



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Cilostazol, um inibidor da fosfodiesterase 3, reverte as
alterações vasculares induzidas pelo envelhecimento em artérias
mesentéricas de resistência de rato**

HICLA STEFANY NUNES MOREIRA

ORIENTADOR: PROF. Dr. FABIANO ELIAS XAVIER

Recife, 2015

HICLA STEFANY NUNES MOREIRA

Cilostazol, um inibidor da fosfodiesterase 3, reverte as alterações vasculares induzidas pelo envelhecimento em artérias mesentéricas de resistência de rato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier

Recife, 2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Moreira, Hicla Stefany Nunes

Cilostazol, um inibidor da fosfodiesterase 3, reverte as alterações vasculares induzidas pelo envelhecimento em artérias mesentéricas de resistência de rato/ Hicla Stefany Nunes Moreira– Recife: O Autor, 2015.

91 folhas : tab.

Orientador: Fabiano Elias Xavier

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2015.

Inclui bibliografia

- 1. Doenças cardiovasculares em idosos 2. Endotélio 3. Células-envelhecimento I. Xavier, Fabiano Elias (orientador) III. Título**

618.9761

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015- 229

HICLA STEFANY NUNES MOREIRA

Cilostazol, um inibidor da fosfodiesterase 3, reverte as alterações vasculares induzidas pelo envelhecimento em artérias mesentéricas de resistência de rato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovado por:

Fabiano Elias Xavier - UFPE

Glória Isolina Boente Pinto Duarte - UFPE

Cristina de Oliveira Silva - UFPE

Glaucia Maria Lopes Reis - UFPE

Data: 31/08/2015

*A Deus, aos meus pais e irmão, ao meu
noivo, família e amigos. Por acreditar.*

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Fabiano Elias Xavier, pelo respeito, paciência, incentivo desde os primeiros passos na pesquisa científica, por sua orientação e conhecimentos a mim fornecidos que muito contribuíram para minha formação acadêmica.

A profa. Dra. Glória Isolina B. P. Duarte, profa. Dra. Cristina de Oliveira Silva, pela atenção e apoio demonstrados.

A todos os meus amigos de laboratório, pela dedicação, auxílio nos experimentos, pelas manhãs e tardes compartilhando sonhos, necessidades, frustrações e alegrias. Muito obrigada.

Ao técnico do laboratório José Antônio e a veterinária Claudia, pelo cuidado com os animais em estudo, por atender às necessidades surgidas durante meu mestrado. Ao secretário da Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia Djalma, pela dedicação, paciência e disponibilidade.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro.

A todos que de forma direta ou indiretamente me apoiaram e me ajudaram na realização desta dissertação.

“Ninguém é suficientemente perfeito que não possa aprender com o outro; e ninguém é totalmente destituído de valores que não possa ensinar algo ao próximo.”

São Francisco de Assis

Resumo

O envelhecimento prejudica a função endotelial, o que pode ser considerado um marco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares em idosos. O cilostazol, um inibidor seletivo da fosfodiesterase 3 (PDE-3), tem efeitos antiplaquetário, antitrombótico e vasodilatador. No presente estudo foi analisado se o tratamento com cilostazol melhora a função vascular (mecanismos contráteis e relaxamento) de ratos idosos e os possíveis mecanismos envolvidos. Ratos Wistar machos com 18 meses de idade foram tratados com cilostazol durante 8 semanas com uma dose de 100 mg/kg/dia administrado por gavagem. Ratos não tratados receberam apenas veículo. A pressão arterial média e a frequência cardíaca foram medidas nos ratos acordados. Artérias mesentéricas de resistência (AMR) foram utilizadas para avaliar o relaxamento à acetilcolina, ao nitroprussiato de sódio (NPS), à forskolina e ao isoproterenol, e a contração induzida pela noradrenalina, enquanto o relaxamento à forskolina e ao isoproterenol permaneceu inalterado em ambos os grupos, o relaxamento à acetilcolina e ao NPS foi potencializado em AMR de ratos tratados com cilostazol. Nessas artérias, a vasoconstrição à noradrenalina foi semelhante nos dois grupos. A incubação com L-NAME ou ODQ aboliu a resposta vasodilatadora à acetilcolina em AMR de ambos os grupos. Entretanto, na presença de L-NAME e indometacina, o relaxamento à acetilcolina foi semelhante nos dois grupos. O bloqueio de canais para K^+ ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}) (apamina + TRAM-34) reduziu o relaxamento induzido pela acetilcolina em AMR de ratos tratados com cilostazol, mas não em ratos não tratados. Em resumo, os resultados sugerem que o cilostazol normaliza a função endotelial em ratos idosos por um mecanismo dependente de GMPc, envolvendo provavelmente um aumento da liberação de $\bullet NO$ e subsequente ativação de canais K_{Ca} no músculo liso vascular. Embora mais estudos sejam necessários, estes resultados indicam um possível uso de cilostazol como uma alternativa para a prevenção/ tratamento de desordens vasculares induzidas pelo envelhecimento.

Palavras Chaves: Envelhecimento, disfunção endotelial, cilostazol.

Abstract

Aging impairs endothelial function, which may be considered a hallmark of the development of cardiovascular diseases in elderly. Cilostazol, a selective inhibitor of phosphodiesterase 3 (PDE-3), has antiplatelet, antithrombotic and peripheral vasodilator effects. In the current study, we analyzed whether cilostazol could affect vascular function (contractile and relaxation mechanisms) of old rats and possible mechanism involved. 18-month-old male Wistar rats were treated with Cilostazol during 8 weeks at the dose of 100 mg.kg⁻¹ by gavage. The untreated rats received vehicle alone. Mean arterial pressure and heart rate were measured in conscious rats. Mesenteric resistance arteries were used to evaluate the relaxation to acetylcholine, sodium nitroprusside, forskolin, and isoproterenol and noradrenaline-induced contraction, while relaxation to forskolin and isoproterenol remained unmodified by cilostazol, relaxation to acetylcholine and to SNP was increased in MRA from cilostazol-treated than untreated rats. In these arteries, vasoconstriction produced by noradrenaline was similar in both groups. The incubation with L-NAME or ODQ abolished the vasodilator response to acetylcholine in MRA from both cilostazol-treated and untreated rats. However, in presence of L-NAME and indomethacin, relaxation to acetylcholine was similar in both groups. The blockade of calcium-activated K⁺-channel (K_{Ca}) (TRAM-34 plus apamin) attenuated acetylcholine-induced relaxation in MRA from cilostazol-treated rats, but in untreated rats. In short, results suggests that cilostazol reverses endothelial function in aged rats by a cGMP-dependent mechanism, involving probably an increase in •NO and subsequent activation of the K_{Ca} channel in vascular smooth muscle. Although further study is needed, these results indicate a possible use of cilostazol as an alternative for the prevention/treatment of vascular disorders induced by aging.

Keywords: Aging, endothelial dysfunction; cilostazol.

LISTA DE ABREVIATURAS

• NO	Óxido nítrico
•O ₂ ⁻	Ânion superóxido
•OH	Radical hidroxil
15-HETE	Ácido 15-s-hidroxieicosatetraenoico
ADMA	Dimetilarginina assimétrica
Akt	Proteína quinase B
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANG I	Angiotensina I
ANG II	Angiotensina II
AT ₁	Receptor de angiotensina II tipo 1
AT ₂	Receptor de angiotensina II tipo 2
BH4	Tetrahidrobiopterina
<i>big</i> ETs	<i>big</i> -endotelinas
BKCa	Canais de K ⁺ ativados por Ca ²⁺ de alta condutância
Ca ²⁺	Cálcio
CO	Monóxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
cPGES	Prostaglandina E sintetase citosólica
CREB	Proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc
DAG	Diacilglicerol
DCV	Doenças cardiovasculares
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECE	Enzimas conversoras de endotelinas
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 E ₂
EP ₁	Prostaglandina E subtipo 1
EP ₂	Prostaglandina E subtipo 2
EP ₃	Prostaglandina E subtipo 3
EP ₄	Prostaglandina E subtipo 4
EPAC	Proteínas de troca diretamente ativadas por AMPc
ERON	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ET	Endotelina
ET-1	Endotelina isoforma 1
ET-2	Endotelina isoforma 2
ET-3	Endotelina isoforma 3
ET _A	Receptor da endotelina subtipo A
ET _B	Receptor da endotelina subtipo B
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina
FMN	Mononucleotídeo de flavina
FP	Receptor específico da Prostaglandina F _{2α}
GC	Guanilato ciclase
GCs	Guanilato ciclase solúvel
G _i	Proteína G inibitória
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GP	Glutathione peroxidase
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
Gq	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 heparina	Fator de crescimento semelhante ao fator de crescimento epidermal ligado a heparina
HOCl	Ácido hipocloroso
IKCa	Canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de intermediária condutância
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP ₃	Inositol trifosfato
K ⁺	Potássio
K _{Ca}	Canais de K^+ ativados por Ca^{2+}
LOX	Lipooxigenase
LPS	Lipopolissacarídeos derivados de bactérias
MCP-1	Proteína-1 quimioatraente de monócito
mPGES1	Prostaglandina E sintetase membranar tipo 1
mPGES2	Prostaglandina E sintetase membranar tipo 2
MPO	Mieloperoxidase
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-kB	Fator nuclear kappa B
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₃	Ozônio
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PDE	Fosfodiesterase
PDE-1	Fosfodiesterase-1
PDE-2	Fosfodiesterase-2
PDE-3	Fosfodiesterase-3
PDE-3A	Fosfodiesterase-3 A
PDE-3B	Fosfodiesterase-3 B
PDE-4	Fosfodiesterase-4
PDE-5	Fosfodiesterase-5
PDE-6	Fosfodiesterase-6

PDE-7	Fosfodiesterase-7
PDE-8	Fosfodiesterase-8
PDE-9	Fosfodiesterase-9
PDE-10	Fosfodiesterase-10
PDE-11	Fosfodiesterase-11
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGES	Prostaglandinas E sintetase
PGF _{1α}	prostaglandina F _{1α}
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGFS	Prostaglandina F _{2α} sintetase
PGG ₂	Prostaglandina G ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase G
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
RAS	Sistema renina-angiotensina
SKCa	Canais de 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
TPα	Receptor específico do Tromboxano A ₂ isoforma α
TPβ	Receptor específico do Tromboxano A ₂ isoforma β
TxA ₂	Tromboxano A ₂
TXS	TxA ₂ -sintetase
VCAM-1	Molécula 1 de adesão da célula vascular

VOCC	Canais para Ca^{2+} dependente de voltagem
XO	Xantina oxidase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
2.1. Envelhecimento.....	12
2.2. Envelhecimento e Doenças Cardiovasculares.....	13
2.3. Sistema Vascular e o Envelhecimento	14
2.4. Endotélio Vascular e o Envelhecimento.....	16
2.4.1. Fatores vasodilatadores derivados do endotélio	17
Óxido nítrico ($\bullet NO$).....	17
Prostaciclina (PGI_2)	19
Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF).....	21
2.4.2. Fatores vasoconstritores derivados do endotélio.....	22
Prostanoides	22
Endotelinas (ETs)	25
Angiotensina II (ANG II)	27
Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERONs).....	27
2.5. Fosfodiesterases.....	28
2.6. Cilostazol	31
3. OBJETIVOS	33
3.1. Geral	33
3.2. Específicos	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
Artigo a ser submetido no periódico: <i>Experimental Physiology</i>	55
Abstract	56
Introduction	57
Methods	59
Animals.....	59

<i>Arterial blood pressure measurement in conscious rats</i>	59
<i>Vascular Reactivity Study</i>	60
<i>Experimental protocols</i>	60
<i>Chemical compounds</i>	61
<i>Statistical analysis</i>	61
Results	63
<i>Blood pressure</i>	63
<i>Effects of chronic cilostazol treatment on endothelium-dependent and independent relaxation and contraction</i>	63
Discussion	65
Acknowledgements	70
Conflict of interest	71
References	72
Legends for figures	83
4. CONCLUSÕES	91

1. INTRODUÇÃO

O século XX foi marcado pelo aumento mundial na longevidade do ser humano, cuja expectativa de vida passou a equivaler quase o dobro da idade alcançada no início do século (Carvalho & Garcia, 2003). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), na atualidade existem 600 milhões de pessoas com idade igual ou superior a 60 anos, com expectativa de dobrar em 2025 e alcançar dois bilhões em 2050 (WHO, 2004). No Brasil, a população de idosos passará de 7% para 14% em 19 anos e será a sexta maior população de idosos do mundo em 2020 (Berquó, 1996).

O envelhecimento é um processo progressivo que ocorre com o avanço da idade, independente de doença, estilo de vida ou fatores ambientais (Masoro, 2006). É caracterizado pela diminuição da eficácia dos mecanismos envolvidos na manutenção da homeostase, resultando em deficiências progressivas nas funções celulares que causam alterações nos diferentes tecidos do organismo (Timiras, 1994; Rutten *et al.*, 2003; Cutler & Mattson, 2006). Entre as atividades corporais que se comprometem com o avanço da idade ressaltam-se as funções neuroendócrinas, hepáticas, gastrointestinais, renais e cardiovasculares (Timiras, 1994; Cutler & Mattson, 2006).

O envelhecimento cardiovascular fisiológico é caracterizado por uma série de alterações, como: aumento progressivo na pressão arterial sistólica, aumento da massa ventricular esquerda; redução das respostas reflexas e da variabilidade da frequência cardíaca, aumento da incidência de doença arterial coronariana e menor vasodilatação em resposta a estímulos beta-adrenérgicos ou vasodilatadores mediados pelo endotélio (Hongo *et al.*, 1988; Franklin *et al.*, 2001; Lakatta & Levy, 2003a; Ferrara *et al.*, 2014). Nos países industrializados, aproximadamente um quarto da população acima dos 65 anos apresenta algum tipo de doença cardiovascular (DCV) (Williams *et al.*, 2002). Dentre estas doenças se destaca a hipertensão arterial, que é considerada um importante fator de risco para outras DCVs e está associada à alta mortalidade e morbidade desta população (Franklin *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2004; WHO, 2011).

Em indivíduos normais o envelhecer também induz o desenvolvimento progressivo da disfunção endotelial, que é caracterizada pela redução de fatores vasodilatadores e predominância da liberação de fatores vasoconstritores, fatores de crescimento, tendência à

agregação plaquetária, maior adesão de leucócitos e desenvolvimento de lesões aterotrombóticas (Mombouli & Vanhoutte, 1999). A disfunção endotelial parece ocorrer mais precocemente em homens que em mulheres (Celermajer *et al.*, 1994); nas mulheres esta disfunção acontece durante a menopausa, a qual tem sido atribuída à perda do efeito protetor de estrógenos sobre a parede arterial.

Dentre as alternativas para melhoria da qualidade de vida dos indivíduos idosos está a terapia farmacológica. A utilização de fármacos no tratamento de distúrbios cardiovasculares pode ser capaz de melhorar a função endotelial, fornecendo benefícios para a redução da morbidade e mortalidade em indivíduos idosos que sofrem de DCVs. O uso de fármacos antiagregantes plaquetários está consolidado como terapia de escolha na prevenção primária e secundária de eventos clínicos relacionados a uma das DCVs que mais leva a óbitos no mundo, a aterotrombose, que tem prevalência elevada na população idosa (Silva *et al.*, 2013). A ocorrência de eventos aterotrombóticos está associada à existência prévia de lesões ateroscleróticas, que são iniciadas normalmente por um processo crônico de injúria ao endotélio vascular (Anderson *et al.*, 1995; Davignon & Ganz, 2004). Alternativas terapêuticas que visem prevenir ou retardar o desenvolvimento da disfunção endotelial tornam-se úteis na prevenção ou tratamento destas lesões ateroscleróticas. Neste sentido, os fármacos antiagregantes plaquetários da classe dos inibidores da fosfodiesterase (PDE) têm sido intensivamente estudados nos últimos anos (Oyama *et al.*, 2011; Hori *et al.*, 2012). O cilostazol é um dos representantes desta classe de fármacos, o qual inibe seletivamente a fosfodiesterase-3 (PDE-3) (Kambayashi *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2006).

O cilostazol é um derivado quinolinônico classificado como antiagregante plaquetário e antitrombótico com ação vasodilatadora (Kambayashi *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2006). Promove aumento dos níveis intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) por produzir inibição potente e seletiva da PDE-3 (Okuda *et al.*, 1993; Cone *et al.*, 1999). Além destas ações, o cilostazol ainda possui atividade antiinflamatória e inibidora da geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) (Park *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2009). Considerando estas ações, o cilostazol poderia se tornar uma alternativa importante para prevenção ou retardo de distúrbios vasculares decorrentes do envelhecimento, uma vez que todos esses fatores pró-inflamatórios e pró-oxidativos são ativados durante este processo e são importantes mediadores da disfunção endotelial na população idosa. Além disso, falhas na via de sinalização do AMPc têm sido sugeridas como um mecanismo importante no

desenvolvimento e manutenção do processo hipertensivo (Marcil *et al.*,1997), um fator de risco com alta incidência em indivíduos idosos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Envelhecimento

O envelhecer é um processo natural que implica mudanças progressivas e inevitáveis de aspectos físicos e cognitivos relacionadas à idade. A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera o envelhecimento como um “processo sequencial, individual, universal, irreversível, não patológico de deterioração de um organismo maduro, próprio a todos os membros de uma espécie, de maneira que o tempo o torne menos capaz de fazer frente ao estresse do meio ambiente, e assim, aumente sua possibilidade de morte” (WHO, 2002). Segundo a OMS (WHO, 2002), o limite de idade entre o indivíduo adulto e o idoso é 65 anos em nações desenvolvidas e 60 anos nos países emergentes. O Brasil hoje está ocupando a sétima colocação mundial em quantidade de idosos, com projeções estatísticas apontando que em 2025 ocupe a sexta posição mundial e a primeira posição da América Latina (WHO, 2002; Ishizuka, 2003).

Considerado também como um fenômeno fortemente relacionado com os processos de crescimento e de diferenciação celular, o envelhecimento procede da interação entre informações genéticas e todas as outras variáveis individuais e socioculturais que compõem o conjunto da longevidade do indivíduo (Tamer & Petriz, 2007). As mudanças sociais, psicológicas e fisiológicas que ocorrem durante o envelhecimento podem estabelecer influências na qualidade de vida dessa população, dificultando a realização de atividades diárias e a manutenção de um estilo de vida saudável (Santarém, 1997; Okuma, 1998; Matsudo *et al.*, 2000).

