKAGURI, A.; MORIMOTO, M.; IMAI, S. I.; SATOH, K. Cilostazol inhibits interleukin-1-induced ADAM17 expression through cAMP independent signaling in vascular smooth muscle cells. *Cell Biol Int*, v. 40, p. 269-76, 2016.
- TANAKA, T.; ISHIKAWA, T.; HAGIWARA, M.; ONODA, K.; ITOH, H.; HIDAKA, H. Effects of cilostazol, a selective cAMP phosphodiesterase inhibitor on the contraction of vascular smooth muscle. *Pharmacology*, 36, p. 313–20, 1988.
- TOMITA, T.; SHIRASAKI, Y.; TAKIGUCHI, Y.; OZAKI, Y.; HAYASHI, E. Hemodynamic effects on aortic enzyme activities in spontaneously hypertensive rats. *Atherosclerosis*, v. 37, p. 409-22, 1980.
- UCHIYAMA, S.; SAKAI, N.; TOI, S.; EZURA, M.; OKADA, Y.; TAKAGI, M. Final results of cilostazol-aspirin therapy against recurrent stroke with intracranial artery stenosis (CATHARSIS). *Cerebrovasc Dis Extra*, v. 5, p. 1-13, 2015.
- UENO, H.; KOYAMA, H.; MIMA, Y.; FUKUMOTO, S.; TANAKA, S.; SHOJI, T.; EMOTO, M.; SHOJI, T.; NISHIZAWA, Y.; INABA, M. Comparison of the effect of cilostazol with aspirin on circulating endothelial progenitor cells and small-dense LDL cholesterol in diabetic patients with cerebral ischemia: a randomized controlled pilot trial. *J Atheroscler Thromb*, v. 18, p. 883-90, 2011.
- MOK, V.; KIM, J. S. Prevention and management of cerebral small vessel disease. *J Stroke*, v. 17, p. 111–22, 2015.
- WADA, T.; ONOGI, Y.; KIMURA, Y.; NAKANO, T.; FUSANOBORI, H.; ISHII, Y.; SASAHARA, M.; TSUNEKI, H.; SASAOKA, T. Cilostazol ameliorates systemic insulin resistance in diabetic db/db mice by suppressing chronic inflammation in adipose tissue via modulation of both adipocyte and macrophage functions. *Eur J Pharmacol*, v. 707, p. 120-9, 2013.

- WALLIS, R. M.; CORBIN, J. D.; FRANCIS, S. H.; ELLIS, P. Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. *Am J Cardiol*, v. 83, p. 3C–12C, 1999.
- WERSTIUK ES, LEE RM. Vascular beta-adrenoceptor function in hypertension and in ageing. *Can J Physiol Pharmacol*, v. 78, n.6, p. :433-52.
- WEXLER, B. C.; IAMS, S. G.; JUDD, J. T. Arterial lesions in repeatedly bred spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*, v. 38, p. 494-501, 1976.
- WU, R.; LAPLANTE, M. A.; DE CHAMPLAIN, J. Cyclooxygenase-2 inhibitors attenuate angiotensin II-induced oxidative stress, hypertension, and cardiac hypertrophy in rats. *Hypertension*, v. 45, p. 1139-44. 2005.
- WU, R.; LAMONTAGNE, D.; DE CHAMPLAIN, J. Antioxidative properties of acetylsalicylic acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation*, v. 105, p. 387-92, 2002.
- YIN, H.; PICKERING, J. G. Cellular senescence and vascular disease: novel routes to better understanding and therapy. *Can J Cardiol*, v. 32, p. 612-23, 2016.
- ZHAO, Z.; WANG, Y.; CHEN, Y.; WANG, X.; LI, J.; YUAN, M.; LIU, T.; LI, G. Cilostazol prevents atrial structural remodeling through the MEK/ERK pathway in a canine model of atrial tachycardia. *Cardiology*, v. 135, p. 240-8, 2016.

5. ARTIGO A SER SUBMETIDO AO *EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY*

PDE3 inhibitor cilostazol improves vascular function of spontaneously hypertensive rats through a nitric oxide-dependent mechanism.

Fernanda Elizabethe Ramos-Alves; Juliana Santos-Rocha, Jean Pereira Almeida-Júnior, Geórgia Andrade Lima-Leal; Hicla Stefany Moreira, Glória Pinto Duarte and Fabiano Elias Xavier.

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

Running title: Cilostazol improve vascular function in SHR

Corresponding author: Fabiano E. Xavier, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rêgo, Cidade Universitária, 50670-901, Recife Brazil. E-mail: fabianoxavier@ufpe.br, fabiano.exavier@gmail.com

Abstract

Phosphodiesterase (PDE) inhibitors have been suggested as promising therapeutic tools in some cardiovascular diseases. Cilostazol is a selective PDE3 inhibitor that besides presenting antiplatelet effects, has antioxidant, antiproliferative, anti-inflammatory and vasodilator activity. The present study aimed to evaluate the effect of chronic treatment with cilostazol on blood pressure (BP) and the vascular function of spontaneously hypertensive animals (SHR). Four-month-old SHR were divided into two experimental groups, control (SHR-CON) and cilostazol-treated rats (SHR-Cilo) (100 mg/kg/day, for 8 weeks). BP was measured in awake rats from a catheter inserted in the femoral artery. Vascular function was evaluated in mesenteric arteries of resistance (MRA), using the method described by Mulvany & Halpern (1977). The nitric oxide (NO) production and superoxide anions (O_2^-) generation were measured through DAF-2- and DHE-emitted fluorescence, respectively. PDE3 and eNOS expressions were measured by Western blot. BP was unaltered by cilostazol treatment. However, SHR-Cilo showed increased endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in MRA. Preincubation of arteries with apamin (1 μ M), TRAM-34 (1 μ M) or L-NAME (100 μ M) inhibited relaxation to a greater extent in MRA from SHR-Cilo. Relaxation to isoproterenol was greater in SHR-Cilo, but this difference was blocked in the presence of L-NAME. Relaxation to sodium nitroprusside was also greater in MRA of SHR-Cilo. Contractile responses to noradrenaline were similar between SHR-CON and SHR-Cilo, but the potentiation of this response by L-NAME was greater in SHR-Cilo MRA. The vasodilatory response to forskolin was similar in both groups. Although the expression of PDE3A and eNOS showed no differences between groups, the NO detection production was greater in SHR-Cilo arteries. On

the other hand, the O_2^- generation was similar between SHR-CON and SHR-Cilo. Taken together these data suggest that cilostazol treatment reverses endothelial function in SHR by a NO/cGMP-dependent mechanism and fortifies the existence of a crosstalk between AMPc and GMPc. In conclusion, this actions of cilostazol may, in part, contribute to the beneficial effect for the prevention/treatment of vascular disorders that occur in hypertension.

Key words: hypertension; endothelial dysfunction; phosphodiesterase; cyclic nucleotides; cilostazol.

Introduction

Spontaneously hypertensive rats (SHR) are the animal model most used when you want to investigate the mechanisms involved in essential hypertension in humans (Ahn *et al.* 2004). In this model of hypertension, endothelial dysfunction is attributed to the increase in contractile factors and reduction factors in which there is an excessive production of reactive oxygen species and reduced availability of NO (nitric oxide), and minor acting EDHFs (Feletou *et al.* 2009). Furthermore, impaired adrenoceptor function via protein have been reported in SHR either characterized by an increase in vasoconstrictor response, either by difficulty in relaxing (Macdonnell *et al.* 2007), and can relate to the deleterious effects of hypertension and cell damage to irregular levels of cAMP.

The cAMP plays a key role in the proper functioning of both smooth muscle cells and in endothelial. After activation of adenylyl cyclase, cAMP formed binds to the regulatory subunit of PKA, inducing increased calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum as well as reducing the calcium influx (Ferrero *et al.* 2008). There is also production EDHF, resulting in hyperpolarization, which involves SKCa and IKCa channels in these cells and that spreads to the smooth muscle layer via joints myoendothelial (EDWARDS *et al.* 2010). It is known that there is a crosstalk between cAMP and cGMP, and both are capable of modulating the activity of ion channels, and therefore the vasorelaxation. Thus, the balance between production and degradation of both the cAMP as cGMP is of greater importance in maintaining vascular function, and a group of enzymes called phosphodiesterases (PDEs) act metabolizing these nucleotides.