O envelhecimento fisiológico envolve uma série de alterações nas funções orgânicas e estruturais resultantes do efeito do avanço da idade sobre o organismo. Todas as alterações que estão envolvidas no processo fisiológico do indivíduo idoso estão associadas ao envelhecimento celular (Campisi & d’Adda di Fagagna, 2007). Este é caracterizado também pela redução da reserva fisiológica global, trazendo um aumento exponencial de vulnerabilidade a doenças. A relação entre o tempo de exposição a fatores de risco para diversas doenças e as alterações secundárias à idade, explicam a maior morbidade nas faixas etárias mais avançadas (Miller, 2003). Embora seja um fenômeno universal, existe uma grande disparidade observada entre aqueles que envelhecem. A busca do entendimento entre as diferenças entre o envelhecimento bem sucedido, pautado na independência e autonomia, e

o mal sucedido, permeado de incapacidades, é de suma importância em nossa sociedade contemporânea.

2.2. Envelhecimento e Doenças Cardiovasculares

O envelhecimento humano se manifesta não somente por modificações fenotípicas, mas pelo estabelecimento de muitas doenças, dentre elas estão as DCVs, o diabetes, o Alzheimer e as neoplasias (WHO, 2004; Guarente & Kenyon, 2009). As DCVs se referem a um grupo de enfermidades que afetam o coração e/ou os vasos sanguíneos, e que geralmente resultam de dano arterial. A prevalência e a incidência das DCVs aumentam subitamente com o envelhecimento (Wolf & Lewis, 1993; Burt *et al.*, 1995). Nos países industrializados, aproximadamente um quarto da população acima dos 65 sofre de algum tipo de distúrbio do sistema cardiovascular (Williams *et al.*, 2002). Segundo Mackay & George (2004), aproximadamente 75% das DCVs podem ser atribuídos aos fatores de riscos convencionais, como hipertensão arterial, dieta inadequada, inatividade física, anormalidade nos níveis de colesterol, tabagismo e diabetes mellitus. É importante ressaltar que não só as DCVs clinicamente diagnosticadas elevam-se com o avanço da idade; doenças ocultas e/ou de apresentação subclínica como, por exemplo, a aterosclerose silenciosa da artéria coronária, também tem sua incidência aumentada com a idade (Fleg *et al.*, 1990; Nagai *et al.*, 1998; O'Leary *et al.*, 1999). Contudo, mesmo estudos epidemiológicos mostrando fatores de risco para DCVs, como citado anteriormente, o envelhecimento é, sem dúvida, um dos fatores que culmina com maior risco (Lakatta & Levy, 2003a; 2003b).

O acometimento da DCV em indivíduos idosos reflete nas alterações fisiológicas e estruturais do envelhecimento normal e o declínio do desempenho deste sistema é uma consequência da associação de problemas cardiovasculares e não cardiovasculares (Ferrari *et al.*, 2003). Com o envelhecimento ocorre também o aumento da incidência de doenças renais e pulmonares, que podem acelerar as alterações da função cardiovascular (Cheitlin, 2003). Portanto, é complexo diferenciar as alterações relacionadas com o processo de envelhecimento cardiovascular das alterações relacionadas com as doenças que a ele estão associadas, o que torna esta relação um pouco controversa (Andrews, 2001; Ferrari *et al.*, 2003; Lakatta & Levy, 2003a).

O perfil das DCVs em idosos difere dos indivíduos jovens. A pressão sistólica, mas não a diastólica eleva-se com o envelhecimento, e a hipertensão sistólica desempenha papel

chave nos eventos cardiovasculares, especialmente em mulheres. A insuficiência cardíaca, com preservada função sistólica é mais comum em idade avançada de ambos os sexos, sendo mais comum em mulheres (Harris & Douglas, 2000). A doença arterial coronária, por exemplo, envolvendo numerosos vasos e o tronco da coronária esquerda ocorre em frequência semelhante entre homens e mulheres idosos, assim como o infarto agudo do miocárdio (Harris & Douglas, 2000; Lakatta & Levy, 2003b; Schwartz & Zipes, 2005).

As DCVs em pessoas idosas raramente estão isoladas, frequentemente associam-se a alguma condição crônica. É importante ressaltar a participação do sistema vascular na patogênese das complicações cardiovasculares associadas ao envelhecimento, este sistema, todavia, representa um dos principais alvos para o desenvolvimento de doenças como a hipertensão arterial, o acidente vascular cerebral, o infarto do miocárdio, dentre outras, que correspondem à principal causa de morbidade e mortalidade desta população.

2.3. Sistema Vascular e Envelhecimento

O sistema vascular é uma complexa rede de vasos que conecta o coração com os diversos órgãos e tecidos para manter sua homeostase em resposta a mudanças fisiológicas e patológicas. Este sistema é responsável por suprir as necessidades dos tecidos através do transporte de nutrientes, da remoção dos produtos de excreção, do transporte dos hormônios, contribuindo para a criação de um ambiente apropriado para as condições ótimas de sobrevivência e funcionamento das células (Guyton & Hall, 2002). Todos os vasos sanguíneos, menos os capilares, são estruturalmente e funcionalmente compostos por três camadas claramente distintas: camada adventícia (tecido conjuntivo), a média (tecido muscular liso) e a íntima (células endoteliais) (Opie, 1998). Cada uma dessas exerce papel distinto sobre o suporte mecânico da parede arterial, a função metabólica e a interação com os elementos do sangue (Martinez-Lemus, 2012).

A camada adventícia corresponde à camada mais externa dos vasos sanguíneos. Sua espessura varia de acordo com o tipo vascular e sua localização. No tronco pulmonar e aorta, por exemplo, existe relativamente pequena condensação de tecido conectivo fibroso que pode ser envolto por tecido adiposo. Já em artérias viscerais, como nos ramos mesentérico e renal, existem camadas organizadas de fibras elásticas e colágenas (Glagov, 1984). Esta camada é constituída de tecido conjuntivo denso, composto de fibroblastos e macrófagos residentes, fibras de colágeno, fibras elásticas e terminações nervosas que podem liberar também fatores

vasoativos. Estes fibroblastos são capazes de produzir mediadores vasoativos como, por exemplo, ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) (Pagano *et al.*, 1997; Gutterman, 1999; Rey *et al.*, 2002) e até mesmo o óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) (Kleschyov *et al.*, 2000).

A túnica média, por sua vez, é composta basicamente por células musculares lisas e fibras elásticas, fibras reticulares e proteoglicanos. As células musculares lisas são a fonte dos mecanismos de contração e relaxamento dos vasos. Elas recebem os sinais provenientes do endotélio e de tecidos adjacentes metabolicamente ativos e das terminações nervosas (Cunha & Ferreira, 2000), assim como são capazes de responder a estímulos mecânicos como o estiramento da parede.

A camada íntima é constituída pela lâmina elástica interna e por uma monocamada de células endoteliais que reveste a superfície interna dos vasos sanguíneos, separando a luz dos vasos da camada muscular lisa e da camada adventícia (O'Donnell, 2003). Essas células assumem diversas funções como modulação do tônus vascular, o controle da permeabilidade dos vasos, deposição da matriz extracelular, proliferação celular local, resposta inflamatória e regeneração de danos locais (Cannon, 1998). Essas funções decorrem de sua capacidade em sintetizar e liberar substâncias vasoativas (citados posteriormente) que interferem em processos fisiológicos e patológicos relacionados à homeostase vascular (Martinez-Lemus, 2012).

O processo de envelhecimento está associado com alterações estruturais e funcionais complexas da vasculatura, independente de outros fatores de risco, como a hipertensão, o diabetes ou a hipercolesterolemia (Barodka *et al.*, 2011). Este processo promove diversas modificações na parede vascular, como rigidez arterial, diminuição do lúmen vascular, espessamento das camadas íntima e média e disfunção endotelial (Bortolotto *et al.*, 1999; Lakatta & Levy, 2003a; O'Rourke & Hashimoto, 2007). Assim, com o avançar da idade, a artéria aorta e a árvore arterial sofrem redução da complacência, distensibilidade e dilatação, como consequência da calcificação vascular, especialmente na camada média das grandes artérias, e estes fatores geram a necessidade de aumento da pressão arterial sistólica e de pulso, o que atribui ao aumento da pós-carga (Fleg, 1986; Vaitkevicius *et al.*, 1993; Franklin *et al.*, 1997; Liao *et al.*, 1999; Giachelli, 2004).

As artérias de resistência 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 (Feihl *et al.*, 2008). A

dissipação da energia indispensável para superar a resistência vascular, evidenciada por um marcante declínio na pressão arterial ocorre principalmente nas arteríolas pré-capilares e nas pequenas artérias, ou seja, nos vasos com diâmetro inferior a 350 μm (Borders & Granger, 1986; Mulvany & Aalkjaer, 1990; Christensen & Mulvany, 2001). Alterações morfológicas e funcionais nas artérias de resistência têm sido demonstradas durante o envelhecimento, dentre elas estão a redução da relação capilar-fibra muscular (Parizkova *et al.*, 1971), espessamento da parede arterial, redução do diâmetro (100 – 350 μm de diâmetro interno) e alteração da função endotelial (O'Rourke & Hashimoto, 2007). Estes eventos precedem a doença clínica e aumentam o risco de desenvolvimento clínico de aterosclerose, hipertensão e acidente vascular cerebral nesta população.

2.4. Endotélio Vascular e o Envelhecimento

O endotélio é composto por uma única camada de células epiteliais justapostas por junções intercelulares diversas, determinadas entre as células adjacentes (Nicholson *et al.*, 2008). Suas funções incluem a atuação como barreira semipermeável para troca de macromoléculas, fluidos e eletrólitos entre espaços intra e extracelulares (Klabunde, 2005), regula a coagulação sanguínea e a resposta inflamatória. Além disso, é um local de produção de moléculas de adesão (Félétou *et al.*, 2011), de regulação da angiogênese (Klabunde, 2005), de proteção contra o vasoespasmó, a trombose e a aterogênese (Batlouni, 2001). O endotélio é importante para a adaptação vascular às mudanças crônicas no fluxo sanguíneo e na pressão arterial.

Entre os produtos derivados do endotélio, destacam-se as substâncias vasodilatadoras, antiproliferativas e antiagregantes plaquetárias como, o $\bullet\text{NO}$, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e a prostaciclina (PGI_2), e as substâncias vasoconstritoras, indutoras do crescimento celular e ativadoras plaquetárias, tais como, a endotelina-1 (ET-1), os endoperóxidos cíclicos derivados do metabolismo do ácido araquidônico (a prostaglandina H_2 e o tromboxano A_2), a angiotensina II (ANG II) e as EROS (Virdis *et al.*, 2010).

A integridade endotelial é essencial para a regulação do tônus vascular. Em condições fisiológicas existe um equilíbrio importante entre a liberação de fatores vasorrelaxantes (EDRF) e vasoconstritores (EDCF). No entanto, em várias condições patológicas, como na hipertensão arterial, no diabetes e no envelhecimento, esse equilíbrio é alterado. Não ocorre somente redução dos EDRFs, mas também aumento na produção de EDCFs (Hongo *et al.*,

1988; Koga *et al.*, 1989; Murohara *et al.*, 1991; Miyata *et al.*, 1992; Matz *et al.*, 2000). Nos últimos anos, inúmeros estudos têm demonstrado haver uma associação entre o aumento da produção de prostaglandina H_2 (PGH_2) e tromboxano A_2 (TxA_2), derivados do metabolismo do ácido araquidônico pela ciclooxygenase (COX), e o estabelecimento da disfunção endotelial (Pannirselvam *et al.*, 2005; Alfranca *et al.*, 2006; Félétou *et al.*, 2010).

2.4.1. Fatores vasodilatadores derivados do endotélio

Óxido nítrico ($\bullet NO$)

Os experimentos pioneiros de Furchgott & Zawadzki (1980) demonstraram que o efeito vasodilatador da acetilcolina dependia da existência de um fator relaxante derivado de endotélio, que foi posteriormente identificado como $\bullet NO$ (Deanfield *et al.*, 2007). O $\bullet NO$ é um dos mediadores vasoprotetores mais importantes secretados pelo endotélio. Esta substância é um gás solúvel de meia-vida curta, radical livre, sintetizado de maneira contínua pelas células endoteliais através da enzima óxido nítrico sintase (NOS).

A NOS catalisa a produção de $\bullet NO$, que é produzido a partir da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, e convertido em L-citrulina (Moncada *et al.*, 1991), e necessita de cofatores como a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NAD(P)H), o dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), o mononucleotídeo de flavina (FMN) e a tetrahydrobiopterina (BH4) para transferência de elétrons do domínio oxidase para o redutase da enzima (Förstermann, 2010; Förstermann & Sessa, 2012). Há três isoformas da NOS: uma induzida pelo estímulo imunológico (iNOS) e duas constitutivas, a NOS endotelial (eNOS) e a NOS neuronal (nNOS), sendo que as NOS constitutivas são dependentes do íon cálcio (Ca^{2+}) e de calmodulina para sua ativação, enquanto a iNOS é independente de Ca^{2+} -calmodulina (Moncada *et al.*, 1991; Guix *et al.*, 2005). A ativação da eNOS é mediada por vários agonistas, como acetilcolina, bradicinina, ionóforo de Ca^{2+} , catecolaminas, angiotensina II, e por estímulos físicos, como o estresse de cisalhamento, os quais originam aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , formando o complexo Ca^{2+} -calmodulina que ativa a eNOS (Loscalzo & Welch, 1995).

O $\bullet NO$ produzido difunde-se rapidamente para as células vasculares e para o lúmen vascular, devido a sua característica lipofílica e seu tamanho; isto o torna crucial para o entendimento de suas atividades biológicas (Moncada, *et al.*, 1991; Busconi & Michel, 1993).

No interior da célula muscular, o •NO interage com o grupamento heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), levando a alteração da conformação desta enzima, tornando-a ativa. A GC catalisa a saída dos dois grupamentos fosfato da molécula da guanosina trifosfato (GTP), resultando na síntese de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (Dussue *et al.*, 2003). Com a elevação da concentração de GMPc, que ativa a proteína quinase G (PKG) na célula muscular, ocorre relaxamento vascular devido à diminuição do influxo de Ca^{2+} , inibição da liberação e/ou aumento de captação de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático (Gewaltig & Kojda, 2002). Tanto o •NO diretamente como a PKG podem aumentar a atividade dos canais para potássio (K^+), produzindo hiperpolarização, o que reduz a entrada de Ca^{2+} do meio extracelular, levando a mais vasodilatação (Rapaport *et al.*, 1983).

A síntese de •NO é bloqueada pela inibição do sítio ativo da eNOS com análogos da L-arginina, como por exemplo a dimetilarginina assimétrica (ADMA), um aminoácido encontrado em vários tecidos e no plasma (Yamagishi & Matsui, 2011). A L-arginina e a ADMA estão inversamente relacionadas com a função endotelial. Cooke (2005) demonstrou que o aumento na produção de ADMA parece ser um fator de risco cardiovascular ligado a diversas doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial. Além da importante função como vasodilatador endógeno, o •NO também exerce muitas outras funções, incluindo a regulação do crescimento da parede vascular, através da inibição da proliferação de células musculares lisas, da produção basal de colágeno, da divisão celular e da produção de matriz extracelular estimuladas pela ET-1 e/ou ANG II, além de estimular a apoptose, através de mecanismos dependentes do GMPc (Pollman *et al.*, 1996).

Taddei *et al.* (2001) demonstraram que o envelhecimento induz redução na produção de •NO e disfunção endotelial, independente de outros fatores de risco. Todavia, segundo Assar *et al.* (2013), o endotélio de indivíduos idosos produz •NO suficiente para atingir o relaxamento completo da vasculatura mesentérica, porém seu efeito é parcialmente contrabalançado por fatores vasoconstritores derivados da COX e por espécies reativas de oxigênio (EROS), provavelmente ânions superóxidos, os quais também são produzidos pelas células endoteliais. O •NO é um importante marcador da homeostasia e o prejuízo na sua biodisponibilidade é observado na hipertensão, diabetes e aterosclerose (Lerman & Zeiher, 2005). O envelhecimento também pode prejudicar a funcionalidade da eNOS por diversos mecanismos. Em artérias de ratos, foi encontrada menor expressão desta enzima, além da resistência à oxidação estar diminuída e a resposta do músculo liso vascular ao •NO apresentar-se aparentemente diminuída com o avançar da idade (Wu *et al.*, 2007). E esta

redução na expressão é atribuída parcialmente a diminuição da L-arginina, principal substrato da eNOS, que é degradada pela arginase II (Santhanam *et al.*, 2008).

No envelhecimento, a atividade e expressão da arginase II está aumentada, o que acarreta na menor atividade da eNOS e reduzida síntese de •NO, contribuindo assim para a disfunção endotelial (Wu *et al.*, 2014). Além da L-arginina, a BH₄, importante cofator da atividade da eNOS, também está envolvido na disfunção endotelial relacionada com a idade (Higashi *et al.*, 2006). Este cofator é degradado rapidamente com o aumento do estresse oxidativo, levando à deficiência da atividade da eNOS, enquanto que sua administração exógena melhora a vasodilatação dependente do endotélio, prejudicada pelo envelhecimento (Higashi *et al.*, 2006). A diminuição da atividade da eNOS relacionada com a idade está intimamente ligada com a disfunção microvascular e com o prejuízo da contratilidade ventricular em pacientes idosos (O'Rourke *et al.*, 2010).

Prostaciclina (PGI₂)

A Prostaciclina (PGI₂) é um membro da família das prostaglandinas derivadas do ácido araquidônico. É a principal prostaglandina produzida pelas células endoteliais, quando sobre estas atuam fatores mecânicos, tais como pressão pulsátil, substâncias endógenas derivadas do plasma (bradicinina e trombina), ou produzidas por plaquetas ativadas, destacando-se a serotonina, o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e interleucina-1 (Moncada *et al.*, 1978). A produção da PGI₂ inicia-se com a liberação de ácido araquidônico a partir dos fosfolipídeos da membrana citoplasmática por ação da fosfolipase A₂ (PLA₂). Através da reação catalisada pela COX formam-se os endoperóxidos PGG₂ e PGH₂ (Needleman *et al.*, 1986). Por último, através da ação da prostaciclina sintetase origina a PGI₂ (Needleman *et al.*, 1986).

Existem duas isoenzimas da COX: a COX-1 e a COX-2, que são enzimas associadas à membrana. A isoforma constitutiva, COX-1, induz a produção de prostaglandinas envolvidas na regulação de funções fisiológicas como citoproteção da mucosa gástrica, homeostasia renal e função plaquetária. A segunda isoforma, a COX-2, codificada por um gene diferente, é expressa em resposta a estímulos inflamatórios e mitogênicos, sendo, portanto responsável pela formação das prostaglandinas associadas à resposta inflamatória (Vane *et al.*, 1998; Félétou *et al.*, 2010). Em determinadas condições, tais como o processo de envelhecimento e

inflamação, a COX-2, pode ser expressa em células endoteliais e do músculo liso vascular, participando das contrações dependentes do endotélio (Shi *et al.*, 2008).

No entanto, grande parte da PGI₂ produzida *in vivo*, principalmente as produzidas na vasculatura pulmonar e sistêmica, parecem ser derivadas da COX-2 (Catella-Lawson *et al.*, 1999; MCadam *et al.*, 1999). Esta prostaglandina é instável ao pH fisiológico e possui tempo de meia-vida curto (<2min), transformando-se rapidamente na forma inativa 6-keto-prostaglandina F_{1α} (6-keto-PGF_{1α}; Lewis & Dollery, 1983; Smyth & Fitzgerald, 2002). As ações desta prostaglandina são mediadas via receptor acoplado à proteína G (GPCR), conhecido como receptor IP. Este receptor está acoplado à subunidade G_s da proteína G heterotrimétrica e medeia a ativação da adenilil ciclase, aumentando os níveis de AMPc (Boie *et al.*, 1994), e a estimulação da proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA) no músculo liso vascular. A PKA tem um efeito semelhante à PKG, podendo ativar canais para K⁺, induzindo hiperpolarização e estimulando assim a saída de Ca²⁺ do citosol, inibindo a contração (Carvalho *et al.*, 2001).

A PGI₂ possui diversos efeitos fisiológicos; na vasculatura possui efeito vasodilatador potente e é inibidora da agregação plaquetária (Smyth *et al.*, 2009). A PGI₂ inibe ainda a proliferação da célula muscular lisa vascular e a desdiferenciação (Fetalvero *et al.*, 2006; Fetalvero *et al.*, 2007), estimula as enzimas que metabolizam ésteres de colesterol nos miócitos lisos vasculares, suprime o acúmulo destes lipídeos ao promover a sua fagocitose por macrófagos (inibe a aterogênese) e impede a liberação de fatores de crescimento que acarretam na hipertrofia da camada muscular da parede dos vasos (Fetalvero *et al.*, 2007). Existem condições, algumas das quais patológicas, em que ocorre diminuição da capacidade de produção de PGI₂ pelo endotélio, aumentando o risco de trombose ou desenvolvimento de aterosclerose. Dentro destas salientam-se o diabetes mellitus, o tabagismo, a aterosclerose e o envelhecimento (Dyerberg *et al.*, 1978; Wang *et al.*, 1989; Saito *et al.*, 1997).

Em aorta de animais idosos, a expressão do RNA mensageiro da PGI₂ não diminuiu devido à idade, contudo a capacidade das células endoteliais de produzir esta prostaglandina vasodilatadora está reduzida (Nakajima *et al.*, 1997). Adicionalmente, pesquisas mostram a diminuição da expressão do RNA mensageiro do receptor da PGI₂ no músculo liso vascular de animais idosos, enfatizando a contribuição da PGI₂ sobre o relaxamento dependente do endotélio pode reduzir com a idade (Numaguchi *et al.*, 1999).

Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)

Outro fator vasodilatador liberado pelas células endoteliais é o Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDHF). Diversos estudos têm especulado a natureza do EDHF, o qual causa hiperpolarização das células do músculo liso vascular independente dos efeitos hiperpolarizantes do $\bullet\text{NO}$ ou da PGI_2 (Shimokawa, 2010). Dentre os possíveis EDHFs encontram-se o monóxido de carbono (CO), o sulfeto de hidrogênio (H_2S), EROS, metabólitos do ácido araquidônico e os derivados do metabolismo da COX, da lipooxigenase (LOX) e da monooxigenase citocromo P450 (Félétou & Vanhoutte, 2005).

A hiperpolarização reduz o influxo de Ca^{2+} pela diminuição da abertura dos canais para Ca^{2+} dependente de voltagem (VOCC) ou pela redução da liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (Nelson *et al.*, 1990; Bolton *et al.*, 2002; Del Valle-Rodriguez *et al.*, 2003), resultando em redução da concentração deste íon no citoplasma da célula e em relaxamento vascular (Busse *et al.*, 2002). Em contrapartida, a despolarização das células musculares lisas vasculares provoca contração abrindo VOCC e favorecendo liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (Félétou & Vanhoutte, 2009). Os canais para potássio (K^+), em especial os canais para K^+ ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}), são importantes proteínas na regulação de eventos elétricos da membrana (Nelson & Quayle, 1995); nas células endoteliais, eles contribuem para o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} e, por conseguinte, regulam a liberação de fatores vasoativos derivados do endotélio. Além disso, estes canais são os principais constituintes moleculares na geração de substâncias hiperpolarizantes derivadas do endotélio e nas respostas mediadas pelo EDHF (Félétou & Vanhoutte, 2005; Ledoux *et al.*, 2006).

A família dos canais K_{Ca} é dividida em três subfamílias: canais para K_{Ca} de alta (BK_{Ca}), intermediária (IK_{Ca}) e baixa (SK_{Ca}) condutância. Os canais IK_{Ca} e SK_{Ca} desempenham papel chave na resposta mediada pelo EDHF (Stankevicius *et al.*, 2006; Sheng & Braun, 2007). Ambos apresentam distribuição subcelular distinta, sendo que os canais SK_{Ca} são amplamente expressos ao longo da membrana plasmática, enquanto os IK_{Ca} são preferencialmente localizados nos locais de projeções endoteliais frequentemente associados com junções GAP mioendoteliais (Sandow *et al.*, 2006). Em ratos, o número de junções GAP mioendoteliais e a expressão dos canais SK_{Ca} e IK_{Ca} aumentam com a redução do diâmetro das artérias (Sandow & Hill, 2000; Hilgers *et al.*, 2006), um fenômeno que está associado com o aumento na contribuição da resposta mediada por EDHF no relaxamento dependente do endotélio (Hwa *et al.*, 1994; Shimokawa *et al.*, 1996).

As respostas mediadas pelo EDHF estão alteradas no envelhecimento e em diversas doenças cardiovasculares (Félétou & Vanhoutte, 2009). A contribuição destes fatores na vasodilatação de artérias de humanos tem sido demonstrada em diversas regiões vasculares, tais como artérias coronárias (Nakashima *et al.*, 1993), microvasos omentais e subcutâneos (Pascoal & Umans, 1996; Mackenzie *et al.*, 2008) e artérias de resistência peniana (Angulo *et al.*, 2003). O prejuízo na vasodilatação mediada pelo EDHF tem sido observado em artérias mesentéricas (Goto *et al.*, 2004) e renais (Long *et al.*, 2005) de ratos idosos. Este prejuízo foi atribuído ao aumento na regulação do sistema renina-angiotensina (RAS), uma vez que a inibição crônica da enzima conversora de angiotensina (ECA), bem como o bloqueio do receptor de angiotensina II tipo 1 (AT₁), restaurou a resposta a estes fatores hiperpolarizantes em artérias mesentéricas de ratos idosos (Goto *et al.*, 2004).

Khodja *et al.* (2012) observaram danos na vasodilatação mediada por EDHF nas artérias mesentéricas de ratos com 46 semanas de idade, o que estaria associado ao aumento da expressão do receptor AT₁, reduzida expressão do receptor AT₂ e aumento da ECA. Assim como em modelos de hipertensão induzidos por ANG II (Hilgers & Webb, 2007), o prejuízo dos componentes do EDHF na vasodilatação dependente do endotélio relacionado com a idade envolve a diminuição da expressão dos canais para IK_{Ca} e SK_{Ca} (Khodja *et al.*, 2012), já os canais para K⁺ dependente de Ca²⁺ de alta condutância (BKCa) se apresentam reduzidos em artérias coronarianas de ratos idosos (Albarwani *et al.*, 2010).

2.4.2. Fatores vasoconstritores derivados do endotélio

Além dos fatores vasodilatadores, o endotélio sintetiza substâncias vasoconstritoras, nomeadas de fatores de contração derivado do endotélio (EDCFs), incluindo os produtos derivados do metabolismo do ácido araquidônico pela COX (prostanoides), a endotelina, a angiotensina II e os ânions superóxidos.

Prostanoides

Os prostanoides são derivados do metabolismo do ácido araquidônico e incluem as prostaglandinas e o tromboxano. Os mais comuns são: prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) e o tromboxano A₂ (TxA₂). Como citado anteriormente, após a conversão de PGG₂ em PGH₂, os prostanoides são formados pela

ação de sintases específicas. Estes produtos gerados podem variar de acordo com cada tecido e são determinados primariamente pela quantidade de sintases expressas em cada local (Bos *et al.*, 2004). O ácido araquidônico ainda pode ser oxidado pelas LOX e originar o ácido 15-s-hidroxieicosatetraenoico (15-HETE), uma substância capaz de produzir contração vascular (Vanhoutte & Eber, 1991). Há diversos prostanoides derivados da via ácido araquidônico-COX, como foram citados anteriormente. Cada substância exerce sua função através de sua ligação a receptores específicos. Estes são receptores acoplados à proteínas G_s (estimulatória) ou G_i (inibitória), que quando são ativados estimulam ou inibem vias de sinalização intracelular (Félétou *et al.*, 2010). Os prostanoides vasoconstritores mais comuns são a PGE_2 , a $PGF_{2\alpha}$ e o TxA_2 . Estes se ligam a receptores específicos chamados EP, FP e TP, respectivamente. Esta ligação ativa a fosfolipase C (PLC) formando segundos mensageiros, como inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG), que ativa a mobilização do Ca^{2+} intracelular e a proteína quinase C (PKC), dando lugar à contração (Bos *et al.*, 2004).

O TxA_2 é sintetizado a partir da ação da enzima TxA_2 -sintetase (TXS) sobre a PGH_2 , e é considerado o principal produto final do metabolismo do ácido araquidônico formado pelas plaquetas (Sellers & Stallone, 2008). Os efeitos do TxA_2 são mediados pelo receptor TP e incluem além de vasoconstrição, agregação plaquetária, aumento da expressão de moléculas de adesão e da infiltração de macrófagos através da modulação de receptores do tipo tirosina quinase (Fonlupt *et al.*, 1991; Nakahata, 2008). Os receptores TP são expressos em vários tecidos, incluindo plaquetas, cérebro, células musculares lisas e endoteliais, entre outros (Bos *et al.*, 2004). Nas células musculares lisas, a transdução de sinal deste prostanoide envolve uma proteína G_q , estimulando a PLC, o que promove aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} resultando em vasoconstrição (Mayeux *et al.*, 1989). Há duas isoformas para o receptor TP em tecidos humanos, mas não em roedores: $TP\alpha$ e $TP\beta$, os quais diferem apenas nas suas porções C-terminais (Hirata *et al.*, 1996).

A liberação tanto de TxA_2 como de outras prostaglandinas pelas células endoteliais ocorre através da ação de agonistas vasoconstritores (serotonina, fenilefrina, noradrenalina, ET-1, ANG II), vasodilatadores (bradicinina, acetilcolina) e por estímulos mecânicos (Taddei & Vanhoutte, 1993). Pesquisas recentes têm demonstrado que EROS são capazes de aumentar a densidade de receptores TP na membrana de células musculares lisas (Valentin *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2009) e, ainda, a ativação de receptores TP reduz a produção de $\bullet NO$ em células endoteliais (Liu *et al.*, 2009; Xavier *et al.*, 2009), podendo provocar prejuízo na função

endotelial, mostrando a importância deste prostanoide no desenvolvimento de distúrbios vasculares.

Vários estudos relataram que em artérias de ratos idosos o TxA_2 está aumentado em até 2-5 vezes e o RNA mensageiro da TXS está aumentado em 4 vezes quando comparados com ratos jovens (Martin, 1984; Matz *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2007; Tang & Vanhoutte, 2008), apesar de o envelhecimento não ter alterado a expressão do RNA mensageiro do receptor TP (Tang & Vanhoutte, 2008). Em contrapartida, existem relatos de estudos como de Heymes (2000) que mostra não haver diferença significativa na liberação de TxA_2 em aortas de ratos jovens e idosos. Um aumento na produção deste prostanoide em nível sistêmico foi encontrado em pacientes e modelos animais de várias doenças cardiovasculares, tais como angina instável (Fitzgerald *et al.*, 1986), isquemia do miocárdio e infarto (Shinmura *et al.*, 2005), vasoespasma cerebral, hipertensão induzida na gravidez (Fitzgerald *et al.*, 1990; Keith *et al.*, 1993) e cardiopatia congênita (Adata *et al.*, 1993).

A PGE_2 é a prostaglandina mais abundante do organismo (Serhan & Levy, 2003), produzido por diversas células como fibroblastos, leucócitos e células renais. Pode ser sintetizada por três tipos de Prostaglandinas E sintetase (PGES), a PGES citosólica (cPGES) e duas PGES membranares, mPGES1 e mPGES2 (Hara *et al.*, 2010), sendo a mPGE1 a principal responsável pela produção da PGE_2 . De uma forma geral, as prostaglandinas da série E têm uma ampla capacidade de promover resposta imunológica, vasodilatação ou vasoconstrição, inibição ou ativação da proliferação celular, proteção da mucosa gástrica e inibição da secreção ácida do estômago, entre outras. Estes efeitos resultam da ativação de diferentes tipos de receptores denominados: EP_1 , EP_2 , EP_3 e EP_4 (Sugimoto & Narumiya, 2007).

Todos estes receptores possuem arquitetura de sete domínios transmembrana, característica de receptores acoplados a proteína G, apesar de cada um deles ser codificado por um gene distinto e promover respostas celulares através da ativação de diferentes tipos de proteína G (Coleman *et al.*, 1994). No sistema vascular, os subtipos EP_1 e EP_3 induzem vasoconstrição, a qual ocorre através da ativação da via do $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ (receptor EP_1) ou da redução dos níveis intracelulares de AMPc (receptor EP_3) por inibição da adenilil ciclase (Funk *et al.*, 1993; Coleman *et al.*, 1994). A ligação da PGE_2 aos receptores EP_2 e EP_4 promove vasodilatação através da elevação nos níveis de AMPc via ativação da adenilil ciclase (Coleman *et al.*, 1994).

Existem poucas informações disponíveis sobre possíveis alterações da PGE₂, PGES ou receptores EP com o avanço da idade. Tang & Vanhoutte (2008) demonstraram que enquanto a cPGES e mPGES1 não sofreram alteração em células endoteliais de aorta de ratos idosos, a expressão do RNAm da mPGES2 nestes ratos é 5 vezes maior, o que pode presumivelmente resultar no aumento dos níveis de PGE₂. O nível de PGE₂ se mostrou aumentado nas artérias coronárias de ratos idosos quando comparado com ratos jovens (Ishihata *et al.*, 2005) e a expressão de receptor EP₁ e EP₄ está aumentada em artérias de ratos com 72 semanas de idade quando comparados com ratos de 36 semanas. O aumento na expressão do receptor EP₄ nas artérias de ratos idosos poderia funcionar como um sistema compensatório na regulação do tônus vascular local (Tang & Vanhoutte, 2008).

A PGF_{2α}, outro prostanoide vasoconstritor, é formada a partir da PGH₂ através da PGF_{2α}-sintetase (PGFS) e representa uma das principais prostaglandinas vasoconstritoras derivadas do ácido araquidônico. No sistema vascular, este prostanoide atua predominantemente através do receptor FP expresso no músculo liso vascular e no endotélio (Fukunaga *et al.*, 1993; Abramovitz *et al.*, 1994; Lake *et al.*, 1994; Sugimoto *et al.*, 1994; Sakamoto *et al.*, 1995), podendo também interagir com o receptor TP (Gluais *et al.*, 2005). A PGF_{2α} participa da regulação do tônus vascular, a partir da interação entre esta prostaglandina e seu respectivo receptor provocando aumento do Ca²⁺ intracelular e assim resultando em vasoconstrição potente (Csepli & Csapo, 1975; Hata & Breyer, 2004; Smyth *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2009). O receptor FP, acoplado à proteína G, estimula a via do IP₃/Ca²⁺ produzindo contração da musculatura lisa (Pierce *et al.*, 1999).

Tang e Vanhoutte (2008) demonstraram que a expressão do RNA mensageiro da PGFS está elevada em aorta de ratos idosos, quando comparados com ratos jovens. Corroborando com estes dados, Wong *et al.* (2009) relataram que níveis de PGF_{2α} também estão elevados em hamster idosos, e que a contração dependente do endotélio é mediada por esta prostaglandina produzida a partir do metabolismo da COX-2. Contudo, não foi encontrado alterações no RNA mensageiro do receptor FP nas células endoteliais de aortas de ratos idosos (Tang & Vanhoutte, 2008).

Endotelinas (ETs)

A ET foi inicialmente isolada e identificada em culturas de células endoteliais suínas, mostrando-se um potente peptídeo vasoconstritor composto por 21 resíduos de aminoácidos

(Yanagisawa *et al.*, 1988). Em condições normais, as ETs não agem como hormônios circulantes, mas sim como fatores autócrinos e parácrinos em vários alvos no organismo. Há três isoformas endógenas de endotelinas, chamadas de ET-1, ET-2 e ET-3 (Inoue *et al.*, 1989). Os precursores das ETs são processados por duas proteases para criar a forma ativa. As pré-pró-endotelinas, com aproximadamente 200 resíduos, são clivadas por peptidases, formando intermediários biologicamente inativos denominados de *big*-endotelinas (*big* ETs), estas são clivadas por enzimas conversoras de endotelinas (ECE), formando o produto final, a endotelina-1 (D'Orléans-Juste *et al.*, 2002). As células endoteliais são a maior fonte de ET, com predominância da isoforma ET-1, contudo, outros tecidos podem também sintetizá-la, incluindo células do músculo liso vascular, queratinócitos, macrófagos, glândulas mamárias, endométrio, placenta, algumas células nervosas e glândulas endócrinas (Stjernquist, 1998).

A ET atua especificamente em receptores no músculo liso vascular, cujos subtipos são: ET_A e ET_B, já nas células endoteliais atuam no subtipo ET_B (Tirapelli *et al.*, 2005). Ambos os receptores estão acoplados à proteína G, ativando assim a PLC, levando ao aumento dos níveis intracelulares de Ca²⁺ e da fosforilação da miosina quinase que resulta em contração duradoura do músculo liso (Lüscher & Barton, 2000) e vasoconstrição (Seo *et al.*, 1994; Haynes *et al.*, 1995). Já a ativação do receptor ET_B pela ET-1 nas células endoteliais promove ativação da eNOS e, como consequência, vasodilatação (Tsukahara *et al.*, 1994).