Recently, inhibitors of PDEs have been used in the prevention and treatment of atherothrombotic events. The cilostazol (6- (4- (1-cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl) butoxy) -3,4-dihydro-2 (1H) -quinolinone) is a reversible inhibitor of PDE3, act as antithrombotic and antiplatelet platelet with vasodilator properties (KAMBAYASHI et al. 2003) is indicated for the treatment of intermittent claudication who, by itself, is an important systemic atherosclerosis marker (BEDENIS et al. 2015) and stroke (NIL et al. 2016).

Several studies have shown the effect of cilostazol on the production vasorelaxing factors derived from the endothelium. Although most studies emphasize their effect on NO production, since sustained levels of cGMP and cAMP caused by inhibition of PDE3 imply higher NO synthesis, there are other pathways involved in vascular protection promoted by cilostazol. Nakamura et al. (2005) studied the effect of this drug in relaxing pre-contracted cerebral arterioles thromboxane A₂ or serotonin, and found that there was a potentiation of the relaxing effect of adenosine. Recently, Hashimoto et al (2015) demonstrated that cilostazol works by stimulating the synthesis of PGI₂, a vasodilator derived from the metabolism of cyclooxygenase, through the signaling cascade of Epac-Rap1 in human endothelial cells. CHAO et al. 2016 proven in clinical trials that treatment with cilostazol increases the mobilization of endothelial progenitor cells in individuals at high risk for cardiovascular disease such as hypertension and atherosclerosis, a fact that was closely related to a function of improved vascular these individuals.

The vasodilatory action cilostazol may be dependent PKA to reducing the concentration of intracellular Ca²⁺ and to inactivating vasoconstriction (NISHIOKA et al., 2011). Recently, Li et al. (2015) found that the vasodilation cilostazol-induced

occurred via activation of K^+ channels for calcium-dependent (BK (Ca)). In addition, there is one more mechanism of action for this compound, a fact that differentiates it from other PDE3 inhibitors and justifies its use in ischemic events. This drug in platelet and smooth muscle cells, inhibits the uptake of adenosine into the extracellular environment, and this leads through the actions of adenosine A_1 and A_2 receptors. Consequently there is greater inhibition of PDE3 and immediate increase in AMPc (Liu *et al.* 2001).

Taken together, these actions can make cilostazol an important alternative for the prevention/disorders involving endothelial dysfunction. Since in essential hypertension there is a reduced availability of nitric oxide and increased production of free radicals, the aim of our study was to investigate the effect of chronic treatment with cilostazol on vascular function (contractile and relaxation mechanisms) of SHR.

Methods

Experimental animals Male SHR rats Were Obtained from colonies maintained in the Animal quarters of the Federal University of Pernambuco (UFPE). Rats Were housed at a constant room temperature, humidity and light cycle (12 h light / dark) and had free access to tap water and standard rat chow ad libitum. This study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of UFPE (approval reference number: 23076.043251 / 2012-42), and Conforms to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (NIH publication 85- 23, revised 1996).

16-month-old rats were divided in two groups: cilostazol-treated (100 mg/kg/day) and untreated groups. Cilostazol was administered by gavage during two months. Untreated group received only distilled water (vehicle). After the treatment period, both groups were subjected to experiments of blood pressure measurements and vascular reactivity studies

Arterial BP measurement

Rats were anaesthetized with a mixture of ketamine, xylazine and acetopromazin (64.9, 3.2 and 0.78 mg·kg⁻¹, respectively, i.p.). The right carotid artery was cannulated with a polyethylene catheter (PE-50) that was exteriorized in the mid scapular region. Adequacy of anaesthesia was assessed by monitoring withdrawal reflexes. After 24 h, arterial pressure was measured in conscious, freely moving rats. The arterial cannula was connected to a transducer and pressure

signals were recorded for a 60 min period using an interface and software for computer data acquisition (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, New South Wales, Australia).

Vessel preparation

Rats were anaesthetized with ketamine, xylazine and acetopromazin mixture (64.9, 3.2 and 0.78 mg·kg⁻¹, respectively, i.p.) and killed by exsanguination. The mesenteric vascular bed was removed and placed in cold (4°C) Krebs-Henseleit solution (KHS; in mM: 115 NaCl, 2.5 CaCl₂, 4.6 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2, MgSO₄·7H₂O, 25 NaHCO₃, 11.1 glucose and 0.03 EDTA). For reactivity experiments, the third-order branch of the mesenteric arcade was dissected and cut into segments of approximately 2 mm in length. Segments of mesenteric resistance arteries were mounted in a small vessel chamber myograph (Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark) to measure isometric tension according to the method described by Mulvany and Halpern (1977).

Experimental protocols

After a 15-min equilibration period in oxygenated KHS at 37°C and pH 7.4, arterial segments were stretched to their optimal lumen diameter for active tension development. Optimal lumen diameter was determined based on the internal circumference/wall tension ratio of the segments by setting the internal circumference, L₀, to 90% of what the vessels would have if they were exposed to a passive tension equivalent to that produced by a transmural pressure of 100 mmHg.

Optimal lumen diameter was determined using specific software for normalization of resistance arteries (DMT Normalization Module; ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia). Segments were washed with KHS and left to equilibrate for 30 min. Vessel contractility was then tested by an initial exposure to a high-K⁺ (120 mmol/L) solution. After washout, segments of mesenteric resistance arteries were contracted with concentration of noradrenaline inducing 50-70% of the contraction induced by KCl, and then acetylcholine (1 μ mol/L) was added to assess the integrity of the endothelium. After 60 min, cumulative concentration–response curves for noradrenaline (0.1 nmol/L to 10 μ mol/L), isoproterenol (1 nmol/L to 10 μ mol/L), acetylcholine (1 nmol/L to 10 μ mol/L), sodium nitroprusside (1 nmol/L to 10 μ mol/L) or forskolin (1 nmol/L to 10 μ mol/L) were generated.

Additionally, concentration–response curves to acetylcholine and/or noradrenaline were performed in presence of the nonselective nitric oxide synthase inhibitor N-nitro-larginine methyl ester (L-NAME, 100 μ M), the intermediate-conductance KCa channel blocker TRAM-34 (1 μ M) plus the small-conductance KCa channel blocker apamin (1 μ M). All drugs were added 30 min before generating the concentration-response curve.

Reactive oxygen species and NO measurement

The oxidative fluorescent dye hydroethidine was used to evaluate ROS production in situ, as previously described (Wenceslau et al., 2014). Briefly, aortic segments frozen at -80°C . Transverse sections (10 μ m) of frozen aorta were collected on glass slides and equilibrated for 10 min in phosphate buffer in a light-protected humidified chamber at 37°C . Fresh buffer containing hydroethidine (1

mmol/L) was topically applied to each tissue section and a coverslip placed on top. The slides were incubated in a light-protected humidified chamber at 37 °C for 30 min. The negative control sections received the same volume of phosphate buffer but in the absence of hydroethidine. The arteries were incubated with diacetate diaminofluoresceína (DAF- 2DA - diacetate diaminodifluorofluoresceína) a specific fluorescent probe for NO and incubation times of 30 and 60 minutes. The fluorescence intensity emitted by the DAF-2T was determined.

After this period, the slides were viewed using an optical microscope equipped with a rhodamine filter and a camera, using a 20X objective. Three different areas of each section were analyzed for the presence of ROS and NO by examining the regions marked with red fluorescence from the oxidation products of dihydroethidium (DHE) and of DAF (green). The images were analyzed using the Image J software (National Institute of Health, USA).