Em artérias de ratos idosos foi demonstrado um aumento na resposta contrátil à ET-1 (Donato *et al.*, 2005; Korzick *et al.*, 2005), enquanto o bloqueio do receptor ET_A parece reverter o prejuízo do relaxamento dependente do endotélio em artérias carótidas de camundongos idosos (Donato *et al.*, 2009). Já em humanos, o envelhecimento está associado com a elevação dos níveis plasmáticos de ET-1 (Maeda *et al.*, 2003; Donato *et al.*, 2009) e com a atenuação da vasoconstrição induzida por ET-1 no leito do antebraço (Van Guilder *et al.*, 2007). Além disso, foi observado um aumento do fluxo sanguíneo na perna de indivíduos idosos após o bloqueio dos receptores ET_A/ET_B quando comparados com indivíduos jovens, sugerindo elevação do tônus vasoconstritor mediado por ET-1 em artérias periféricas de idosos (Thijssen *et al.*, 2007). Além disso, a expressão deste peptídeo nas células endoteliais está correlacionada negativamente com a vasodilatação dependente do endotélio no antebraço (Donato *et al.*, 2009).

Angiotensina II (ANG II)

A ANG II, além de ser um hormônio que desempenha papel central na homeostase cardiovascular, regulando a pressão arterial e a vasoconstrição (Taubman, 2003; Wolf *et al.*, 2003), é uma citocina multifatorial que tem função mitogênica, pró-inflamatória e pró-fibrinogênica (Irigoyen *et al.*, 2005). A formação da ANG II a partir da ANG I ocorre no plasma e em vários tecidos, como rins, cérebro, glândulas adrenais, músculo liso vascular e também nas células endoteliais, a partir da conversão do angiotensinogênio em ANG I, o qual é subsequentemente convertido pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em ANG II. Esta última atua através de dois receptores AT₁ e AT₂ (Lemarié & Schiffrin, 2009; Stegbauer & Coffman, 2011).

A maioria dos efeitos biológicos da ANG II é mediada pela ativação de receptores AT₁, enquanto alguns efeitos, geralmente opostos aos induzidos pela ativação de AT₁, têm sido atribuídos à ativação de receptores AT₂ (Touyz & Berry, 2002). As suas principais ações são: contração e proliferação de células musculares lisas vasculares, aumento da contratilidade e indução de hipertrofia cardíaca, estimulação da secreção de aldosterona e consequente formação de colágeno e outros elementos da matriz extracelular, estimulação do sistema nervoso simpático e liberação de vasopressina (Berk *et al.*, 1989; Krieger *et al.*, 1998; Marrero *et al.*, 2005). A ANG II é um potente indutor da disfunção endotelial e do estresse oxidativo (Khodja *et al.*, 2012). Em ratos idosos, um inibidor da ECA ou antagonista do receptor AT₁ melhora a função endotelial nos vasos sanguíneos destes, em parte, por diminuição do estresse oxidativo (Goto *et al.*, 2000; Kansui *et al.*, 2002; Mukai *et al.*, 2002).

Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERONs)

As ERONs são moléculas produzidas e eliminadas fisiologicamente pela parede vascular de maneira controlada (Wassmann *et al.*, 2004), desempenhando papel chave na manutenção do tônus vascular e da pressão sanguínea (Ülker *et al.*, 2003). Esse conjunto de moléculas incluem o ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), e o peroxinitrito (ONOO^-). Ainda, pode-se incluir o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ozônio (O_3) e o ácido hipocloroso (HOCl), mesmo não sendo radicais livres, possui grande poder oxidante e contribuem assim para o estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 2007). Estas espécies reativas são produzidas no sistema vascular a partir de fontes endógenas e exógenas. As principais e mais importantes fontes endógenas incluem a COX, a LOX, o citocromo P450, a

mieloperoxidase (MPO), a xantina oxidase (XO), a NOS e a NAD(P)H-oxidase, sendo esta última uma das mais importantes fontes de ânion superóxido, tanto em células endoteliais como em células do músculo liso (Paravicini *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2003; Taniyama *et al.*, 2003). Além disso, o nível de produção deste ânion pela NAD(P)H oxidase determina a severidade da disfunção endotelial e permite caracterizar clinicamente e experimentalmente o perfil do risco cardiovascular (Guzik *et al.*, 2000).

Em condições normais, as EROs são inativadas por mecanismos de defesa antioxidante endógenos, tanto enzimático (isoformas cobre/zinco e manganês da superóxido dismutase – SOD, glutathione peroxidase – GP, catalase) como não enzimático (vitamina C, E, ácido úrico), prevenindo assim o possível desenvolvimento de danos tissulares. No entanto, em condições patológicas, o aumento nos níveis destas espécies reativas causa acúmulo de proteínas defeituosas, aumento da frequência de mutagênese, inflamação, menor biodisponibilidade do •NO, provocando disfunção endotelial (Rabêlo *et al.*, 2009; Malinin *et al.*, 2011). Este aumento devido ao desbalanço redox (estresse oxidativo) foi constatado em aorta, mesentérica, carótida e coronárias de ratos e camundongos com idade avançada, sugerindo que este prejuízo esteja associado ao envelhecimento, com aumento da atividade da NAD(P)H oxidase (Pacher *et al.*, 2007).

2.5. Fosfodiesterases

Como mencionado anteriormente, as alterações vasculares que ocorrem durante o envelhecimento podem contribuir para o desenvolvimento de eventos cardiovasculares. Estímulos físicos, como aumento do fluxo sanguíneo e da pressão arterial, podem desencadear liberação de moléculas vasodilatadoras pelo endotélio vascular, tais como •NO, PGI₂ e outras substâncias químicas que se difundem para o músculo liso causando aumento de segundos mensageiros, adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e guanosina monofosfato cíclico (GMPc), provocando vasodilatação. O AMPC e o GMPc regulam vários processos fisiológicos, incluindo transdução de sinal, proliferação celular e diferenciação, expressão gênica, inflamação, apoptose e vias metabólicas, tais como esteroidogênese, a secreção de insulina e a síntese de glicogênio, bem como glicogenólise, a lipogênese e a lipólise (Conti & Beavo, 2007; Francis *et al.*, 2011; Keravis & Lugnier, 2012). Uma vez sintetizado pela ação da adenilil ciclase ou guanilil ciclase, respectivamente, o AMPC e o GMPc traduzem informações codificadas de sinal atuando através de uma série de efetores celulares. Entre

estes estão as proteínas quinases ativadas por AMPc e por GMPc (proteína quinase A, PKA, ou proteína quinase G, PKG), respectivamente), canais iônicos dependentes de nucleotídeos cíclicos, proteínas EPACs (proteínas de troca diretamente ativadas por AMPc) e um grupo limitado de enzimas da família das fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (PDE) (Conti & Beavo, 2007; Francis *et al.*, 2011).

As PDEs são metalofosfohidrolases que catalisam a hidrólise dos nucleotídeos cíclicos, AMPc e/ou GMPc, gerando os correspondentes nucleotídeos AMP e GMP, dessa forma finalizando a via de sinalização dos nucleotídeos cíclicos (Beavo, 1995). Sabe-se até o momento que existem 11 famílias diferentes de PDE (PDE 1-11), tornando como base a sequência inicial de aminoácidos, a organização de domínios regulatórios e as características catalíticas e regulatórias. Cada família contém vários genes que através de processamento alternativo de RNA mensageiro gera em torno de 50 isoenzimas distintas (Beavo & Reifsnnyder, 1990; Beavo, 1995; Conti *et al.*, 1995; Manganiello & Degerman, 1999; Conti, 2000; Soderling & Beavo, 2000; Francis *et al.*, 2001). Existe um sistema de nomenclatura que permite a identificação das PDEs, como exemplo a “HSPDE4D3”, que identifica a enzima humana (HS, *Homo sapiens*) da família PDE-4 codificada pelo gene D, variante de processamento de RNA mensageiro número 3 (Beavo *et al.*, 1994).

As PDEs possuem diferentes especificidades e afinidades a seus substratos, os nucleotídeos cíclicos, algumas hidrolisam especificamente o AMPc (PDE-4, -7 e -8), enquanto outras o GMPc especificamente (PDE-5, -6 e -9) e algumas hidrolisam ambos (PDE 1, 2, 3, 10 e 11) (Maurice *et al.*, 2003; Jeon *et al.*, 2005). Além disso, as PDEs possuem características regulatórias distintas, sendo que algumas delas são ativadas ou inibidas pelos próprios nucleotídeos cíclicos. Por exemplo, a PDE-1 é ativada pela ligação Ca^{2+} /calmodulina, PDE-2 e -5 são ativadas por GMPc, PDE-3 e PDE-6 são inibidas por GMPc, enquanto que PDE-10 é inibida por AMPc (Conti & Beavo, 2007; Francis *et al.*, 2011). As famílias de PDEs possuem características semelhantes, com um núcleo catalítico altamente conservado, de aproximadamente 270 aminoácidos, localizado na porção C-terminal e domínios regulatórios localizados na região N-terminal (Conti, 2000; Omori & Kotera, 2007).

Os recentes avanços em estudos da farmacologia molecular das enzimas PDEs estão dando suporte à expectativa na aplicação de fármacos inibidores de segunda geração específicos destas enzimas para o tratamento de diversas doenças, dentre elas a hipertensão e

algumas desordens cardiovasculares. Sabendo que a hipertensão arterial é uma doença com alta incidência em indivíduos idosos, alterações na via do AMPc têm sido sugeridas como um mecanismo importante no desenvolvimento e manutenção do processo hipertensivo (Marcil *et al.*, 1997). Diante disto, fármacos inibidores de PDEs poderiam ser uma ferramenta importante para a prevenção de algumas desordens vasculares.

Por exemplo, a isoenzima PDE-4 é altamente expressa em quase todos os tipos de células, exceto nas plaquetas sanguíneas, e seus inibidores têm atividades anti-inflamatórias e antidepressivas, mas foram inicialmente desenvolvidos para o tratamento de DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica) e asma (Torphy, 1998; Rabe, 2011; Schudt *et al.*, 2011), e ainda têm sido testados em modelos de artrite reumatoide (Dyke & Montana, 1999). Já a PDE-5 desempenha um papel importante sobre o tônus da musculatura lisa vascular, e a sua inibição é útil no tratamento da disfunção erétil, resultando em aumento do GMPc com relaxamento da musculatura lisa vascular peniana (Ballard *et al.*, 1998). A expressão da isoenzima PDE-1 tem maior expressão no cérebro, mas também é encontrada no coração e no músculo esquelético, e sua inibição aumenta o fluxo sanguíneo cerebral e melhora a memória (Sonnenburg *et al.*, 1995).

Outro exemplo é a família da PDE-3, que possui dois genes, PDE-3A e PDE-3B. O RNA mensageiro da PDE-3A é mais expresso em vasos sanguíneos, coração, megacariócitos e oócitos (Reinhardt *et al.*, 1995), enquanto o RNA mensageiro da PDE-3B está mais expresso em hepatócitos, adipócitos, epitélio do ducto coletor renal e espermatozoides em desenvolvimento (Reinhardt *et al.*, 1995). Embora alguns tecidos possuam as duas isoformas, em células que expressam ambos os produtos dos genes de PDE-3, os níveis de PDE-3A são geralmente dominantes (Liu & Maurice, 1998; Manganiello & Degerman, 1999). Os inibidores desta isoenzima foram aprovados para o tratamento agudo em adultos com insuficiência cardíaca descompensada e refratária (Movsesian & Kukreja, 2011); utilizados no tratamento da claudicação intermitente, uma doença arterial periférica que atinge principalmente os membros inferiores, caracterizada por dores nas pernas induzidas por isquemia, através da vasodilatação mediada por AMPc e a inibição da ativação das plaquetas e da inflamação da parede vascular (Kambayashi *et al.*, 2007; Kanlop *et al.*, 2011). Desta forma, estas drogas se mostram capazes de melhorar a função endotelial, e geralmente fornecem benefícios na redução da morbidade e mortalidade em pacientes que sofrem de DCVs, principalmente a população de idosos.

2.6. Cilostazol

O cilostazol, um potente e seletivo inibidor da PDE-3, é um derivado quinolinônico, com efeitos farmacológicos que incluem inibição da ativação e agregação plaquetária, inibição de trombose (Kimura *et al.*, 1985), vasodilatação (Kambayashi *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2006), aumento do fluxo sanguíneo dos membros inferiores (Yasuda *et al.*, 1985), redução de triglicerídeos, aumento da lipoproteína de alta densidade do colesterol (Toyota *et al.*, 2001; Ikewaki *et al.*, 2002) e inibição do crescimento das células do músculo liso vascular (Tsuchikane *et al.*, 1998; Ishizaka *et al.*, 1999; Ahn *et al.*, 2001). O tempo de meia-vida é de aproximadamente 10 horas, e com administração repetitiva, resulta em acúmulo deste fármaco em até 2 vezes. A farmacocinética do cilostazol não é atingida pelos fatores idade e gênero em indivíduos saudáveis (Suri *et al.*, 1998).

A inibição da PDE-3 pelo cilostazol reduz a degradação do AMPc, ocasionando o aumento deste substrato nas plaquetas, nas células endoteliais e musculares lisas (Schrör, 2002), podendo ter ação preventiva no início e na progressão da aterosclerose, por exemplo. Quando isso ocorre na célula muscular lisa da parede arterial, existe uma redução do Ca^{2+} no seu interior, o que, em última análise, produz relaxamento celular e, conseqüentemente, vasodilatação. Já quando acontece no interior da plaqueta, há inibição das enzimas PLA_2 e COX, participantes da síntese do TxA_2 (elemento pró-agregante), o que resulta em antiagregação plaquetária (Igawa *et al.*, 1990; Rosa *et al.*, 2009). Por sua ação antitrombótica e vasodilatadora, o cilostazol tem sido utilizado no tratamento e/ou prevenção de algumas doenças de natureza isquêmica, a partir do aumento das concentrações intersticiais de adenosina ao inibir a recaptção de adenosina pelas células e ao ativar o Akt e a eNOS (Hashimoto *et al.*, 2006). Nas plaquetas, isto resulta na estimulação dos receptores de adenosina e aumento dos níveis de AMPc, melhorando as conseqüências da inibição da PDE (Liu *et al.*, 2000).

Além de inibir a agregação plaquetária, o cilostazol bloqueia a expressão superficial do receptor de fibrinogênio (GPIIb/IIIa), bem como a secreção da P-selectina, que está envolvida na mitogênese dependente de plaquetas (Inoue *et al.*, 1999), e este efeito parece contribuir para a inibição da reestenose. Ainda, atua inibindo o HB-EGF (fator de crescimento semelhante ao fator de crescimento epidermal ligado a heparina), um potente mitógeno das células do músculo liso vascular, mostrando desta forma sua atuação como um fator

antimitogênico (Kayanoki *et al.*, 1997). Em experimentos com ratos com injúria na artéria carótida, a aplicação local do cilostazol resultou em uma inibição marcada da proliferação da camada íntima (Ishizaka *et al.*, 1999), e em enxertos de veias de cães suprimiu a formação neointimal, que parece está relacionado com a inibição de ANG II (Takai *et al.*, 2001).

Em 2005, Park *et al.* publicaram um estudo sobre as ações anti-inflamatórias do cilostazol, relatando que este fármaco suprime a adesão de monócitos às células endoteliais de veias umbilicais humanas, efeito que estava associado à diminuição da expressão de VCAM-1 (molécula 1 de adesão da célula vascular), de MCP-1 (proteína-1 quimioatraente de monócito), da produção de EROS e do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB). Posteriormente, em 2009, este mesmo grupo demonstrou um efeito semelhante do cilostazol em camundongos portadores de diabetes tipo 2, mostrando que este diminui os níveis de TNF- α , uma importante citocina pró-inflamatória, assim como reduziu os níveis de VCAM-1 e de EROS (Park *et al.*, 2009). Corroborando com esses resultados, Lee *et al.* (2005) comprovaram em um modelo de aterosclerose, que o cilostazol apresentou atividade anti-inflamatória, antioxidante e, portanto, atividade antiaterosclerótica.

A ação anti-inflamatória deste inibidor também foi demonstrada em macrófagos ativados por LPS (lipopolissacarídeos derivados de bactérias), onde ele foi capaz de reduzir a expressão da iNOS e da COX-2 (Park *et al.*, 2011). E ainda, estes estudiosos relataram que a inibição da PDE-3 é capaz de ativar vários genes envolvidos no processo de sobrevivência neuronal induzida por lesão isquêmica através da via CREB (proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc). Alguns estudos mostram que inibidores da PDE-3 oferecem proteção às células endoteliais e ao tecido cerebral em modelos de isquemia focal, independentemente da atividade antiagregante (Choi *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003).

Em conjunto, essas ações podem fazer do cilostazol uma alternativa importante para prevenção/tratamento de desordens vasculares envolvendo alteração da função endotelial. Esta última é um processo com alta incidência em indivíduos idosos; apresenta etiologia variada e contribui para o desenvolvimento de vários distúrbios decorrentes do envelhecimento, como por exemplo, aqueles associados ao processo aterosclerótico.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Investigar o efeito da administração crônica do cilostazol sobre as consequências do envelhecimento na função vascular de ratos e os possíveis mecanismos envolvidos.

3.2. Específicos

- Analisar os efeitos do tratamento com cilostazol sobre a pressão arterial e frequência cardíaca.
- Analisar em artérias de condutância e de resistência destes animais se o tratamento com cilostazol é capaz de alterar:
 - O relaxamento dependente e independente do endotélio.
 - A resposta contrátil à fenilefrina e à noradrenalina em artérias aorta e mesentéricas de resistência, respectivamente.
- Definir a participação dos canais para K^+ ativados por Ca^{2+} na resposta vasorrelaxante em artérias mesentéricas induzida pelo cilostazol.
- Verificar a participação da via endotelial NO/GMPc neste efeito vasorrelaxante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOVITZ, M.; BOIE, Y.; NGUYEN, T.; RUSHMORE, T. H.; BAYNE, M. A.; METTERS, K. M.; SLIPETZ, D. M.; GRYGORCZYK, R. Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 2632-2636, 1994.

ADATIA, I.; BARROW, S. E.; STRATTON, P. D.; MIAL-ALLEN, V. M.; RITTER, J. M.; HAWORTH, S. G. Thromboxane A2 and prostacyclin biosynthesis in children and adolescents with pulmonary vascular disease. **Circulation**, v. 88, p. 2117-2122, 1993.

AHN, C. W.; LEE, H. C.; PARK, S. W.; SONG, Y. D.; HUH, K. B.; OH, S. J.; KIM, Y. S.; CHOI, Y. K.; KIM, J. M.; LEE, T. H. Decrease in carotid intima media thickness after 1 year of cilostazol treatment in patients with type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 52, p. 45-53, 2001.