Western blot analysis of PDE3A and eNOS

Mesenteric resistance arteries from SHR and SHR-Cilo rats were homogenized; proteins were electrophoretically separated (30 mg per lane) and transferred to polyvinyl difluoride membranes (GE Healthcare do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brazil). Membranes were incubated with antibodies (ABCAM, BD Biosciences and Sigma, respectively) against PDE3A (1:250 dilution), eNOS (1:500 dilution) or α -actin (1:3000 dilution) proteins and individual horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (GE Healthcare do Brasil Ltda) in blocking buffer. Immunoreactive proteins were detected by chemiluminescence with ECL Plus (GE Healthcare do Brasil Ltda) and subjected to autoradiography (Hyperfilm ECL, GE

Healthcare do Brasil Ltda). Signals on the immunoblot were quantified using a computer programme (NIH Image V1.56, Bethesda, MD, USA).

Chemical compounds

Drugs used were phenylephrine hydrochloride, acetylcholine, sodium nitroprusside, indomethacin, L-NAME, noradrenaline, isoproterenol and forskolin (Sigma, St. Louis, MO, USA), ODQ (Tocris® , USA). For experiments in vitro stock solutions (10 mmol/L) of drugs were made in distilled water, except indomethacin and apamina that were dissolved in ethanol. These solutions were kept at -20°C, and appropriate dilutions were made on the day of the experiment.

Statistical analyses

Relaxation responses to Ach, and sodium nitroprusside are expressed as a percentage of the maximum contractile response induced by noradrenaline. Relaxation responses to isoproterenol are expressed as a contractile response induced by phenylephrine. Contractile responses are expressed as a percentage of the maximum response produced by KCl. All values are expressed as means SEM of the number of animals used in each experiment. Results were analysed using Student's t-test or by one-way or two-way ANOVA for comparison between groups. When ANOVA showed a significant treatment effect, Bonferroni's post hoc test was used to compare individual means. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Results

Blood pressure

In this study there were no significant differences in systolic or diastolic blood pressures and heart rate between SHR and SHR-Cilo. (figure 1).

Effects of chronic cilostazol treatment on endothelium-dependent and independent relaxation and contraction

Chronic cilostazol administration produced a marked increase in the acetylcholine- (Figure 2) and sodium nitroprusside-induced relaxation (Figure 2B) in MRA from SHR-Cilo. On the other hand, the contractile response to noradrenaline was similar in both cilostazol-treated and untreated groups (Figure 2C).

Pre-treatment of arteries with L-NAME similarly inhibited the relaxation to acetylcholine in both cilostazol-treated and untreated groups (Figure 3). However, the effect of this drug was greater in arteries from cilostazol-treated group. To investigate the component of NO on the acetylcholine-induced relaxation, we performed the concentration-response curve to acetylcholine in presence of L-NAME. This NO type-relaxation was not different between cilostazol-treated and untreated groups (figure 3A).

Preincubation with apamin, TRAM-34 and apamin plus TRAM-34 attenuated acetylcholine-induced relaxation in arteries from control and cilostazol-treated rats

(Figure 3B). However, despite blocking the animal-treateds arteries had greater relaxing.

To confirm the role of NO in this effect, the contraction to norepinephrine was conducted in the presence of L-NAME. The response in SHR-Cilo animals was of greater magnitude (Figure 4).

In another set of experiments, we evaluate the relaxing responses to β -adrenergic agonist isoproterenol. The relaxing response was greater in treated animals (Figure 5A). To test the role of endothelium and endothelial nitric oxide, the curves were conducted in arteries without endothelium and after pre-incubation with LNAME. There were no significant differences between the groups (Figure 5B and 5C). With regard to the activity of PKA were no differences between the forskolin curves between the groups (figure 6).

Florescence

Incubation with DAF- showed change in fluorescence intensity significantly in both groups but it was higher in the SHR-Cilo (Figure 7). However, an increase in ethidium bromide fluorescence, not reflect differences between groups control and treated (Figure 8).

eNOS and PDE3 protein expression

Western blot analysis showed a basal protein expression of PDE3A and eNOS in mesenteric arteries from SHR and SHR-Cilo. This expression was similar in all groups (Figure 9).

Discussion

In the present study, we provided evidences that chronic oral administration of cilostazol increased the •NO/ cGMP/cAMP pathway and restored endothelial function of resistance arteries from SHR. Our results also revealed a functional contribution of on NO-mediated vasodilation in cilostazol-treated. No effect on blood pressure was observed, but these actions on vascular function may be associated with a slight reduction in total peripheral resistance. This fact is expected because, although cilostazol to have vasodilator action, it is not classified as an antihypertensive. In western blotting results, isoform-PDE3A and eNOS expression were not different between the groups, demonstrating that the treatment does not affect the gene expression or intracellular pool.

Hypertension is associated with changes in the structure and function of blood vessels leading to cardiovascular disorders. These alterations are multifactorial and include, among others, changes in endothelial function. This process favors platelet aggregation, thrombosis, increased vasoconstriction and inflammation leading to atherosclerosis, which is considered an important event in the development of various vasculopathies (Gkaliagkousi et al. 2015). Evidence exists that endothelium-dependent vasorelaxation is impaired in arteries from aging human and animals with hypertension (Werstiuk & Lee, 2000; Yin & Pickering, 2016). In the present study, the dilation response was increased in resistance arteries treated animals. It suggests that vascular function can be restored with vasodilator therapy.

In recent years, phosphodiesterase 3 (PDE-3) inhibitors are being widely used for producing broad vasodilatory effects. PDE-3 inhibitors, in particular cilostazol, have antithrombotic, antiplatelet (Kambayashi *et al.* 2003), by elevating intracellular cAMP and cGMP levels. The beneficial vascular effects of cilostazol have been quite studied in various disorders that course with endothelial dysfunction and restenosis prevention in humans (ROGERS *et al.* 2012; ROGERS *et al.* 2015). The results obtained here showed that oral administration of cilostazol for 8 weeks was able to improve the endothelium-dependent relaxation of mesenteric resistance arteries. Consistent with our results, Oyama *et al.* (2011) demonstrated significantly improved cerebral blood flow by maintaining endothelial function in SHR. This effect could help us to explain how cilostazol restore the balance of vascular function.

The present study also measured dilation responses to the •NO donor, sodium nitroprusside, which was increased in SHR-Cilo resistance arteries compared with SHR resistance arteries. Taken together these results indicates that the improve relaxation in the treated rats is due, at least in part, to augmentation vascular smooth muscle sensitivity to •NO and his effect may be due increment cGMP levels. Cilostazol has vasodilator properties *in vitro*, and this effect is associated with greater activation of eNOS and increased levels of cGMP in smooth muscle cells (Chao *et al.* 2012). Therefore, the chronically inhibit PDE3 vascular probably promoted to a sustained increase in these second messengers and that is implicated in higher vasodilator response of treated animals.

Previous studies show that endothelial dysfunction is associated to an increase in the vasoconstrictor response (Xavier *et al.* 2011; Travaglia *et al.* 2016). In

our experiments, vasoconstriction produced by noradrenaline remained unmodified in SHR-Cilo compared to controls.

Alterations of endothelial function present in SHR may result from reduced NO synthesis due decreased endothelial NO synthase (eNOS) activity or reduction of EDHF function. In order to evaluate the involvement of endothelial NO on effect of cilostazol, we preincubated the arteries with L-NAME. In presence of this inhibitor, the acetylcholine-induced relaxation was practically abolished in both cilostazol-treated and untreated rats. However the effect of L-NAME in arteries SHR-Cilo was greater when compared to SHR control. Furthermore noradrenaline curve showed greater magnitude in the presence of L-NAME. Indeed, incubation with DAF-2DA demonstrated a significant shift in fluorescence intensity in arteries treated rats, confirming greater availability of endothelial-derived NO, although the measure in situ free radical has not shown difference. This suggest that effect of cilostazol involves an increase in NO-dependent pathway. Consistent with our results, Tanano et al. (2013) demonstrated that cilostazol enhance vasodilation via NO and potassium channels.

In rat mesenteric resistance arteries, relaxation to acetylcholine is also mediated by K_{Ca} channel. In the hypertension, the activity of these channels are impaired. Thus, to investigate the activation of K_{Ca} channels on effects of cilostazol in SHR arteries, we assessed the acetylcholine-induced relaxation in presence of apamin (a small conductance calcium-activated K^+ -channel, SK_{Ca} , blocker), TRAM-34 (an intermediate conductance calcium-activated K^+ -channel, IK_{Ca} , blocker) and apamin plus TRAM-34. The response in both groups was reduced, but in animals treated relaxation was higher than in controls. This suggests that Cilostazol treatment

no seems to restore the participation of these channels and reinforced the NO pathway. The exact mechanism involved in this cilostazol effect is unknown, but could involve increased cGMP levels, CNG and PKG-dependent phosphorylation of these K_{Ca} channels. In contrast to what we find, Li et al. (2015) showed that the cilostazol induced vasodilation *in vitro* by activation of K^+ channels in vascular smooth rabbits.

A *crosstalk* between cAMP and cGMP is shown, and both are capable of modulating the activity of ion channels and, therefore, vascular tone. Ruiz-Velasco et al. (1998) have shown that cAMP and cGMP stimulate relaxation dependent pathway through phosphorylation of the PKG, as Schubert et al. (1999) prove the involvement of PKA in maintaining of the tonus myogenic resistance arteries. However, recent studies suggest the role of cAMP in other ways besides the activation of PKA. Proof of this is that in our results, cilostazol did not potentiate the relaxing to the activator of PKA. Channels for nucleotides (CNG) and hyperpolarization involving SK_{Ca} and IK_{Ca} channels has been identified as vasorelaxation promoters (Zhang *et al.* 2002; Edwards *et al.* 2010). But in our results of channel activity for potassium has not changed, therefore suggesting the involvement of other lines connecting NO and nucleotides.

It is known that in essential hypertension, there is impaired beta-adrenergic relaxation and this situation would be closely related to the increase in total vascular resistance (Gui *et al.* 2016). Our isoproterenol result showed greater relaxation in SHR-Cilo. The greatest effect vasodilator isoproterenol in treated rats is attributable to the fact that the cilostazol seems modulate relaxation mediated by beta-adrenergic receptor. The activation of beta-adrenergic receptors culminates in adenylyl cyclase/cAMP intensification, resulting in vasodilation. When compared the

relaxation-curves, were greater relaxation in treated-animals arteries. Therefore intracellular increase of cAMP caused by cilostazol, could be implicated in this largest magnitude vasodilator response to isoproterenol. It is interesting to note that this difference disappears after endothelium-remotion and after eNOS-blocking, suggesting the interdependence between cAMP/cGMP/NO via. Many studies demonstrated that vascular endothelial cells might mediate beta-adrenergic vasorelaxation by activating eNOS (Davel *et al.* 2006; Davel *et al.* 2015). Despite treatment with cilostazol did not enhance the expression of eNOS, we can relate the increase of the relaxation adrenergic Involvement of the NO/cGMP pathway.

These findings suggest the chronic inhibition of PDE3, with cilostazol, reverses endothelial function in SHR by a NO/cGMP-dependent mechanism and fortifies the existence of a crosstalk between AMPc and GMPc. Thereby, there is an increase in endothelial NO release in the vessels. In conclusion, this actions of cilostazol may, in part, contribute to the beneficial effect for the prevention/treatment of vascular disorders that occur in hypertension.

References

AHN J, VARAGIC J, SLAMA M, SUSIC D, FROHLICH ED. Cardiac structural and functional responses to salt loading in SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 287(2):H767-72, 2004.

BEDENIS R, STEWART M, CLEANTHIS M, ROBLESS P, MIKHAILIDIS DP, STANSBY G. Cilostazol for intermittent claudication. *Cochrane Database Syst Rev*. 31;10:CD003748, 2014.

CAO P, ITO O, GUO Q, ITO D, MUROYA Y, RONG R, MORI T, ITO S, KOHZUKI M. Endogenous hydrogen peroxide up-regulates the expression of nitric oxide synthase in the kidney of SHR. *J Hypertens*. 29(6):1167-74, 2011.

CHAO TH, TSENG SY, LI YH, LIU PY, CHO CL, SHI GY, WU HL, CHEN JH. A novel vasculo-angiogenic effect of cilostazol mediated by cross-talk between multiple signalling pathways including the ERK/p38 MAPK signalling transduction cascade. *Clin Sci (Lond)*, v. 123, p. 147–59, 2012.

DAVEL AP, KAWAMOTO EM, SCAVONE C, VASSALLO DV, ROSSONI LV. Changes in vascular reactivity following administration of isoproterenol for 1 week: a role for endothelial modulation. *Br J Pharmacol*, v. 148, 629-33, 2006.

DAVEL AP, VICTORIO JA, DELBIN MA, FUKUDA LE, ROSSONI LV. Enhanced endothelium-dependent relaxation of rat pulmonary artery following β -

adrenergic overstimulation: involvement of the NO/cGMP/VASP pathway. *Life Sci*, v.15, 125:49-56, 2015.

EDWARDS G, FÉLÉTOU M, WESTON AH. Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. *Pflugers Arch*. 459(6):863-79, 2010.

FÉLÉTOU M, VANHOUTTE PM. EDHF: an update. *Clin Sci (Lond)*. 117(4):139-55, 2009.

FÉLÉTOU M, VERBEUREN TJ, VANHOUTTE, PM. Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors. *Br J Pharmacol*. 2009

FERRERO P, SAID M, SÁNCHEZ G, VITTONI L, VALVERDE C, DONOSO P, MATTIAZZI A, MUNDIÑA-WEILENMANN C. Ca²⁺/calmodulin kinase II increases ryanodine binding and Ca²⁺-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release kinetics during beta-adrenergic stimulation. *J Mol Cell Cardiol*. 43(3):281-91, 2007.

GKALIAGKOUSI E, GAVRIILAKI E, DOUMA S. Antiplatelet treatment in essential hypertension: where do we stand? *Curr Hypertens Rep*, v. 17, p. 536, 2015.

GLUAIS, M. LONCHAMPT, J, MORROW, P, VANHOUTTE, AND M. FELETOU, "Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin," *British Journal of Pharmacology*, vol. 146, no. 6, pp. 834–845, 2005.

GUI YJ, LIAO CX, LIU Q, GUO Y, XU DY. RKIP corrects impaired beta (2)-adrenergic receptor vasodilatation in hypertension by downregulation of GRK2. *Int J Cardiol.* 15;207:359-60, 2016.

HASHIMOTO A, TANAKA M, TAKEDA S, ITO H, NAGANO K. Cilostazol induces PGI₂ production via activation of the downstream Epac-1/Rap1 signaling cascade to increase intracellular calcium by PLC ϵ and to activate p44/42 MAPK in human aortic endothelial cells. *PLoS One*, v. 10, p. e0132835, 2015.

JIANG J, ZHENG JP, LI Y, GAN Z, JIANG Y, HUANG D, LI H, LIU Z, KE Y. Differential contribution of endothelium-derived relaxing factors to vascular reactivity in conduit and resistance arteries from normotensive and hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens.* 9:1-6, 2016.

KAMBAYASHI J, LIU Y, SUN B, SHAKUR Y, YOSHITAKE M, CZERWIEC F. Cilostazol as a unique antithrombotic agent. *Curr Pharm Des.*9(28):2289-302, 2003.

KURTOGLU T, BASOGLU H, OZKISACIK EA, CETIN NK, TATAROGLU C, YENISEY C, DISCIGIL B. Effects of cilostazol on oxidative stress, systemic cytokine release, and spinal cord injury in a rat model of transient aortic occlusion. *Ann Vasc Surg.* Feb;28(2):479-8, 2014.

MACDONNELL SM, KUBO H, HARRIS DM, CHEN X, BERRETTA R, BARBE MF, KOLWICZ S, REGER PO, ECKHART A, RENNA BF, KOCH WJ, HOUSER SR, LIBONATI JR. Calcineurin inhibition normalizes beta-adrenergic responsiveness in

the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293(5):H3122-9, 2007.