ALBARWANI, S.; AL-SIYABI, S.; BAOMAR, H.; HASSAN, M.O. Exercise training attenuates ageing-induced BKCa channel downregulation in rat coronary arteries. **Exp. Physiol.**, v. 95, p. 746-755, 2010.

ALFRANCA, A.; IÑIGUEZ, M. A.; FRESNO, M.; REDONDO, J. M. Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: role in cardiovascular diseases. **Cardiov. Res.**, v. 70, p. 446-456, 2006.

ANDERSON, T. J.; GERHARD, M. D.; MEREDITH, I. T.; CHARBONNEAU, F.; DELAGRANGE, D.; CREAGER, M. A.; SELWYN, A. P.; GANZ, P. Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Am. J. Cardiol.**, v. 75, p. 71-74, 1995.

ANDREWS, G. Promoting health and function in ageing population. **B.M.J.**, v. 332, p. 728-729, 2001.

ÂNGULO, J.; CUEVAS, P.; FERNÁNDEZ, A.; GABANCHO, S.; VIDELA, S.; SÁENZ DE TEJADA, I. Calcium dobesilate potentiates endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation of human penile resistance arteries. **Br. J. Pharmacol.**, v. 139, p. 854-862, 2003.

ASSAR, M.; ANGULO, J; RODRÍGUEZ-MAÑAS, L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. **Free Radic. Biol. Med.**, n. 65, p. 380-401, 2013.

BALLARD, S. A.; GINGELL, C. J.; TANG, K.; TURNER, L. A.; PRICE, M. E.; NAYLOR, A. M. Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. **J. Urol.**, n. 159, p. 2164-2171, 1998.

BARODKA, V. M.; JOSHI, B. L.; BERKOWITZ, D. E.; HOGUE CW JR & ANDNYHAN D. Review article: implications of vascular aging. **Anesth. Analg.**, n. 112, p. 1048-1060, 2011.

BEAVO, J. A.; REIFSNEYDER, D. H. Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. **Trends Pharmacol. Sci.**, n. 11, p. 150-155, 1990.

BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. **Physiol. Rev.**, n. 75, p. 725-748, 1995.

BEAVO, J. A.; CONTI, M.; HEASLIP, R. J. Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Mol. Pharmacol.**, n. 46, p. 399-405, 1994.

BERK, B. C.; VEKSHTEIN, V.; GORDON, H. M.; TSUDA, T. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, n. 4, p. 305-314, 1989.

BERQUÓ, E. Algumas considerações demográficas sobre o envelhecimento da população no Brasil. Anais do I Seminário Internacional Envelhecimento populacional: uma agenda para o final do século. Brasília, 1996.

BATLOUNI, M. Endotélio e Hipertensão Arterial. **Rev. Bras. Hipertens.**, n. 8, p. 328-338, 2001.

BOIE, Y.; RUSHMORE, T. H.; DARMON-GOODWIN, A.; GRYGORCZYK, R.; SLIPETZ, D. M.; METTERS, K. M.; ABRAMOVITZ, M. Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor. **J. Biol. Chem.**, n. 269, p. 12173-12178, 1994.

BOLTON, T. B.; GORDIENKO, D. V.; PUCOVSKY, V.; PARSONS, S.; POVSTYAN, O. Calcium release events in excitation-contraction coupling in smooth muscle. **Novartis Found. Symp.**, n. 246, p.154-168, 2002.

BORDERS, J. L.; GRANGER, H. J. Power dissipation as a measure of peripheral resistance in vascular networks. **Hypertension**, n. 8, p. 184-191, 1986.

BORTOLOTTI, L. A.; HANON, O.; FRANCONI, G.; BOUTOUYRIE, P.; LEGRAIN, S.; GIRERD, X. The aging process modifies the distensibility of elastic but not muscular arteries. **Hypertension**, n. 34, p. 889-892, 1999.

BOS, C. L.; RICHEL, D. J.; RITSEMA, T.; PEPPELENBOSCH, M. P.; VERSTEEG, H. H. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, n. 36, p. 1187-1205, 2004.

BURT, V. L.; WHELTON, P.; ROCCELLA, E. J.; BROWN, C.; CUTLER, J. A.; HIGGINS M.; HORAN, M. J.; LABARTHE, D. Prevalence of hypertension in the US adult population: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Hypertension**, n. 25:305-313, 1995.

BUSCONI, L; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. **J. Biol. Chem.**, n. 268, p. 8410-8413, 1993.

BUSSE, R.; EDWARDS, G.; FÉLÉTOU, M.; FLEMING, I.; VANHOUTTE, P. M.; WESTON, A. H. EDHF: bringing the concepts together. **Trends Pharmacol. Sci.**, n. 23, p. 374-380, 2002.

CAI, H.; GRIENDLING, K. K.; HARRISON, D. G. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. **Trends Pharmacol. Sci.**, n. 24:471-8, 2003.

CAMPISI, J.; d'ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, n. 8, p.729-740, 2007.

CARVALHO, J. A. M.; GARCIA, R. A. O envelhecimento da população brasileira: um enfoque demográfico. **Caderno de Saúde Pública**, n. 19, p.725-733, 2003.

CARVALHO, M. H. C.; NIGRO, D.; LEMOS, V. S.; TOSTES, R. C. A.; FORTES, Z. B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Rev. Bras. Hipertens.**, n. 8, p. 76-88, 2001.

CATELLA-LAWSON, F.; MCADAM, B.; MORRISON, B. W.; KAPOOR, S.; KUJUBU, D.; ANTES, L.; LASSETER, K.C.; QUAN, H.; GERTZ, B. J.; FITZGERALD, G. A. Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, n. 289, p. 735-741, 1999.

CELERMAJER, D S.; SORENSEN, K. E.; SPIEGELHALTER, D. J.; GEORGAKOPOULOS, D.; ROBINSON, J.; DEANFIELD, J. E. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. **J. Am. Cell Cardiol.**, n. 24, p. 471-476, 1994.

CHEITLIN, M. Cardiovascular physiology: changes with aging. **Am. J. Geriatr. Cardiol.**, n.12, p. 9-13, 2003.

CHOI, J. M.; SHIN, H. K.; KIM, K. Y.; LEE, J. H.; HONG, K. W. Neuroprotective effect of cilostazol against focal cerebral ischemia via antiapoptotic action in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, n. 300, p. 787-793, 2002.

CHRISTENSEN, K. L.; MULVANY, M. J. Vasodilatation, not hypotension, improves resistance vessel design during treatment of essential hypertension: a literature survey. **J. Hypertens.**, n. 19, p. 1001-1006, 2001.

COLEMAN, R. A.; SMITH, W. L.; NARUMIYA, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacol. Rev.**, n. 46, p. 205-229, 1994.

CONE, J.; WANG, S.; TANDON, N.; FONG, M.; SUN, B; SAKURAI, K.; YOSHITAKE, M.; KAMBAYASHI, J.; LIU, Y. Comparison of the effects of cilostazol and milrinone on intracellular cAMP levels and cellular function in platelets and cardiac cells. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, n. 34, p. 497-504, 1999.

CONTI, M.; BEAVO, J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. **Annu. Rev. Biochem.**, n. 76, p. 481-511, 2007.

CONTI, M.; NEMOZ, G.; SETTE, C.; VICINI, E. Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases. **Endocr. Rev.**, n. 16, p. 370-389, 1995.

CONTI, M. Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells. **Mol. Endocrinol.**, n. 14, p. 1317-1327, 2000.

COOKE, J. P. ADMA: its role in vascular disease. **Vasc. Med.**, n. 1, p. 11-17, 2005.

CSEPLI, J.; CSAPO, A. I. The effect of the prostaglandin F2alpha analogue ICI 81008 on uterine small arteries and on blood pressure. **Prostaglandins**, n. 10, p. 689-697, 1975.

CUNHA, R. S.; FERREIRA, A. V. L. Sistema renina-angiotensina-aldosterona e lesão vascular hipertensiva. **Rev. Bras. Hipertens.**, n. 3, p. 282-292, 2000.

CUTLER, R. G.; MATTSON, M. P. The adversities of aging. **Ageing Res. Rev.**, n. 5, p. 221-238, 2006.

DAVIGNON, J.; GANZ, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation**, n. 109, p. 27-32, 2004.

DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P.; RABELINK, T. J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation**, n. 115, p. 1285-1295, 2007.

DEL VALLE-RODRIGUEZ, A.; LOPEZ-BARNEO, J.; URENA, J. Ca^{2+} channel-sarcoplasmic reticulum coupling: a mechanism of arterial myocyte contraction without Ca^{2+} influx. **EMBO J**, n. 22, p. 4337-4345, 2003.

DONATO, A. J.; GANO, L. B.; ESKURZA, I.; SILVER, A. E.; GATES, P. E.; JABLONSKI, K.; SEALS, D. R. Vascular endothelial dysfunction with aging: endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, n. 297, p. 425-432, 2009.

DONATO, A. J.; LESNIEWSKI, L. A.; DELP, M. D. The effects of aging and exercise training on endothelin-1 vasoconstrictor responses in rat skeletal muscle arterioles. **Cardiovasc. Res.**, n. 66, p. 393-401, 2005.

D'ORLÉANS-JUSTE, P.; LABONTÉ, J.; BKAILY, G.; CHOUFANI, S.; PLANTE, M.; HONORÉ, J. C. Function of the endothelin (B) receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology. **Pharmacol. Ther.**, n. 95, p. 221-238, 2002.

DUSSUE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, n. 39, p. 343-350, 2003.

DYERBERG, J.; BANG, H. O.; STOFFERSEN, E.; MONCADA, S.; VANE, JR. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis. **Lancet**, n. 2, p. 117-119, 1978.

DYKE, H. J.; MONTANA, J. G. The therapeutic potential of PDE4 inhibitors. **Expert. Opin. Investig. Drugs**, n. 8, p. 1301-1325, 1999.

FEIHL, F.; LIAUDET, L.; LEVY, B. I.; WAEBER, B. Hypertension and microvascular remodelling. **Cardiovasc. Res.**, n. 78, p. 274-285, 2008.

FÉLÉTOU, M. The Endothelium - Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2011.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. EDHF: an update. **Clin. Sci.** (Lond), n. 117, p. 139–155, 2009.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. EDHF: the Complete Story, Taylor & Francis, CRC press: Boca Raton, FL. 2005.

FÉLÉTOU, M.; HUANG, Y.; VANHOUTTE, P. M. Vasoconstrictor prostanoids. **Pflugers. Archviev.**, n. 459, p. 941-50, 2010.

FERRARA, N.; KOMICI, K.; CORBI, G.; PAGANO, G.; FURGI, G.; RENGO, C.; FEMMINELLA, G. D.; LEOSCO, D.; BONADUCE, D. β -adrenergic receptor responsiveness in aging heart and clinical implications. **Front. Physiol.**, n. 4, p. 396, 2014.

FERRARI, A.; RADAELLI, A.; CENTOULA, M. Aging and the cardiovascular system. **J. Appl. Physiol.**, n. 95, p. 2591-2597, 2003.

FETALVERO, K. M.; MARTIN, K. A.; HWA, J. Cardioprotective prostacyclin signaling in vascular smooth muscle. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, n. 82, p. 109–118, 2007.

FETALVERO, K. M.; SHYU, M.; NOMIKOS, A. P.; CHIU, Y. F.; WAGNER, R. J.; POWELL, R. J.; HWA, J.; MARTIN, K. A. The prostacyclin receptor induces human vascular smooth muscle cell differentiation via the protein kinase A pathway. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, n. 290, p. 1337–1346, 2006.

FITZGERALD, D. J.; ROCKI, W.; MURRAY, R.; MAYO, G.; FITZGERALD, G. A. Thromboxane A2 synthesis in pregnancy-induced hypertension. **Lancet**, n. 335, p. 751-754, 1990.

FITZGERALD, D. J.; ROY, L.; CATELLA, F.; FITZGERALD, G. A. Platelet activation in unstable coronary disease. **N. Engl. J. Med.**, n. 315, p. 983-989, 1986.

FLEG, J. L.; GERSTEBLITH, G.; ZONDERMAN, A. B.; BECKER, L. C.; WEISFELDT, M. T.; COSTA, P. T. JR.; LAKATTA, E. G. Prevalence and prognostic significance of exercise-induced silent myocardial ischemia detected by thallium scintigraphy and electrocardiography in asymptomatic volunteers. **Circulation**, n. 81, p. 428-436, 1990.

FLEG, J. L. Alterations in cardiovascular structure and function with advancing age. **Am. J. Cardiol.**, n. 57 p. 33-44, 1986.

FONLUPT, P.; CROSET, M.; LAGARDE, M. 12-HETE inhibits the binding of PGH₂/TXA₂ receptor ligands in human platelets. **Thromb. Res.**, n. 63, p. 239-248, 1991.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthase: regulation and function. **Eur. Heart J.**, n. 33, p. 829-837, 2012.

FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. **Pflugers. Arch.**, n. 459:923-939, 2010.

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

FRANKLIN, S. S.; GUSTIN, W. T.; WONG, N. D.; LARSON, M. G.; WEBER, M. A.; KANNEL, W. B.; LEVY, D. Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure. The Framingham Heart Study. **Circulation**, n. 96, p. 308-315, 1997.

FRANKLIN, S. S.; LARSON, M. G.; KHAN, S. A.; WONG, N. D.; LEIP, E. P.; KANNEL, W. B.; LEVY, D. Does the relation of blood pressure to coronary heart disease risk change with aging? The Framingham Heart Study. **Circulation**, n. 103, p. 1245-1249, 2001.

FUKUNAGA, M.; MAKITA, N.; ROBERTS, L. J.; MORROW, J. D.; TAKAHASHI, K.; BADR, K. F. Evidence for the existence of F2-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, n. 264, p. 1619-1624, 1993.

FUNK, C. D.; FURCI, L.; FITZGERALD, G. A.; GRYGORCZYK, R.; ROCHETTE, C.; BAYNE, M. A.; ABRAMOVITZ, M.; ADAM, M.; METTERS, K. M. Cloning and expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP1 subtype. **J. Biol. Chem.**, n. 268, p. 26767-26772, 1993.

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

GEWALTIG, M. T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. **Cardiovasc. Res.**, n. 55, p. 250-260, 2002.

GIACHELLI, C. M. Vascular calcification mechanisms. **J. Am. Soc. Nephrol.**, n. 15, p. 2959-2964, 2004.

GLAGOV, S. Morphologic and biochemical aspects of arteries and veins. In: ABRANSOM, D. I.; DOBRIN, P. B. Blood vessels and lymphatics in organ systems, London: Academic Press, 1984.

GLUAIS, P.; LONCHAMPT, M.; MORROW, J. D.; VANHOUTTE, P. M.; FELETOU, M. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. **Br. J. Pharmacol.**, n. 146 p. 834-845, 2005.

GOTO, K.; FUJII, K.; KANSUI, Y.; IIDA, M. Changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor in hypertension and ageing: response to chronic treatment with renin-angiotensin system inhibitors. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, n. 31, p. 650-655, 2004.

- GOTO, K.; FUJII, K.; ONAKA, U.; ABE, I.; FUJISHIMA, M. Angiotensin-converting enzyme inhibitor prevents age-related endothelial dysfunction. **Hypertension**, n. 36, p. 581-587, 2000.
- GUARENTE, L.; KENYON, C. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. **Nature**, n. 408, p. 255-262, 2000.
- GUIX, F. X.; URIBESALGO, I.; COMA, M.; MUÑOZ, F. J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Prog. Neurobiol.**, n. 76, p. 126-152, 2005.
- GUTTERMAN, D. D. Adventitia-dependent influences on vascular function. **Am. J. Physiol.**, n. 277, p. 1265-1272, 1999.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiología Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- GUZIK, T. J.; WEST, N. E.; BLACK, E.; MCDONALD, D.; RATNATUNGA, C.; PILLAI, R.; CHANNON, K. M. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. **Circ. Res.**, n. 86, p. 85-90, 2000.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Free Radicals in Biology and Medicine. **J. Lab. Clin. Med.**, Fourth Edition, n. 888, 2007.
- HARA, S.; KAMEI, D.; SASAKI, Y.; TANEMOTO, A.; NAKATANI, Y.; MURAKAMI, M. Prostaglandin E synthases: Understanding their pathophysiological roles through mouse genetic models. **Biochimie.**, n. 92, p. 651-669, 2010.
- HARRIS, D.; DOUGLAS, P. Enrollment of women in cardiovascular clinical trials funded by the National Heart, Lung and Blood Institute. **N. Engl. J. Med.**, n. 343, p. 475, 2000.
- HASHIMOTO, A.; MIYAKODA, G.; HIROSE, Y.; MORI, T. Activation of endothelial nitric oxide synthase by cilostazol via a cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism. **Atherosclerosis**, n. 189, p. 350-357, 2006.
- HATA, A. N.; BREYER, R. M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. **Pharmacol. Ther.**, n. 103, p. 147-166, 2004.
- HAYNES, W. G.; STRACHAN, F. E.; WEBB, D. J. Endothelin ETA and ETB receptors cause vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. **Circulation**, n. 92, p. 357-363, 1995.
- HEYMES, C.; HABIB, A.; YANG, D.; MATHIEU, E.; MAROTTE, F.; SAMUEL, J.; BOULANGER, C. M. Cyclo-oxygenase-1 and -2 contribution to endothelial dysfunction in ageing. **Br. J. Pharmacol.**, n. 131, p. 804-810, 2000.
- HIGASHI, Y.; SASAKI, S.; NAKAGAWA, K.; KIMURA, M.; NOMA, K.; HARA, K.; JITSUIKI, D.; GOTO, C.; OSHIMA, T.; CHAYAMA, K.; YOSHIKUNI, M. Tetrahydrobiopterin improves aging-related impairment of endothelium-dependent

vasodilation through increase in nitric oxide production. **Atherosclerosis**, n. 186, p. 390-395, 2006.

HILGERS, R. H.; WEBB, R. C. Reduced expression of SKCa and IKCa channel proteins in rat small mesenteric arteries during angiotensin II-induced hypertension. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, n. 292, p. 2275-2284, 2007.

HILGERS, R. H.; TODD, J. JR.; WEBB, R. C. Regional heterogeneity in acetylcholine-induced relaxation in rat vascular bed: role of calcium-activated K⁺ channels. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, n. 291, p. 216-222, 2006.

HIRATA, T.; USHIKUBI, F.; KAKIZUKA, A.; OKUMA, M.; NARUMIYA, S. Two thromboxane A2 receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. **J. Clin. Invest.**, n. 97, p. 949-956, 1996.

HONGO, K.; NAKAGOMI, T.; KASSELL, N. F.; SASAKI, T.; LEHMAN, M.; VOLLMER, D. G.; TSUKAHARA, T.; OGAWA, H.; TORNER, J. Effects of aging and hypertension on endothelium-dependent vascular relaxation in rat carotid artery. **Stroke**, n. 19, p. 892-897, 1988.

HORI, A.; SHIBATA, R.; MORISAKI, K.; MUROHARA, T.; KOMORI, K. Cilostazol stimulates revascularization in response to ischaemia via an eNOS-dependent mechanism. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, n. 43, p. 62-65, 2012.

HWA, J. J.; GHIBAUDI, L.; WILLIAMS, P.; CHATTERJEE, M. Comparison of acetylcholine-dependent relaxation in large and small arteries of rat mesenteric vascular bed. **Am. J. Physiol.**, n. 266, p. 952-958, 1994.

IGAWA, T.; TANI, T.; CHIJIWA, T.; SHIRAGIKU, T.; SHIMIDZU, S.; KAWAMURA, K.; KATO, S.; UNEMI, F.; KIMURA, Y. Potentiation of anti-platelet aggregating activity of cilostazol with vascular endothelial cells. **Thromb. Res.**, n. 57, p. 617-623, 1990.

IKEWAKI, K.; MOCHIZUKI, K.; IWASAKI, M.; NISHIDE, R.; MOCHIZUKI, S.; TADA, N. Cilostazol, a potent phosphodiesterase type III inhibitor, selectively increases antiatherogenic high-density lipoprotein subclass LpA-I and improves postprandial lipemia in patients with type 2 diabetes mellitus. **Metabolism**, n. 51, p. 1348-1354, 2002.

INOUE, A.; YANAGISAWA, M.; KIMURA, S.; KASUYA, Y.; MIYAUCHI, T.; GOTO, K.; MASAKI, T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, n. 86, p. 2863-2867, 1989.

INOUE, T.; SOHMA, R.; MOROOKA, S. Cilostazol inhibits the expression of activation-dependent membrane surface glycoprotein on the surface of platelets stimulated in vitro. **Thromb. Res.**, n. 93, p. 137-143, 1999.

IRIGOYEN, M. C. et al. Fisiopatologia da Hipertensão Arterial. In: NOBRE F; SERRANO JUNIOR CV (Eds.) Tratado de cardiologia SOCESP. São Paulo: Editora Manole. n. 3, p. 1850, 2005.

ISHIHATA, A.; OGAKI, T.; AITA, T.; KATANO, Y. Role of prostaglandins in urotensin II-induced vasodilatation in the coronary arteries of aged rats. **Eur. J. Pharmacol.**, n. 523, p:119-126, 2005.

ISHIZAKA, N.; TAGUCHI, J.; KIMURA, Y.; IKARI, Y.; AIZAWA, T.; TOGO, M.; MIKI, K.; KUROKAWA, K.; OHNO, M. Effects of a single local administration of cilostazol on neointimal formation in balloon-injured rat carotid artery. **Atherosclerosis**, n. 142, p. 41-46, 1999.

ISHIZUKA, M. A. Avaliação e comparação dos fatores intrínsecos dos riscos de quedas em idosos com diferentes estados funcionais [dissertação]. Campinas: Faculdade de Educação, Programa de Pós-graduação em Gerontologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); 2003.

JEON, Y. H.; HEO, Y. S.; KIM, C. M.; HYUN, Y. L.; LEE, T. G.; RO, S.; CHO, J. M. Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development. **Cell Mol. Life Sci.**, n. 62, p. 1198-1220, 2005.

KAMBAYASHI, J.; LIU, Y.; SUN, B.; SHAKUR, Y.; YOSHITAKE, M.; CZERWIEC, F. Cilostazol as a unique antithrombotic agent. **Curr. Pharm. Des.**, n. 9, p. 2289-2302, 2003.

KAMBAYASHI, J.; SHAKUR, Y.; LIU, Y. In: Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Health and Disease (eds BEAVO, J.; FRANCIS, S.; HOUSLAY, M.), p. 627-648, 2007.

KANG, K. B.; RAJANAYAGAM, M. A.; VAN DER ZYPP, A.; MAJEWSKI, H. A role for cyclooxygenase in aging-related changes of beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat aortas. **Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.**, n. 375, p. 273-281, 2007.

KANLOP, N.; CHATTIPAKORN, S.; CHATTIPAKORN, N. Effects of cilostazol in the heart. **J. Cardiovasc. Med. (Hagerstown)**, n. 12, p. 88-95, 2011.

KANSUI, Y.; FUJII, K.; GOTO, K.; ABE, I.; IIDA, M. Angiotensin II receptor antagonist improves age-related endothelial dysfunction. **J. Hypertens.**, n. 20, p. 439-446, 2002.

KAYANOKI, Y.; CHE, W.; KAWATA, S.; MATSUZAMA, Y.; HIGASHIYAMA, S.; TANIGUCHI, N. The effect of cilostazol, a cyclic nucleotide phosphodiesterase III inhibitor, on heparin-binding EGF-like growth factor expression in macrophages and vascular smooth muscle cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, n. 238, p. 478-481, 1997.

KEITH, J. C. JR.; SPITZ, B.; VAN ASSCHE, F. A. Thromboxane synthetase inhibition as a new therapy for preeclampsia: animal and human studies minireview. **Prostaglandins**, n. 45, p. 3-13, 1993.

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

KHODJA, N.; CHATAIGNEAU, T.; AUGER, C.; SCHINI-KERTH, V. B. Grape-derived polyphenols improve aging-related endothelial dysfunction in rat mesenteric artery: role of oxidative stress and the angiotensin system. **PLoS One**, n. 7, p. 32039, 2012.

KIMURA, Y.; TANI, T.; KANBE, T.; WATANABE, K. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. **Arzneimittelforschung**, n. 35, p. 1144-1149, 1985.

KLABUNDE, R. E. Cardiovascular Physiology Concepts. Philadelphia, Published by Lippencott Williams and Wilkins, 2005.

KLESCHYOV, A. L.; MULLER, B.; KERVIS, T.; STOECKEL, M. E.; STOCLET, J. C. Adventitia-derived nitric oxide in rat aortas exposed to endotoxin: cell origin and functional consequences. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, n. 279, p. 2743-2751 2000.

KOGA, T.; TAKATA, Y.; KOBAYASHI, K.; TAKISHITA, S.; YAMASHITA, Y.; FUJISHIMA, M. Age and hypertension promote endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the rat. **Hypertension**, n. 14, p. 542-548, 1989.

KORZICK, D. H.; MULLER-DELP, J. M.; DOUGHERTY, P.; HEAPS, C. L.; BOWLES, D. K.; KRICK, K. K. Exaggerated coronary vasoreactivity to endothelin-1 in aged rats: role of protein kinase C. **Cardiovasc. Res.**, n. 66, p. 384-392, 2005.

KRIEGER, E. M.; SANTOS, R. A. S. Angiotensinas. Aspectos fisiológicos. **Hipertensão**, n. 1, p. 7-10, 1998.

LAKATTA, E. G.; LEVY, D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a “set up” for vascular disease. **Circulation**, n. 107, p. 139-146, 2003a.

LAKATTA, E. G.; LEVY, D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: link to heart disease. **Circulation**, n. 107, p. 346-354, 2003b.

LAKE, S.; GULLBERG, H.; WAHLQVIST, J.; SJÖGREN, A. M.; KINHULT, A.; LIND, P.; HELLSTRÖM-LINDAHL, E.; STJERNSCHANTZ, J. Cloning of the rat and human prostaglandin F2 alpha receptors and the expression of the rat prostaglandin F2 alpha receptor. **FEBS Lett**, n. 355, p. 317-325, 1994.

LEDOUX, J.; WERNER, M. E.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. **Physiology** (Bethesda), n. 21, p. 69–78, 2006.

LEE, J. H.; LEE, Y. K.; ISHIKAWA, M.; KOGA, K.; FUKUNAGA, M.; MIYAKODA, G.; MORI, T.; HOSOKAWA, T.; HONG, K. W. Cilostazol reduces brain lesion induced by focal cerebral ischemia in rats an MRI study. **Brain Res.**, n. 994, p. 91-98, 2003.

LEE, J. H.; OH, G. T.; PARK, S. Y.; CHOI, J. H.; PARK, J. G.; KIM, C. D.; LEE, W. S.; RHIM, B. Y.; SHIN, Y. W.; HONG, K. W. Cilostazol reduces atherosclerosis by inhibition of

superoxide and tumor necrosis factor- α formation in low-density lipoprotein receptor-null mice fed high cholesterol. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, n. 313, p. 502-509, 2005.

LEMARIÉ, C.; SCHIFFRIN, E. L. The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. **J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.**, n. 11, p. 19-31, 2009.

LERMAN, A.; ZEHER, A. M. "Endothelial function: cardiac events". **Circulation**, n. 111, p. 363-368, 2005.

LEWIS, P. J.; DOLLERY, C. T. Clinical pharmacology and potential of prostacyclin. **Br. Med. Bull.**, n. 39, p. 281-284, 1983.

LIAO, D.; ARNETT, D. K.; TYROLER, H. A.; RILEY, W. A.; CHAMBLESS, L. E.; SZKLO, M.; HEISS, G. Arterial stiffness and the development of hypertension. The ARIC study. **Hypertension**, n. 34, p. 201-206, 1999.

LIU, C. Q.; LEUNG, F. P.; WONG, S. L.; WONG, W. T.; LAU, C. W.; LU, L. Thromboxane prostanoid receptor activation impairs endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxations: the role of Rho kinase. **Biochem. Pharmacol.**, n. 78, p. 374-381, 2009.

LIU, H.; MAURICE, D. H. Expression of cyclic GMP-inhibited phosphodiesterases 3A and 3B (PDE3A and PDE3B) in rat tissues: differential subcellular localization and regulated expression by cyclic AMP. **Br. J. Pharmacol.**, n. 125, p. 1501-1510, 1998.

LIU, Y.; FONG, M.; CONE, J.; WANG, S.; YOSHITAKE, M.; KAMBAYASHI, J. Inhibition of adenosine uptake and augmentation of ischemia-induced increase of interstitial adenosine by cilostazol, an agent to treat intermittent claudication. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, n. 36, p. 351-360, 2000.

LONG, D. A.; NEWAZ, M. A.; PRABHAKAR, S. S.; PRICE, K. L.; TRUONG, L. D.; FENG, L.; MU, W.; OYEKAN, A. O.; JOHNSON, R. J. Loss of nitric oxide and endothelial-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in aging. **Kidney Int.**, n. 68, p. 2154-2163, 2005.

LOSCALZO, J.; WELCH, G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, n. 38, p. 87-104, 1995.

LÜSCHER, T. F.; BARTON, M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. **Circulation**, n. 102, p. 2434-2440, 2000.

MACKAY, J.; GEORGE, A. M. The atlas of heart disease and stroke. Geneva: World Health Organization, n. 115, 2004.

MACKENZIE, A.; COOPER, E. J.; DOWELL, F. J. Differential effects of glucose on agonist-induced relaxations in human mesenteric and subcutaneous arteries. **Br. J. Pharmacol.**, n. 153, p. 480-497, 2008.

MAEDA, S.; TANABE, T.; MIYAUCHI, T.; OTSUKI, T.; SUGAWARA, J.; IEMITSU, M.; KUNO, S.; AJISAKA, R.; YAMAGUCHI, I.; MATSUDA, M. Aerobic exercise training

reduces plasma endothelin-1 concentration in older women. **J. Appl. Physiol.**, n. 95, p. 336-341, 2003.

MALININ, N. L.; WEST, X. Z.; BYZOVA, T. V. Oxidation as "the stress of life". **Aging** (Albany NY), n. 3, p. 906-10, 2011.

MANGANIELLO, V. C.; DEGERMAN, E. Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs): diverse regulators of cyclic nucleotide signals and inviting molecular targets for novel therapeutic agents. **Thromb. Haemost.**, n. 82, p. 407-411, 1999.

MARCIL, J.; THIBAUT, C.; ANAND-SRIVASTAVA, M. B: Enhanced expression of Gi-protein precedes the development of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **J. Mol. Cell Cardiol.**, n. 29, p. 1009-1022, 1997.

MARRERO, M. B.; FULTON, D.; STEPP, D.; STERN, D. M. Angiotensin II-induced signaling pathways in diabetes. **Curr. Diabetes Rev.**, n. 2, p. 197-202, 2005.

MARTIN, W. The combined role of atheroma, cholesterol, platelets, the endothelium and fibrin in heart attacks and strokes. **Med. Hypotheses**, n. 15, p. 305–322, 1984.

MARTINEZ-LEMUS, L. A. The Dynamic Structure of Arterioles. **Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.**, n. 110, p. 5-11, 2012.

MASORO, E. J. Are aged-associated diseases an integral part of aging? In Masoro EJ & Austad SN (Eds.). Handbook of the biology of aging. San Diego: Elsevier Academic Press. 43.62, 2006.

MATSUDO, S. M.; MATSUDO, V. K. R.; BARROS NETO, T. L. Impacto do envelhecimento nas variáveis antropométricas, neuromotoras e metabólicas da aptidão física. **Rev. Bras. Cien. e Mov.**, n. 8, p. 21-32, 2000.

MATZ, R. L.; DE SOTOMAYOR, M. A.; SCHOTT, C.; STOCLET, J. C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Vascular bed heterogeneity in age-related endothelial dysfunction with respect to NO and eicosanoids. **Br. J. Pharmacol.**, n. 131, p. 303-311, 2000.

MATZ, R. L.; SCHOTT, C.; STOCLET, J. C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Age-related endothelial dysfunction with respect to nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factor and cyclooxygenase products. **Physiol. Res.**, n. 49, p. 11-18, 2000.

MAURICE, D. H.; PALMER, D.; TILLEY, D. G.; DUNKERLEY, H. A.; NETHERTON, S. J.; RAYMOND, D. R.; ELBATARNY, H. S.; JIMMO, S. L. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. **Mol. Pharmacol.**, n. 64, p. 533-546, 2003.

MAYEUX, P. R.; MAIS, D. E.; CARR, C.; HALUSHKA, P. V. Human erythroleukemia cells express functional thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, n. 250, p. 923-927, 1989.

MCADAM, B. F.; CATELLA-LAWSON, F.; MARDINI, I. A.; KAPOOR, S.; LAWSON, J. A.; FITZGERALD, G. A. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2:

the human pharmacology of a selective inhibitor of Cox-2. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, n. 96, p. 272–277, 1999.

MILLER, R. A. The biology of aging and longevity. In: HAZZARD, W. R.; BLASS, J. P.; HALTER, J. B.; OUSLANDER, J. G.; TINETTI, M. E. **Princ. of. Geriatr. Medic. and Geront.** (Fifth Edition). Columbus: McGraw Hill. p. 3-15, 2003.

MIYATA, N.; TSUCHIDA, K.; OKUYAMA, S.; OTOMO, S.; KAMATA, K.; KASUYA, Y. Age-related changes in endothelium-dependent relaxation in aorta from genetically diabetic WBN/Kob rats. **Am. J. Physiol.**, n. 262, p. 1104-1109, 1992.

MOMBOULI, J. V.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, n. 31, p. 61-74, 1999.

MONCADA, S.; FERREIRA, S. H.; VANE, JR. Bioassay of prostaglandins and biologically active substances derived from arachidonic acid. **Adv. Prost. Thromb. Res.**, n. 5, p. 211-236, 1978.

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

MOVSESIAN, M. A.; KUKREJA, R. C. Phosphodiesterase inhibition in heart failure. **Handb. Exp. Pharmacol.**, p. 237-49, 2011.

MUKAI, Y.; SHIMOKAWA, H.; HIGASHI, M.; MORIKAWA, K.; MATOBA, T.; HIROKI, J.; KUNIHIRO, I.; TALUKDER, H. M.; TAKESHITA, A. Inhibition of renin-angiotensin system ameliorates endothelial dysfunction associated with aging in rats. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, n. 22, p. 1445-1450, 2002.

MULVANY, M. J.; AALKJAE, C. Structure and function of small arteries. **Physiol. Review**, n. 70, p. 921–961, 1990.

MUROHARA, T.; YASUE, H.; OHGUSHI, M.; SAKAINO, N.; JOUGASAKI, M. Age related attenuation of the endothelium dependent relaxation to noradrenaline in isolated pig coronary arteries. **Cardiovasc. Res.**, n. 25, p. 1002-1009, 1991.

NAGAI, Y.; METTER, E. J.; EARLEY, C. J.; KEMPER, M. K.; BECKER, L. C.; LAKATTA, E. G.; FLEG, J. L. Increased carotid artery intimal-medial thickness in asymptomatic older subjects with exercise-induced myocardial ischemia. **Circulation**, n. 98, p. 1504-1509, 1998.

NAKAHATA, N. Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. **Pharmacol. Ther.**, n. 118, p. 18-35, 2008.

NAKAJIMA, M.; HASHIMOTO, M.; WANG, F.; YAMANAGA, K.; NAKAMURA, N.; UCHIDA, T.; YAMANOUCHI, K. Aging decreases the production of PGI₂ in rat aortic endothelial cells. **Exp. Gerontol.**, n. 32, p. 685-693, 1997.

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.**, n. 43, p. 86-94, 2006.

NAKASHIMA, M.; MOMBOULI, J. V.; TAYLOR, A. A.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. **J. Clin. Invest.**, n. 92, p. 2867-2871, 1993.

NEEDLEMAN, P.; TURK, J.; JAKSCHIK, B. A.; MORRISON, A. R.; LEFKOWITH, J. B. Arachidonic acid metabolism. **Annu. Rev. Biochem.**, n. 55, p. 69-102, 1986.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, n. 268, p. 799–822, 1995.

NELSON, M. T.; HUANG, Y.; BRAYDEN, J. E.; HESCHELER, J.; STANDEN, N. B. Arterial dilations in response to calcitonin gene related peptide involve activation of K⁺ channels. **Nature**, n. 344, p. 770–773, 1990.

NICHOLSON, S. K.; TUCKER, G. A.; BRAMELD, J. M. Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells, **Proc. Nutr. Soc.**, n. 67, p. 42-47, 2008.

NUMAGUCHI, Y.; HARADA, M.; OSANAI, H.; HAYASHI, K.; TOKI, Y.; OKUMURA, K.; ITO, T.; HAYAKAWA, T. Altered gene expression of prostacyclin synthase and prostacyclin receptor in the thoracic aorta of spontaneously hypertensive rats. **Cardiovasc. Res.**, n. 41, p. 682-688, 1999.

O'DONNELL, V. B. Free radicals, and lipid signaling in endothelial cells. **Antioxid. Redox. Signal.**, n. 5, p. 195-203, 2003.

O'LEARY, D. H.; POLACK, J. F.; MANOLIO, T.; BURKE, G. L.; WOLFSON, S. K. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults: Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. **N. Engl. J. Med.**, n. 340, p. 14-22, 1999.