LI H, HONG DH, SON YK, NA SH, JUNG WK, BAE YM, SEO EY, KIM SJ, CHOI IW, PARK WS. Cilostazol induces vasodilation through the activation of Ca^{2+} -activated K^{+} channels in aortic smooth muscle. *Vascul Pharmacol*, v. 70, p. 15-22, 2015.

LIU, Y, SHAKUR Y, KAMBAYASHI J. Cilostazol (pletal): a dual inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 3 and adenosine uptake. *Cardiovasc Drug Rev*, v. 19, p. 369-86, 2001.

MORISHITA R. A scientific rationale for the CREST trial results: evidence for the mechanism of action of cilostazol in restenosis. *Atheroscler Suppl*, v. 15, n. 6, p. 41-6, 2005.

MULVANY M J; AALKJAE C. Structure and function of small arteries. *Physiol*, review, n. 70, p. 921-60, 1990.

NAKAMURA K, IKOMI F, OHHASHI T. Cilostazol, an inhibitor of type 3 phosphodiesterase, produces endothelium-independent vasodilation in pressurized rabbit cerebral penetrating arterioles. *J Vasc Res.*43(1):86-94, 2005.

NIU PP, GUO ZN, JIN H, XING YQ, YANG Y. Antiplatelet regimens in the long-term secondary prevention of transient ischaemic attack and ischaemic stroke: an updated network meta-analysis. *BMJ Open.* 17;6(3):e009013, 2016.

NISHIOKA K, NISHIDA M ,ARIYOSHI M, JIAN Z, SAIKI S, HIRANO M, NAKAYA M, SATO Y, KITA S, IWAMOTO T, HIRANO K, INOUE R, KUROSE H. Cilostazol suppresses angiotensin II-induced vasoconstriction via protein kinase A-mediated phosphorylation of the transient receptor potential canonical 6 channel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 31, p. 2278-86, 2011.

OYAMA N, YAGITA Y, KAWAMURA M, SUGYIAMA Y, TERASAKI Y, OMURA E, SASAKI T, KITAGAWA K. Cilostazol, not aspirin, reduced ischemic brain injury via endothelial protection in spontaneously hypertensive rats. *Stroke*, v. 42, p. 2571-17, 2011.

ROGERS KC, FAIRCLOTH J, FINKS SW. Use of cilostazol in percutaneous coronary interventions. *Ann Pharmacother*, v. 46, n. 6, p. 839-50, 2012.

ROGERS KC, OLIPHANT CS, FINKS SW. Clinical efficacy and safety of cilostazol: a critical review of the literature. *Drugs*, v. 75, n.4, p. 377-95, 2015.

SCHUBERT R, LEHMANN G, SEREBRYAKOV VN, MEWES H, HOPP HH. cAMP-dependent protein kinase is in an active state in rat small arteries possessing a myogenic tone. *Am J Physiol*, v. 277, p. H1145-55, 1999.

TANANO I, NAGAOKA T, OMAE T, ISHIBAZAWA A, KAMIYA T, ONO S, YOSHIDA A. Dilation of porcine retinal arterioles to cilostazol: roles of eNOS phosphorylation via cAMP/protein kinase A and AMP-activated protein kinase and potassium channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 19;54(2):1443-9, 2013.

TRAVAGLIA TC, BERGER RC, LUZ MB, FURIERI LB, RIBEIRO JR, VASSALLO DV, MILL JG, STEFANON I, VASSALLO PF. Low-salt diet increases NO bioavailability and COX-2 vasoconstrictor prostanoid production in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 15;145:66-73, 2016.

RUIZ-VELASCO, V.; ZHONG, J.; HUME, J. R.; KEEF, K. D. Modulation of Ca^{2+} channels by cyclic nucleotide cross activation of opposing protein kinases in rabbit portal vein. *Circ Res*, v. 82, p. 557-65, 1998.

WERSTIUK ES, LEE RM. Vascular beta-adrenoceptor function in hypertension and in ageing. *Can J Physiol Pharmacol*, v. 78, n.6, p. :433-52.

WORD HEALTH ORGANIZATION. A global brief on hypertension. 2013

XAVIER FE, BLANCO-RIVERO J, AVENDAÑO MS, SASTRE E, YELA R, VELAZQUEZ K, SALAICES M, BALFAGON G. Aldosterone alters the participation of endothelial factors in noradrenaline vasoconstriction differently in resistance arteries from normotensive and hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 654:280-8, 2011.

YIN H, PICKERING JG. Cellular senescence and vascular disease: novel routes to better understanding and therapy. *Can J Cardiol*, v. 32, p. 612-23, 2016.

ZHANG J, XIA SL, BLOCK ER, PATEL JM. NO upregulation of a cyclic nucleotide-gated channel contributes to calcium elevation in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002.

Legends for figures

Figure 1. Effect of cilostazol treatment on blood pressure levels in the SHR. SBP (A), DBP (B) and HR (C) were same in both groups, SHR and SHR-Cilo. Results are expressed as means $\pm$ SEM, ANOVA (two-way): $P > 0.05$, $N = 6$.

Figure 2. Endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine (A), sodium nitroprussiate (B) and concentration-dependent vasoconstriction to noradrenaline (C) in mesenteric resistance arteries (MRA) from SHR and SHR-Cilo. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. $N = 6-8$ rats in each group.

Figure 3. Effect of preincubation with L-NAME (A) and apamin plus TRAM-34 (B) on the concentration-dependent relaxation to acetylcholine in mesenteric resistance arteries (MRA) from SHR and SHR-Cilo. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. $N = 6-8$ rats in each group.

Figure 4. Effect of preincubation with apamin (A), TRAM-34 (B) and apamin plus TRAM-34 (C) on the concentration-dependent relaxation to acetylcholine in mesenteric resistance arteries (MRA) from SHR and SHR-Cilo. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. $N = 6-8$ rats in each group.

Figure 5. Effect of preincubation with L-NAME on the concentration-dependent vasoconstriction to noradrenaline in mesenteric resistance arteries (MRA) from SHR (A) and SHR-Cilo (B). Results are expressed as mean $\pm$ SEM. $N = 6-8$ rats in each group.

Figure 6. Cumulative concentration-relaxation curves for isoproterenol (A), effect of endothelium-desnudation (B) and preincubation with L-NAME (C) on the concentration-dependent relaxation to isoproterenol in mesenteric resistance arteries (MRA) from SHR and SHR-Cilo. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. N=6-8 rats in each group.

Figure 7. Fluorescent to NO production *in situ* in mesenteric resistance arteries (MRA) from SHR and SHR-Cilo. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. N=6-8 rats in each group.

Figure 8. Cumulative concentration-relaxation curves for forskolin in mesenteric resistance arteries (MRA) from SHR and SHR-Cilo. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. N=6-8 rats in each group.

Figure 9. Fluorescent to ROS production *in situ* in mesenteric resistance arteries (MRA) from SHR and SHR-Cilo. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. N=6-8 rats in each group.

Figure 10. PDE3A and eNOS Expression in mesenteric resistance arteries (MRA) from SHR and SHR-Cilo. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. N=6-8 rats in each group.