O'ROURKE, M. F.; HASHIMOTO, J. Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. **J. Am. Coll. Cardiol.**, n. 50, p. 1-13, 2007.

O'ROURKE, M. F.; SAFAR, M. E.; DZAU, V. "The Cardiovascular Continuum extended: aging effects on the aorta and microvasculature". **Vasc. Med.**, n. 15, p. 461–468, 2010.

OKUDA, Y.; KIMURA, Y.; YAMASHITA, K. Cilostazol. **Cardiovasc. Drug Revs.**, n. 11, p. 451–465, 1993.

OKUMA, S. S. O idoso e a atividade física. Campinas, São Paulo: Papirus. 1998.

OMORI, K.; KOTERA, J. Overview of PDEs and their regulation. **Circ. Res.**, n. 100, p. 309-327, 2007.

OPIE, L. H. The Heart-Physiology, from cell to circulation. Philadelphia – New York, Raven. 1998.

OYAMA, N.; YAGITA, Y.; KAWAMURA, M.; SUGIYAMA, Y.; TERASAKI, Y.; OMURA-MATSUOKA, E.; SASAKI, T.; KITAGAWA, K. Cilostazol, not aspirin, reduces ischemic brain injury via endothelial protection in spontaneously hypertensive rats. **Stroke**, n. 42, p. 2571-7, 2011.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol. Rev.**, n. 87, p. 315-424, 2007.

PAGANO, P. J.; CLARK, J. K.; CIFUENTES-PAGANO, M. E.; CLARK, S. M.; CALLIS, G. M.; QUINN, M. T. Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, n. 94, p. 14483-14488, 1997.

PANNIRSELVAM, M.; WIEHLER, W. B.; ANDERSON, T.; TRIGGLE, C. R. Enhanced vascular reactivity of small mesenteric arteries from diabetic mice is associated with enhanced oxidative stress and cyclooxygenase products. **Br. J. Pharmacol.**, n. 144, p. 953-960, 2005.

PARAVICINI, T. M.; GULLUYAN, L. M.; DUSTING, G. J.; DRUMMOND, G. R. Increased NADPH oxidase activity, gp91phox expression, and endothelium-dependent vasorelaxation during neointima formation in rabbits. **Circ. Res.**, n. 91, p. 54-61, 2002.

PARIZKOVA, J.; EISELT, E.; SPRYNAROVA, S.; WACHTLOVA, M. Body composition, aerobic capacity, and density of muscle capillaries in young and old men. **J. Appl. Physiol.**, n. 31, p. 323-325, 1971.

PARK, S. Y.; LEE, J. H.; KIM, Y. K.; KIM, C. D.; RHIM, B. Y.; LEE, W. S.; HONG, K. W. Cilostazol prevents remnant lipoprotein particle-induced monocyte adhesion to endothelial cells by suppression of adhesion molecules and monocyte chemoattractant protein-1 expression via lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein receptor activation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, n. 312, p. 1241-1248, 2005.

PARK, S. Y.; LEE, S. W.; BAEK, S. H.; LEE, S. J.; LEE, W. S.; RHIM, B. Y.; HONG, K. W.; KIM, C. D. Induction of heme oxygenase-1 expression by cilostazol contributes to its anti-inflammatory effects in J774 murine macrophages. **Immunol. Lett.**, n. 136, p. 138-145, 2011.

PARK, S. Y.; SHIN, H. K.; LEE, J. H.; KIM, C. D.; LEE, W. S.; RHIM, B. Y.; HONG, K. W. Cilostazol ameliorates metabolic abnormalities with suppression of proinflammatory markers in a db/db mouse model of type 2 diabetes via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcription. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, n. 329, p. 571-579, 2009.

PASCOAL, I. F.; UMANS, J. G. Effect of pregnancy on mechanisms of relaxation in human omental microvessels. **Hypert.**, n. 28, p. 183-197, 1996.

PIERCE, K. L.; FUJINO, H.; SRINIVASAN, D.; REGAN, J. W. Activation of FP prostanoid receptor isoforms leads to Rho-mediated changes in cell morphology and in the cell cytoskeleton. **J. Biol. Chem.**, n. 274, p. 35944-35949, 1999.

POLLMAN, M. J.; YAMADA, T.; HORIUCHI, M.; GIBBONS, G. H. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. **Circ. Res.**, n. 79, p. 748-756, 1996.

RABE, K. F. Update on roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. **Br. J. Pharmacol.**, n. 163, p. 53-67, 2011.

RABÊLO, L. A.; SOUZA, V. N.; FONSECA, L. J.; SAMPAIO, W. O. Redox unbalance: NADPH oxidase as therapeutic target in blood pressure control. **Arq. Bras. Cardiol.**, n. 94, p. 643-651, 684-93, 2010.

RAPAPORT, R. M.; DRAZNIN, M. B.; MURAD, F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. **Nature**, n. 306, p. 174-176, 1983.

REINHARDT, R. R.; CHIN, E.; ZHOU, J.; TAIRA, M.; MURATA, T.; MANGANIELLO, V. C.; BONDY, C. A. Distinctive anatomical patterns of gene expression for cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases. **J. Clin. Invest.**, n. 95, p. 1528-1538, 1995.

REY, F. E.; LI, X. C.; CARRETERO, A. O.; GARVIN, J. L.; PAGANO, P. J. Perivascular superoxide anion contributes to impairment of endothelium-dependent relaxation: role of gp91(phox). **Circulation**, n. 106, p. 2497-2502, 2002.

ROSA, M. P.; SCHWENDLER, R.; LOPES, R. C.; PORTAL, V. L. Effects of cilostazol, a phosphodiesterase type III inhibitor, on postprandial lipemia, inflammatory biomarkers and nitric oxide synthase production metabolism: **Rev. AMRIGS**, n. 53, p. 427-431, 2009.

RUTTEN, B. P.; KORR, H.; STEINBUSCH, H. W.; SCHMITZ, C. The aging brain: less neurons could be better. **Mech. Ageing Dev.**, n. 124, p. 349-355, 2003.

SAITO, J.; TERANO, T.; HIRAI, A.; SHIINA, T.; TAMURA, Y.; SAITO, Y. Mechanisms of enhanced production of PGI₂ in cultured rat vascular smooth muscle cells enriched with eicosapentaenoic acid. **Atherosclerosis**, n. 131, p. 219-228, 1997.

SAKAMOTO, K.; EZASHI, T.; MIWA, K.; OKUDA-ASHITAKA, E.; HOUTANI, T.; SUGIMOTO, T.; ITO, S.; HAYAISHI, O. Molecular cloning and expression of a cDNA of the bovine prostaglandin F₂ alpha receptor. **Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.**, n. 23, p. 259-261, 1995.

SANDOW, S. L.; HILL, C. E. Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses. **Circ. Res.**, n. 86, p. 341-346, 2000.

SANDOW, S. L.; NEYLON, C. B.; CHEN, M. X.; GARLAND, C. J. Spatial separation of endothelial small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels (K(Ca)) and connexins: possible relationship to vasodilator function? **J. Anat.**, n. 209, p. 689-698, 2006.

SANTARÉM, J. M. Atualização em Exercícios Resistidos: conceituações e situação atual. **Ver. Âmbito – Medic Desport**, n. 31, p. 15-16, 1997.

SANTHANAM, L.; CHRISTIANSON, D. W.; NYHAN, D.; BERKOWITZ, D. E. Arginase and Vascular Aging. **J. Appl. Physiol.**, n. 105, p. 1632-1642, 2008.

SCHRÖR, K. The pharmacology of cilostazol. **Diabetes Obes. Metab.**, n. 2, p. 14-19, 2002.

SCHUDT, C.; HATZELMANN, A.; BEUME, R.; TENOR, H. Phosphodiesterase inhibitors: history of pharmacology. **Handb. Exp. Pharmacol.**, p. 1-46, 2011.

SCHWARTZ, J. B.; ZIPES, D. P. Cardiovascular disease in the elderly. In: ZIPES, D. P.; LIBBY, P.; BONOW, R. O.; BRAUNWALD, E. Heart Disease: A textbook of cardiovascular medicine. 7th ed. Philadelphia, Pennsylvania: **Elsevier Saunders**, n. 1925-1949, 2005.

SELLERS, M. M.; STALLONE, J. N. Sympathy for the devil: the role of thromboxane in the regulation of vascular tone and blood pressure. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, n. 294, p. 1978-1986, 2008.

SEO, B.; OEMAR, B. S.; SIEBENMANN, R.; VON SEGESSER, L.; LÜSCHER, T. F. Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. **Circulation**, n. 89, p. 1203-1208, 1994

SERHAN, C. N.; LEVY, B. Success of prostaglandin E2 in structure function is a challenge for structure-based therapeutics. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, n. 100, p. 8609-8611, 2003.

SHENG, J. Z.; BRAUN, A. P. Small- and intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels directly control agonist-evoked nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, n. 293, p. 458-467, 2007.

SHIMOKAWA, H.; YASUTAKE, H.; FUJII, K.; OWADA, M. K.; NAKAIKE, R.; FUKUMOTO, Y.; TAKAYANAGI, T.; NAGAO, T.; EGASHIRA, K.; FUJISHIMA, M.; TAKESHITA, A. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, n. 28, p. 703-711, 1996.

SHIMOKAWA, H. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Pflugers. Arch.**, n. 459, p. 915-922, 2010.

SHINMURA, K.; TAMAKI, K.; SATO, T.; ISHIDA, H.; BOLLI, R. Prostacyclin attenuates oxidative damage of myocytes by opening mitochondrial ATP-sensitive K^{+} channels via the EP3 receptor. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, n. 288, p. 2093-2101, 2005.

SHI, Y.; MAN, R. Y.; VANHOUTTE, P. M. Two isoforms of cyclooxygenase contribute to augmented endothelium-dependent contractions in femoral arteries of 1-year-old rats. **Acta Pharmacol. Sin.**, n. 29, p. 185-192, 2008.

SILVA, M. V. F.; FERREIRA, K. S.; LOURES, C. M. G.; DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; ASSINI, A. G.; SILVEIRA, J. N.; CARVALHO, M. G. Atherothrombosis and antiplatelet drugs. **Ver. Bras. Cardiol**, n. 26, p. 221-230, 2013.

SMYTH, E. M.; FITZGERALD, G. A. Human prostacyclin receptor. **Vitam. Horm.**, n. 65, p. 149–165, 2002.

SMYTH, E. M.; GROSSER, T.; WANG, M.; YU, Y.; FITZGERALD, G. A. Prostanoids in health and disease. **J. Lipid. Res.**, n. 50, p. 423–428, 2009.

SODERLING, S. H.; BEAVO, J. A. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. **Curr. Opin. Cell Biol.**, n. 12, p. 174–179, 2000.

SONNENBURG, W. K.; SEGER, D.; KWAK, K. S.; HUANG, J.; CHARBONNEAU, H.; BEAVO, J. A. Identification of inhibitory and calmodulin-binding domains of the PDE1A1 and PDE1A2 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases. **J. Biol. Chem.**, n. 270, p. 30989–40000, 1995.

STANKEVICIUS, E.; LOPEZ-VALVERDE, V.; RIVERA, L.; HUGHES, A. D.; MULVANY, M. J.; SIMONSEN, U. Combination of Ca^{2+} -activated K^{+} channel blockers inhibits acetylcholine-evoked nitric oxide release in rat superior mesenteric artery. **Br. J. Pharmacol.**, n. 149, p. 560–572, 2006.

STEGBAUER, J.; COFFMAN, T. M. New insights into angiotensin receptor actions: from blood pressure to aging. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, n. 20, p. 84–88, 2011.

STJERNQUIST, M. Endothelins: vasoactive peptides and growth factors. **Cell Tissue Res.**, n. 292, p. 1–9, 1998.

SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E receptors. **J. Biol. Chem.**, n. 282, p. 11613–11617, 2007.

SUGIMOTO, Y.; HASUMOTO, K.; NAMBA, T.; IRIE, A.; KATSUYAMA, M.; NEGISHI, M.; KAKIZUKA, A.; NARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin F receptor. **J. Biol. Chem.**, n. 269, p. 1356–1360, 1994.

SURI, A.; FORBES, W. P.; BRAMER, S. L. Pharmacokinetics of multiple-dose oral cilostazol in middle-age and elderly men and women. **J. Clin. Pharmacol.**, n. 38, p. 144–150, 1998.

TADDEI, S.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions to endothelin in the rat aorta are mediated by thromboxane A₂. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, n. 22, p. 328–331, 1993.

TADDEI, S.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; SALVETTI, G.; BERNINI, G.; MAGAGNA, A.; SALVETTI, A. Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans. **Hypertension**, n. 38, p. 274–279, 2001.

TAKAI, S.; JIN, D.; NISHIMOTO, M.; SAKAGUCHI, M.; KIRIMURA, K.; YUDA, A.; MIYAZAKI, M. Cilostazol suppresses intimal formation in dog grafted veins with reduction of angiotensin II-forming enzymes. **Eur. J. Pharmacol.**, n. 411, p. 301–304, 2001.

- TAMER, N. L.; PETRIZ, G. A qualidade de vida dos idosos. In OSÓRIO, AR & PINTO, FC (Coord.) *As Pessoas Idosas: contexto social e intervenção educativa*. Lisboa: Instituto Piaget. 181-201, 2007.
- TANG, E. H.; VANHOUTTE, P. M. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. **Physiol. Genomics.**, n. 32, p. 409-418, 2008.
- TANIYAMA, Y.; GRIENDLING, K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**, n. 42, p. 1075-1081, 2003.
- TAUBMAN, M. B. Angiotensin II: a vasoactive hormone with ever-increasing biological roles. **Circ Res**, n. 92, p. 9-11, 2003.
- THIJSEN, D. H.; RONGEN, G. A.; VAN DIJK, A.; SMITS, P.; HOPMAN, M. T. Enhanced endothelin-1-mediated leg vascular tone in healthy older subjects. **J. Appl. Physiol.**, n. 103, p. 852-857, 2007.
- TIMIRAS, P. S. Physiological basis of aging and geriatrics. Boca Raton, CRC press, 2. ed, 1994.
- TIRAPELLI, C. R.; CASOLARI, D. A.; YOGI, A.; MONTEZANO, A. C.; TOSTES, R. C.; LEGROS, E.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; DE OLIVEIRA, A. M. Functional characterization and expression of endothelin receptors in rat carotid artery: involvement of nitric oxide, a vasodilator prostanoid and the opening of K channels in ET-induced relaxation. **Br. J. Pharmacol.**, n. 146, p. 903-912, 2005.
- TORPHY, T. J. Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, n. 157, p. 351-370, 1998.
- TOUYZ, R M.; BERRY, C. Recent advances in angiotensin II signaling. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, n. 35, p. 1001-1015, 2002.
- TOYOTA, T.; OIKAWA, D. S.; ABE, R.; SANO, R.; SUZUKI, N.; HISAMICHI, S.; FUKAO, A. Effect of cilostazol on lipid, uric acid and glucose metabolism in patients with impaired glucose tolerance or type 2 diabetes mellitus: a double-blind, placebo-controlled study. **Clin. Drug Invest.**, n. 21, p. 325-335, 2001.
- TSUCHIKANE, E.; KATOH, O.; SUMITSUJI, S.; FUKUHARA, A.; FUNAMOTO, M.; OTSUJI, S.; TATEYAMA, H.; AWATA, N.; KOBAYASHI, T. Impact of cilostazol on intimal proliferation after directional coronary atherectomy. **Am. Heart J.**, n. 135, p. 495-502, 1998.
- TSUKAHARA, H.; ENDE, H.; MAGAZINE, H. I.; BAHOU, W. F.; GOLIGORSKY, M. S. Molecular and functional characterization of the non-isopeptide-selective ETB receptor in endothelial cells. Receptor coupling to nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem.**, n. 269, p. 21778-21785, 1994.

- ÜLKER, S.; MCKEOWN, P. P.; BAYRAKTUTAN, U. Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS And NADPH oxidase activities. **Hypertension**, n. 41, p. 534-539, 2003.
- VAITKEVICIUS, P. V.; FLEG, J. L.; ENGEL, J. H.; O'CONNOR, F. C.; WRIGHT, J. G.; LAKATTA, L. E.; YIN, F. C.; LAKATTA, E. G. Effects of age and aerobic capacity on arterial stiffness in healthy adults. **Circulation**, n. 88, p. 1456-1462, 1993.
- VALENTIN, F.; FIELD, M. C.; TIPPINS, J. R. The mechanism of oxidative stress stabilization of the thromboxane receptor in COS-7 cells. **J. Biol. Chem.**, n. 279, p. 8316–8324, 2004.
- VAN GUILDER, G. P.; WESTBY, C. M.; GREINER, J. J; STAUFFER, B. L.; DE SOUZA, C. A. Endothelin-1 vasoconstrictor tone increases with age in healthy men but can be reduced by regular aerobic exercise. **Hypertension**, n. 50, p. 403-409, 2007.
- VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, n. 38, p. 97-120, 1998.
- VANHOUTTE, P. M.; EBER, B. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **Wien. Klin. Wochenschr.**, n. 103, p. 405-411, 1991.
- VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; TADDEI, S. Human endothelial dysfunction: EDCFs. **Eur. J. Physiol.**, n. 459, p. 1015-1023, 2010.
- WANG, J.; RIGAUD, M.; DARET, D.; DEMOND, J.; DURAND, J.; BRICAUD, H. Lipid peroxides, glutathione peroxidase, prostacyclin and cell cycle stages in normal and atherosclerotic Japanese quail arteries. **Atherosclerosis**, n. 75, p. 219-225, 1989.
- WASSMANN, S.; WASSMAN, K.; NICKENIG, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. **Hypertension**, n. 44, p. 381-386, 2004.
- WHO. World Health Organization. Global Survey on Geriatrics in the Medical Curriculum. Geneva, World Health Organization, 2002.
- WHO. World Health Organization launches new initiative to address the health needs of a rapidly ageing population. **Cent. Eur. J. Public. Health**, n. 12, p. 210-216, 2004.
- WHO. World Health Organization. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. Mendis S, Puska P, Norrving B editors. Geneva: World Health Organization; 2011.
- WILLIAMS, B.; POULTER, N. R.; BROWN, M. J.; DAVIS, M.; MCINNES, G. T.; POTTER, J. F.; SEVER, P. S.; THOM, S.; BRITISH HYPERTENSION SOCIETY. Guidelines for management of hypertension: report of the Fourth Working Party of the British Hypertension Society. **J. Human Hypert.**, n. 18, p. 139-185, 2004.
- WILLIAMS, M. A.; FLEG, J. L.; ADES, P. A.; CHAITMAN, B. R.; MILLER, N. H.; MOHIUDDIN, S. M.; OCKENE, I. S.; TAYLOR, C. B.; WENGER, N. K. & American Heart Association Council on Clinical Cardiology Subcommittee on Exercise, Cardiac Rehabilitation, and Prevention. Secondary prevention of coronary heart disease in the elderly

(with emphasis on patients $>$ or $=75$ years of age): an American Heart Association scientific statement from the Council on Clinical Cardiology Subcommittee on Exercise, Cardiac Rehabilitation, and Prevention. **Circulation**, n. 105, p. 1735-1743, 2002.