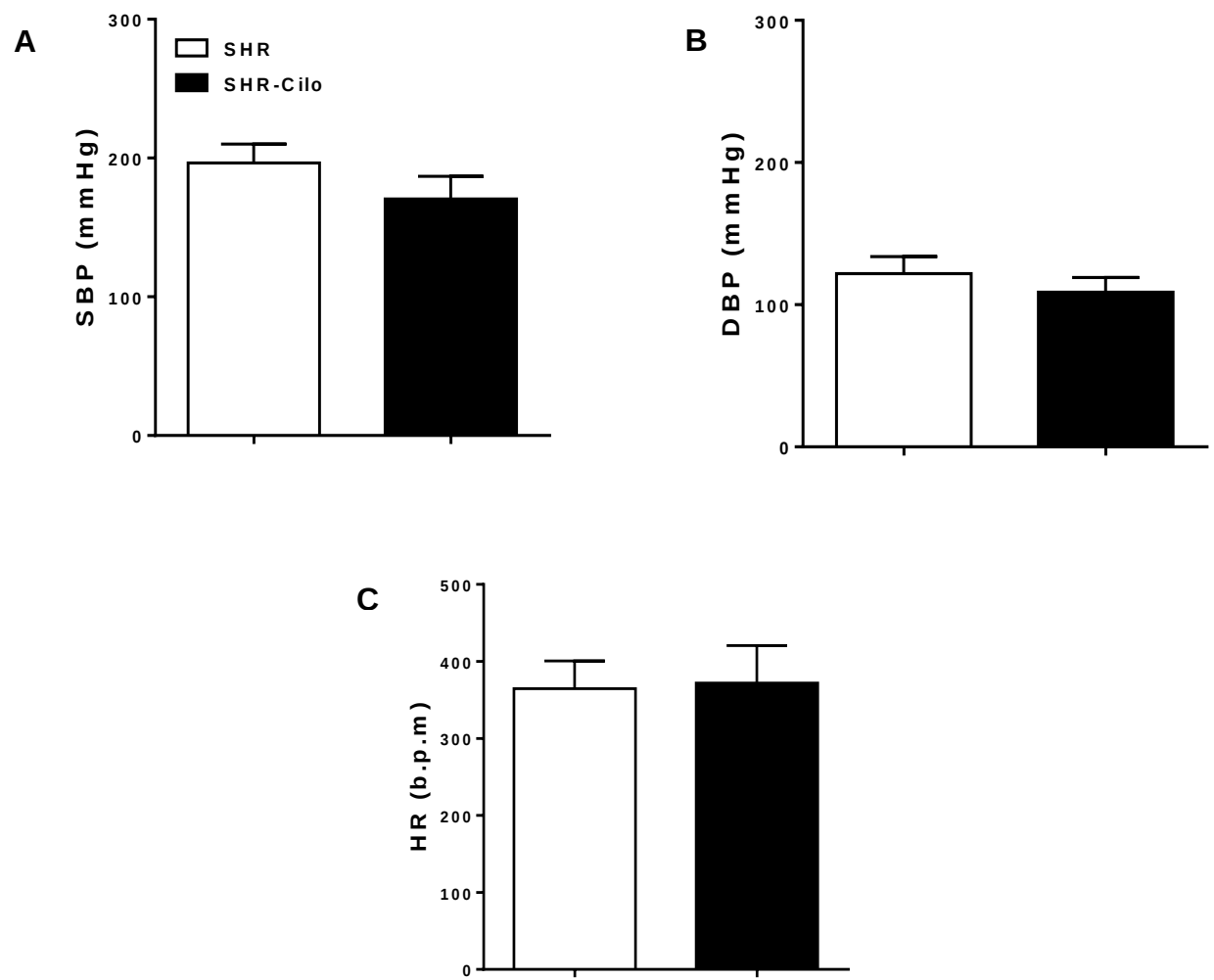


Figure 1

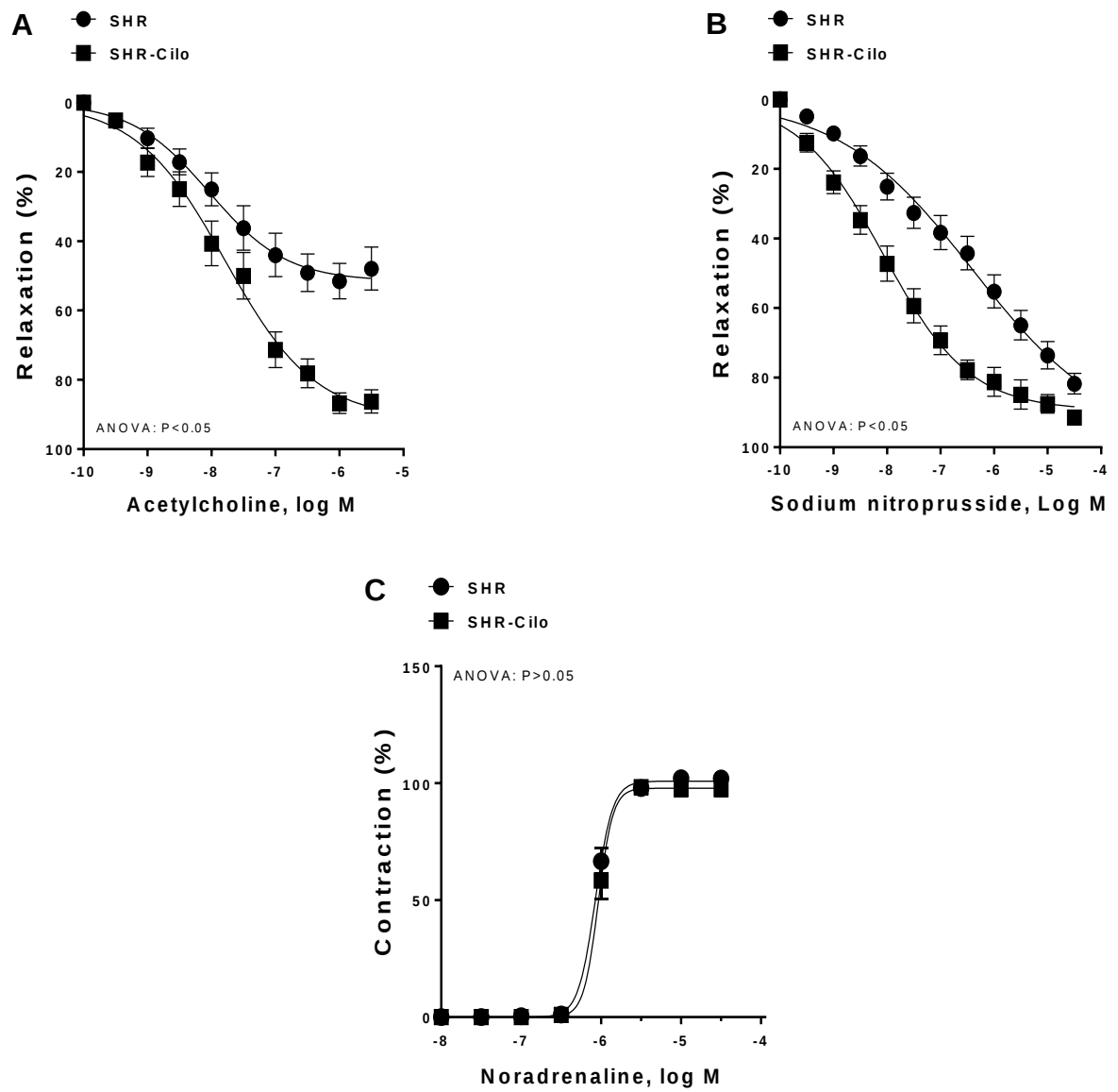


Figure 2

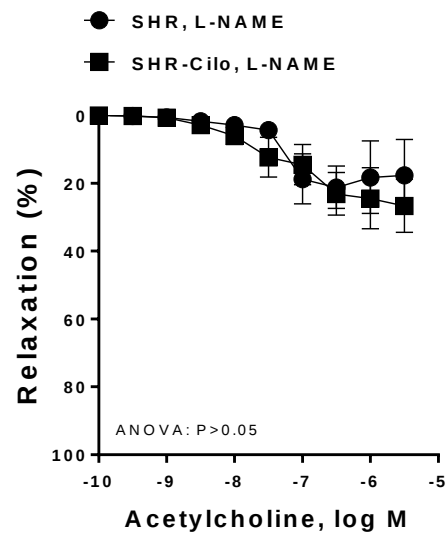


Figure 3

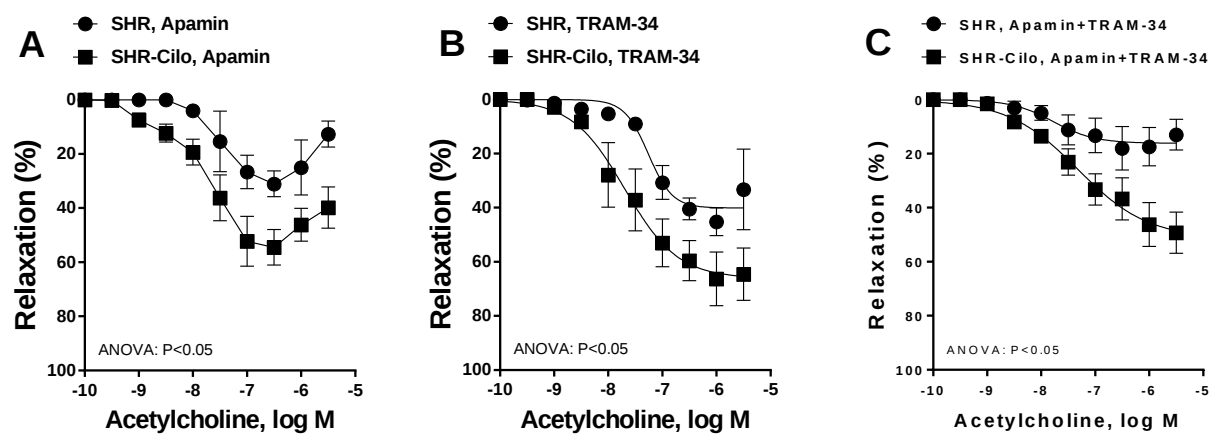
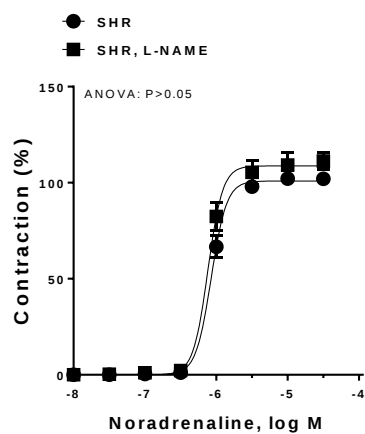
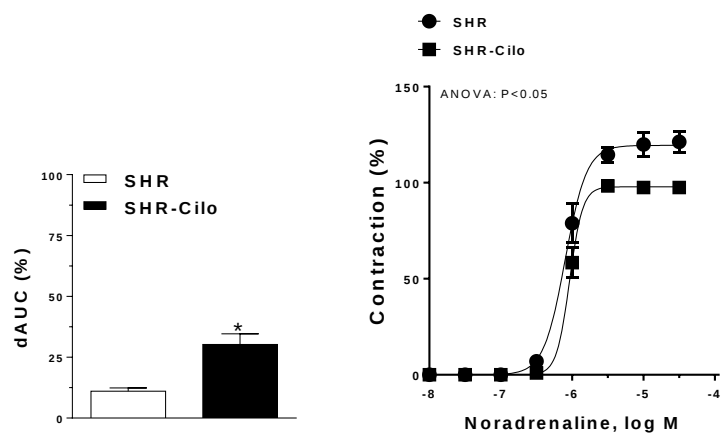


Figure 4

A**B****Figure 5**

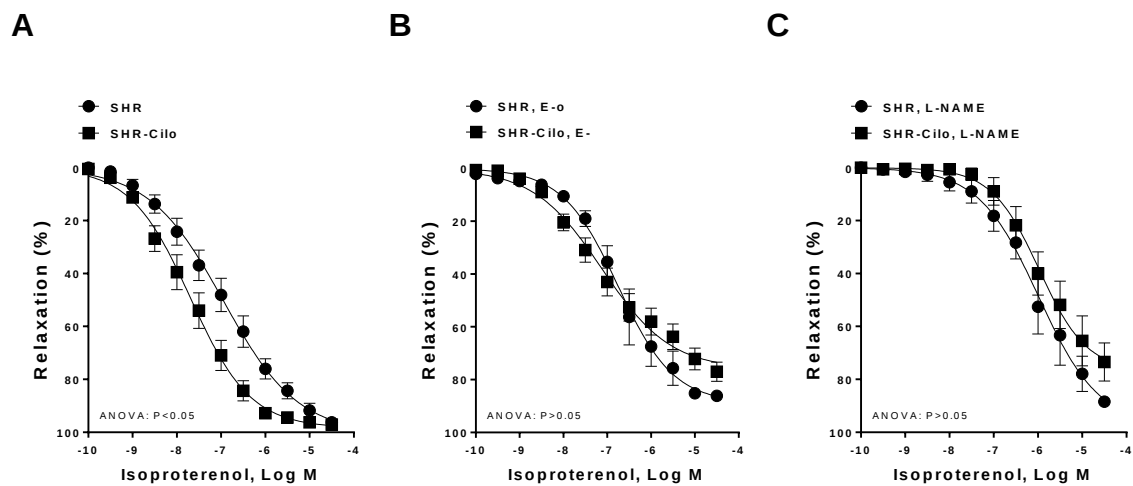


Figure 6

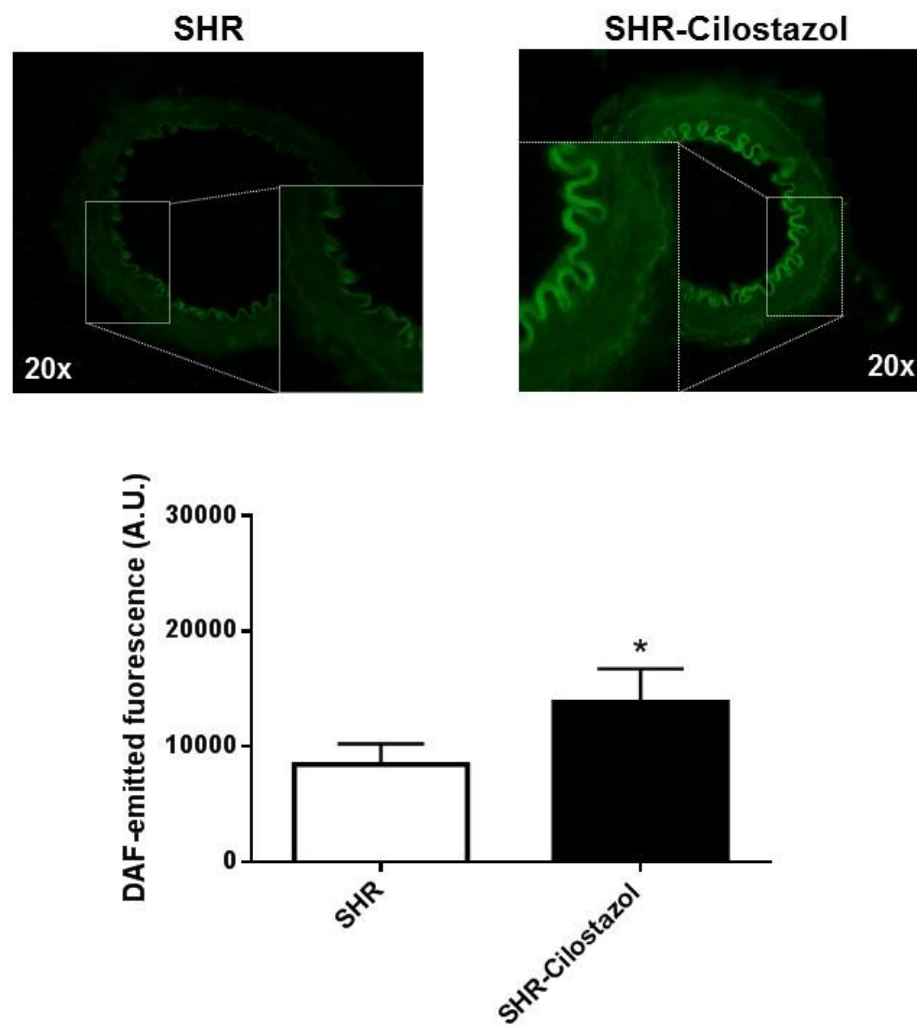


Figure 7

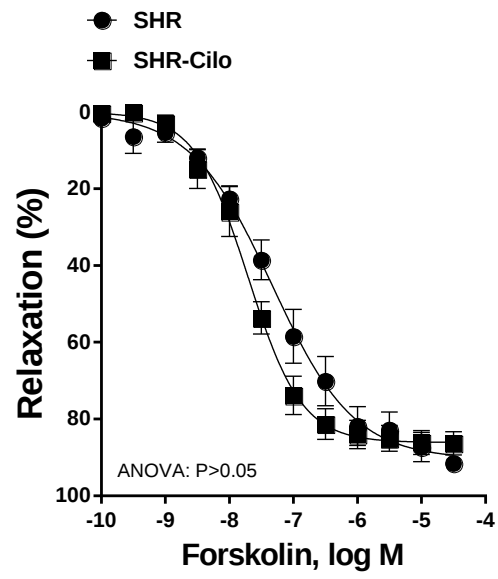


Figure 8

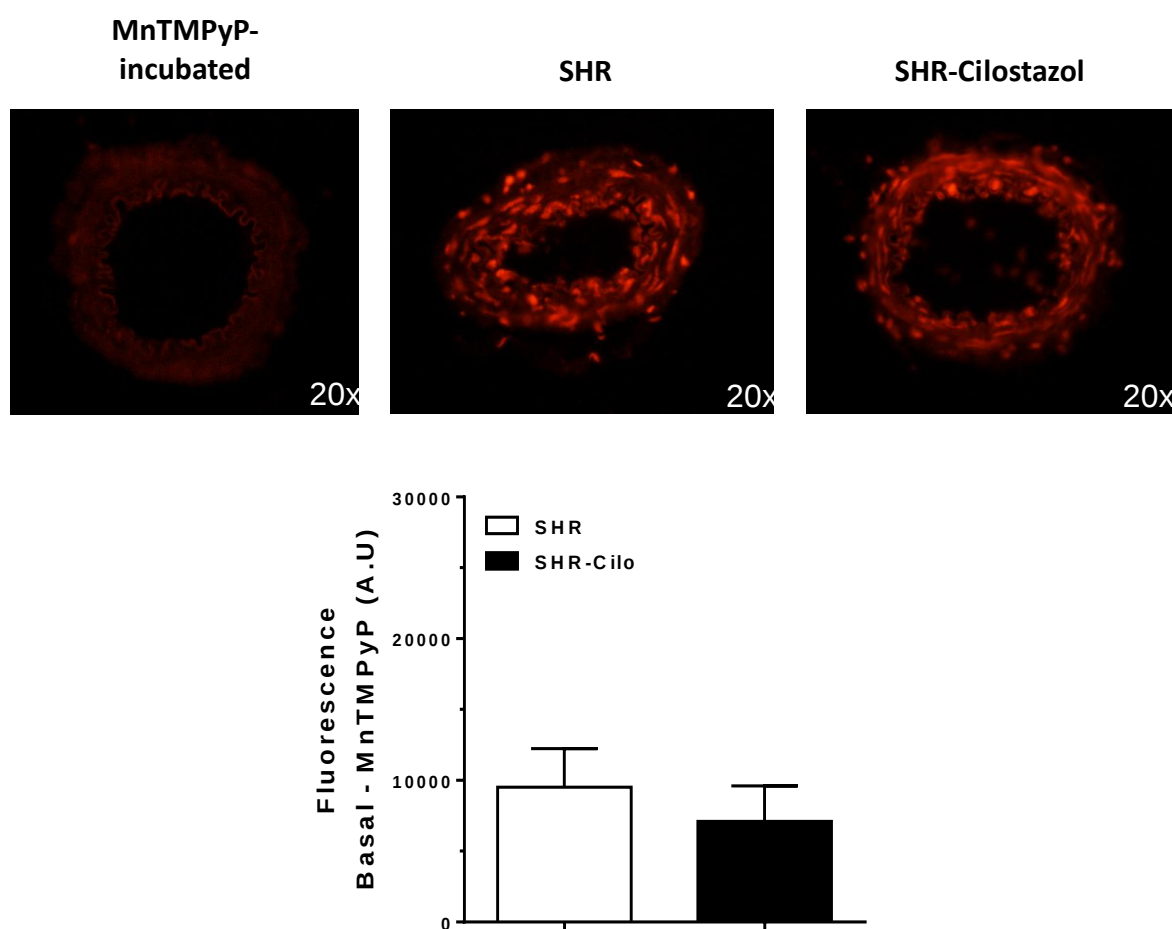
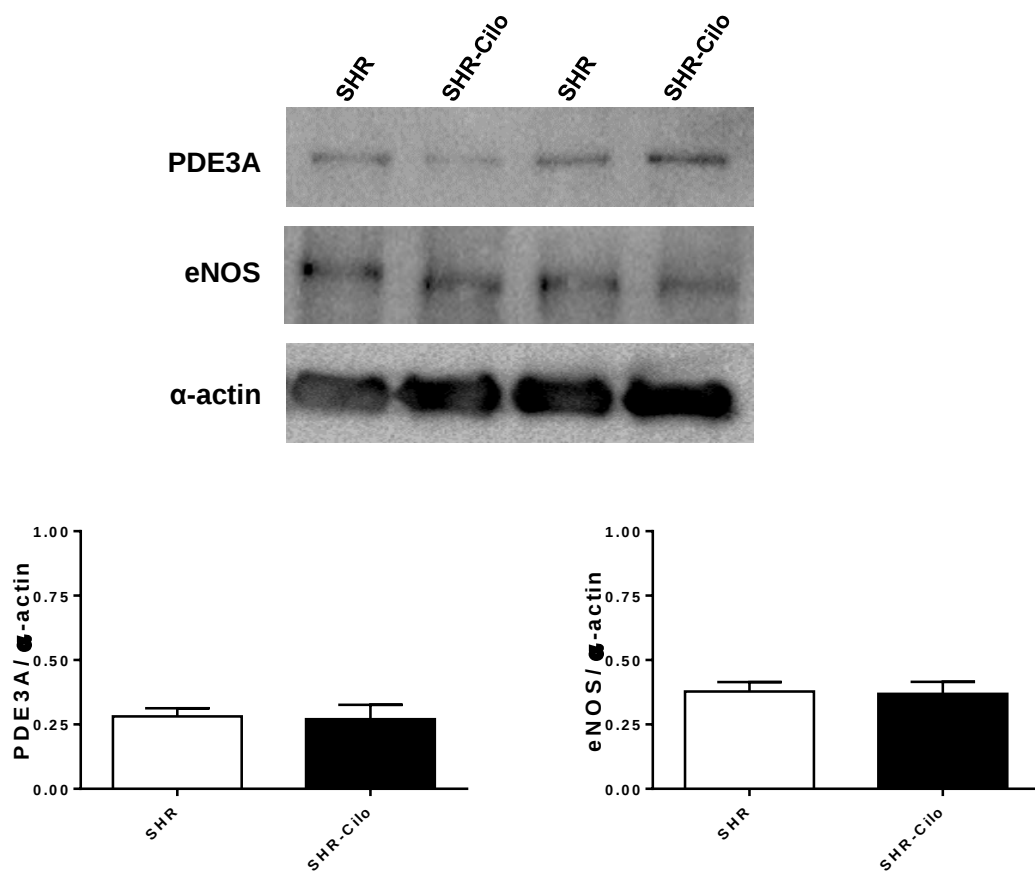


Figure 9

**Figure 10**

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo demonstram que a administração crônica de cilostazol é capaz de reverter o prejuízo da função vascular em animais espontaneamente hipertensos (SHR). Esta ação parece ser decorrente do aumento na biodisponibilidade do óxido nítrico, do aumento da participação da via de sinalização AMPc/GMPc no músculo liso vascular em artérias de resistência. Além disso, o tratamento parece envolver mecanismos diferentes da ativação da PKA através desses nucleotídeos. Os dados reforçam a existência de um *cross talk* entre a sinalização AMPc/GMPc e via do óxido nítrico, porém serão necessárias investigações adicionais. Dessa forma, esses resultados sugerem a eleição do cilostazol como terapia adjuvante no tratamento da hipertensão.