WILSON, S. J.; CAVANAGH, C. C.; LESHER, A. M.; FREY, A. J.; RUSSELL, S. E.; SMYTH, E. M. Activation-dependent stabilization of the human thromboxane receptor: role of reactive oxygen species. **J. Lipid Res.**, n. 50, p. 1047–1056, 2009.

WOLF, G.; BUTZMANN, U.; WENZEL, U. O. The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. **Nephron. Physiol.**, n. 93, p. 3-13, 2003.

WOLF, P. A.; LEWIS, A. Contributions of epidemiology to the prevention of stroke. **Circulation**, n. 88, p. 2471-2478, 1993.

WONG, S. L.; LEUNG, F. P.; LAU, C. W.; AU, C. L.; YUNG, L. M.; YAO, X.; CHEN, Z. Y.; VANHOUTTE, P. M.; GOLLASCH, M.; HUANG, Y. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin F₂ α mediates endothelium-dependent contractions in the aortae of hamsters with increased impact during aging. **Circ. Res.**, n. 104, p. 228-235, 2009.

WU, J.; XIA, S.; KALIONIS, B.; WAN, W.; SUN, T. The role of oxidative stress and inflammation in cardiovascular aging. **Biomed. Res. Int.**, 615312, 2014.

WU, S.; RUAN, Y.; YIN, M.; LAI, W. Research on the age-related changes in the nitric oxide pathway in the arteries of rats and the intervention effect of dehydroepiandrosterone. **Gerontology**, n. 53, p. 234-237, 2007.

XAVIER, F. E.; BLANCO-RIVERO, J.; FERRER, M.; BALFAGÓN, G. Endothelium modulates vasoconstrictor response to prostaglandin I₂ in rat mesenteric resistance arteries: interaction between EP1 and TP receptors. **Br. J. Pharmacol.**, n. 158, p. 1787-1795, 2009.

YAMAGISHI, S.; MATSUI, T. Nitric oxide, a janus-faced therapeutic target for diabetic microangiopathy-friend or foe? **Pharmacol. Res.**, n. 64, p. 187–194, 2011.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YAZAKI, Y.; GOTO, K.; MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, n. 332, p. 411-415, 1988.

YASUDA, K.; SAKUMA, M.; TANABE, T. Hemodynamic effect of cilostazol on increasing peripheral blood flow in arteriosclerosis obliterans. **Arzneimittelforschung**, n. 35, p. 1198-1200, 1985.

Artigo a ser submetido no periódico: *Experimental Physiology*

Cilostazol, a phosphodiesterase 3 inhibitor, reverses age-related vascular changes in rat mesenteric resistance arteries

Hicla S. Moreira, Geórgia A. Lima-Leal, Francine I. G. de Sá, Gloria P. Duarte, Fabiano E. Xavier.

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

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

Keywords: aging, endothelial dysfunction, cilostazol.

Abstract

Aging impairs endothelial function, which may be considered a hallmark of the development of cardiovascular diseases in elderly. Cilostazol, a selective inhibitor of phosphodiesterase 3 (PDE-3), has antiplatelet, antithrombotic and peripheral vasodilator effects. In the current study, we analyzed whether cilostazol could affect vascular function (contractile and relaxation mechanisms) of old rats and possible mechanism involved. 18-month-old male Wistar rats were treated with Cilostazol during 8 weeks at the dose of 100 mg.kg⁻¹ by gavage; untreated rats received vehicle. Blood pressure (BP) was measured in conscious rats. Mesenteric resistance arteries (MRA) were used to evaluate the relaxation to acetylcholine, sodium nitroprusside (SNP), forskolin, and isoproterenol and noradrenaline-induced contraction. While relaxation to forskolin and isoproterenol remained unmodified by cilostazol, relaxation to acetylcholine and to SNP was increased in MRA from cilostazol-treated than untreated rats. In these arteries, vasoconstriction produced by noradrenaline was similar in both groups. In a similar manner, incubation with L-NAME or ODQ abolished the vasodilator response to acetylcholine in MRA from both cilostazol-treated and untreated rats. In presence of L-NAME plus indomethacin, relaxation to acetylcholine was similar in both groups. On the other hand, TRAM-34 plus apamin attenuated acetylcholine-induced relaxation in MRA from cilostazol-treated rats, but in untreated rats. The present study suggests that cilostazol reverses endothelial function in aged rats by a cGMP-dependent mechanism, involving probably an increase in •NO and subsequent activation of the K_{Ca} channel in vascular smooth muscle. Although these results are preliminary, they suggest a possible use of cilostazol as an alternative for the prevention/ treatment of vascular disorders induced by aging.

Introduction

Age-associated vascular changes may lead to the development of cardiovascular diseases (CVD), which means 50% of clinical diseases present in the elderly (Assar *et al.* 2012). It is known that the aging process involves several structural and functional changes in the vasculature. One of these abnormalities is characterized by changes on the communication routes between the endothelium and the smooth muscle cells, independently of other risk factors such as arterial hypertension, diabetes or hypercholesterolemia (Barodka *et al.* 2011). The maintenance of the normal endothelial function is thought to be a key factor of healthy cardiovascular system in aging (Virdis *et al.* 2010; Toda *et al.* 2012).

Endothelial integrity is essential for the regulation of vascular tone. Under physiological conditions, there is an important equilibrium between the release of endothelium-derived relaxing factors (EDRF), including nitric oxide ($\bullet$ NO), endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) and prostacyclin (PGI_2), and the constricting factors (EDCF), such as endothelin-1, angiotensin II and cyclooxygenase (COX)-derived contractile prostaglandins (Rubanyi, 1991; Vanhoutte, 1997). However, this equilibrium is altered in elderly subjects (Matz *et al.* 2000), which leads to impaired endothelium-dependent relaxation in several vascular bed from aged humans and animals (Matz & Andriantsitohaina, 2003; Brandes *et al.* 2005; Rodriguez-Mañas *et al.* 2009; Toda, 2012). This impairment is mainly characterized by a progressive reduction of the bioavailability of $\bullet$ NO and an increase in the production of COX-derived vasoconstrictor factors (Hongo *et al.* 1988; Koga *et al.* 1989; Murohara *et al.* 1991; Matz *et al.* 2000; Minamino & Komuro, 2008).

Cilostazol, 6-[4-(1-cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl)butoxyl]-3,4-dihydro-2(1H)-quinolinone, is a potent and selective inhibitor of PDE-3 which increases intracellular cAMP and activates the protein kinase A (PKA) (Kambayashi *et al.* 2003). It has some

pharmacologic effects including inhibition of platelet activation and aggregation (Kimura *et al.* 1985) and vasodilation (Tanaka *et al.* 1988; Nakamura *et al.* 2006). In addition, cilostazol is able to reduce triglyceride levels and increase high-density lipoprotein cholesterol (Toyota *et al.* 2001; Ikewaki *et al.* 2002), and inhibits the growth of vascular smooth muscle cells (Kim *et al.* 2005). Cilostazol is currently used in the treatment of intermittent claudication in diabetic patients (Dawson *et al.* 1998), ischemic symptoms related to chronic peripheral arterial obstruction and also in prevention of secondary cerebral ischemia (Gotoh *et al.* 2000; Kambayashi *et al.* 2003), which represents a major cause of death in the elderly.

In recent years, preclinical studies have shown that cilostazol protects endothelial cells from apoptosis induced by high glucose concentration, serum deprivation, and lipopolysaccharide exposition (Morishita *et al.* 1997; Kim *et al.* 2002). Moreover, it has been reported that this drug attenuates the expression of cell adhesion molecules and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), thus preventing monocyte adhesion to endothelial cells (Nishio *et al.* 1997; Otsuki *et al.* 2001). Lee *et al.* (2005) have shown that cilostazol has anti-atherosclerotic effects through its actions as anti-inflammatory and antioxidant drug. This anti-inflammatory effect of cilostazol was also demonstrated in macrophages activated by LPS (lipopolysaccharide derived from bacteria), where it was able to reduce the expression of iNOS and COX-2 (Park *et al.* 2011). In addition, some studies show that PDE-3 inhibitors provide protection to endothelial cells and nervous tissue in focal ischemia models independently of its antiplatelet activity (Choi *et al.* 2002; Lee *et al.* 2003).

Taken together, these actions can make cilostazol an important alternative for the prevention/ treatment of vascular disorders involving endothelial dysfunction, which has a high incidence in elderly subjects. Thus, the present work was designed to evaluate the effect of chronic treatment with cilostazol on vascular function (contractile and relaxation mechanisms) of aged rats and the possible mechanisms involved.

Methods

Animals

All procedures used in this study conforms with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23, revised 1996) and were approved by the Ethics Committee of the *Centro de Ciências Biológicas* from the *Universidade Federal de Pernambuco* (Protocols: 23076.057069/2014-31). 3- and 18-month-old male Wistar rats were obtained from colonies maintained at the Animal Quarters of the *Departamento de Fisiologia e Farmacologia* of the *Universidade Federal de Pernambuco*. Rats were housed at a constant room temperature humidity and a light cycle (12:12 h light-dark), with free access to standard rat chow and tap water.

18-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 blood pressure measurement in conscious rats

Rats were anesthetized with ketamine, xylazine, and acetopromazin mixture (64.9, 3.2, and 0.78 mg.kg⁻¹, respectively, i.p.) and allowed to breathe room air spontaneously. The femoral artery was cannulated with a polyethylene catheter (PE-50 with heparinized saline) that was exteriorized in the midscapular region. After 24 h, arterial pressure and heart rate were measured in conscious animals by a pressure transducer (model MLT844, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia) and recorded using an interface and software for computer data acquisition (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia).

Vascular Reactivity Study

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 were carefully removed and placed in cold oxygenated Krebs-Henseleit bicarbonate buffer. The buffer consisted of (in mM): NaCl 118, KCl 4.7, NaHCO₃ 25; CaCl₂.2H₂O 2.5, glucose 11, KH₂PO₄ 1.2, 1.2 and EDTA MgSO₄.7H₂O 0.01). 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 & 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, L_0 , 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 $\mu\text{mol/L}$) was added to assess the integrity of the endothelium. After 60 min, cumulative concentration–response curves for noradrenaline (0.1 nmol/L to 10 $\mu\text{mol/L}$), isoproterenol (1 nmol/L to 10 $\mu\text{mol/L}$), acetylcholine (1 nmol/L to 10 $\mu\text{mol/L}$), sodium nitroprusside (1 nmol/L to 10 $\mu\text{mol/L}$) or forskolin (1 nmol/L to 10 $\mu\text{mol/L}$) were generated.

Additionally, concentration–response curves to acetylcholine and noradrenaline were performed in presence of the soluble guanylyl cyclase inhibitor, 1H-1,2,4-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ, 0.1 μM), the nonselective nitric oxide synthase inhibitor N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 μM), the COX inhibitor indomethacin (10 μM) plus L-NAME (100 μM) or the intermediate-conductance K_{Ca} channel blocker TRAM-34 (1 μM) plus the small-conductance K_{Ca} channel blocker apamin (1 μM). All drugs were added 30 min before generating the concentration-response curve.

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 analysis

The relaxation responses are expressed as a percentage of the contraction induced by noradrenaline. Contractile responses are expressed as a percentage of the response to KCl. All results are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.) of the number of rats used in each experiment. Results were analyzed using Students t-test, one way or “two-way” ANOVA. When ANOVA showed a significant treatment effect, Bonferroni’s post hoc test was used to compare individual means (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, E.U.A). 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 3- and 18-month-old rats (Figure 1). Cilostazol treatment did not affect these parameters in 18-month-old rats (Figure 1).

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

KCl evoked similar contractions in mesenteric resistance arteries (MRA) from cilostazol-treated group and untreated group rats (cilostazol-treated: 20.4 ± 0.78 vs. untreated: 21.4 ± 1.34 mN.mm⁻¹, $P > 0.05$). Acetylcholine- and sodium nitroprusside-induced vasodilator responses were impaired in arteries from 18-month-old untreated rats (Figure 2A and B) compared with 3-month-old rats. Noradrenaline induced similarly a concentration-dependent contraction in MRA from both groups (Figure 2C).

Chronic cilostazol administration produced a marked increase in the acetylcholine- (Figure 3A) and sodium nitroprusside-induced relaxation (Figure 3B) in MRA from 18-month-old. On the other hand, the contractile response to noradrenaline was similar in both cilostazol-treated and untreated groups (Figure 3C). In another set of experiments, we evaluate the relaxing responses to β -adrenergic agonist isoproterenol and to the adenylate cyclase activator forskolin. Both of them produced similar responses in arteries from cilostazol-treated and untreated rats (Figure 4).

Pre-treatment of arteries with L-NAME or ODQ similarly inhibited the relaxation to acetylcholine in both cilostazol-treated and untreated groups (Figure 5). However, the effect

of these drugs was greater in arteries from cilostazol-treated group. To investigate the component of EDHF on the acetylcholine-induced relaxation, we performed the concentration-response curve to acetylcholine in presence of L-NAME plus indomethacin. This EDHF type-relaxation was not different between cilostazol-treated and untreated groups (Figure 6A).

Preincubation with apamin plus TRAM-34 attenuated acetylcholine-induced relaxation in arteries from cilostazol-treated rats (Figure 6C). On the other hand, incubation with these K⁺-channel blockers did not alter the relaxation to acetylcholine in arteries from untreated rats (Figure 6B).

Discussion

In the present study, we provided evidences that chronic oral administration of cilostazol increased the •NO/ cGMP pathway and restored endothelial function of resistance arteries from 18-month-old rats. Our results also revealed a functional contribution of K_{Ca} channels on •NO-mediated vasodilation in cilostazol-treated rats.

Aging 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 (Lakatta & Levy, 2003a; Minamino & Komuro, 2008). 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 in elderly subjects (Virdis *et al.* 2010). Evidence exists that endothelium-dependent vasorelaxation is impaired in arteries from aging human and animals without hypertension (Matz & Andriantsitohaina, 2003; Brandes *et al.* 2005; Rodriguez-Mañas *et al.* 2009; Toda, 2012). In the present study, the blood pressure was unaltered in aging rats compared with young ones. However, the dilation response to acetylcholine, an endothelium-dependent vasodilator, was decreased in aging resistance arteries. It suggests that even the aging animals without hypertension present impairment of the endothelium-dependent relaxation. The existence of endothelial dysfunction in aging may explain the susceptibility to vasculopathies in elderly subjects. The present study also measured dilation responses to the •NO donor, sodium nitroprusside, which was decreased in aging resistance arteries compared with young resistance arteries. Taken together these results indicates that the decreased relaxation in the aging rats is due, at least in part, to decreased vascular smooth muscle sensitivity to •NO. This effect may be due decreased cGMP levels, as previously reported in aging resistance arteries (Ma *et al.* 2014).

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 (Nishi *et al.* 1983; Kimura *et al.* 1985) and vasodilator actions (Ohashi *et al.* 1985; Tanaka *et al.* 1988), by elevating intracellular cAMP levels. It reduces proliferation of vascular smooth muscle cells (Matsumoto *et al.* 1992) and decreases the restenosis in animals and humans (Tsuchikane *et al.* 2007; Iida *et al.* 2008). The beneficial vascular effects of cilostazol have been quite studied in various disorders that course with endothelial dysfunction. The results obtained here showed that oral administration of cilostazol for 8 weeks was able to reverse the endothelium-dependent relaxation of mesenteric resistance arteries from 18-month-old rats. Consistent with our results, Matsumoto *et al.* (2008) also demonstrated an increase in endothelium-dependent relaxation induced by cilostazol in mesenteric arteries from old diabetic rats. Our results also revealed that cilostazol treatment increased endothelium-independent relaxation induced by the NO donor sodium nitroprusside, which indicate that effect of cilostazol on vascular relaxation in aging resistance arteries can be attributed, at least in part, to improved responsiveness of smooth muscle to nitric oxide. Previous studies demonstrated that cilostazol decreased cGMP hydrolysis in human and animal arteries even at low doses (Birk *et al.*, 2004). This effect could help us to explain how cilostazol increases the relaxation to acetylcholine and sodium nitroprusside in aging resistance arteries. On the other hand, it is important to emphasize that the effect of cilostazol treatment on relaxation to acetylcholine was greater than to sodium nitroprusside, which suggest the action of this PDE-3 inhibitor on endothelial cells.

Previous studies show that endothelial dysfunction is associated to an increase in the vasoconstrictor responses to different agonists (Wiggers *et al.* 2008; Xavier *et al.* 2008; Xavier *et al.* 2011). In our experiments, vasoconstriction produced by noradrenaline remained

unmodified in 18-month-old compared to 3-month-old rats. In addition, cilostazol treatment did not affect the contractile response to noradrenaline in aging resistance arteries.

Alterations of endothelial function present in aging arteries rats may result from increased oxidative stress and/ or reduced •NO synthesis due decreased endothelial •NO synthase (eNOS) activity (Taddei *et al.* 2001; Sun *et al.* 2004; Wu *et al.* 2007). In order to analyze the involvement of endothelial •NO on effect of cilostazol, we preincubated aging arteries with L-NAME. In presence of this NOS inhibitor, the acetylcholine-induced relaxation was practically abolished in both cilostazol-treated and untreated rats, suggesting that •NO is the main endothelium-derived factor released by acetylcholine in aging rats. We also found that the inhibitory effects of NOS blockade by L-NAME on acetylcholine-induced relaxation were comparable to those seen with preincubation with ODQ (a guanylate cyclase inhibitor), reinforcing our hypothesis that cilostazol act via •NO in aging resistance arteries. The effect of L-NAME in arteries from cilostazol-treated rats was greater when compared to untreated rats. This suggest that effect of cilostazol in aging arteries involves an increase in •NO-dependent pathway. Consistent with our results, Tanano *et al.* (2013) demonstrated that cilostazol increased the vasodilation via •NO in porcine retinal arterioles.

High intracellular levels of cAMP and cGMP produce relaxation of vascular smooth muscle mainly by reducing Ca^{2+} intracellular concentrations (Cornwell & Lincoln, 1989; Lincoln *et al.* 1990). In vascular smooth muscle cells, increases in cAMP levels may be produced by stimulation of various membrane receptors among them is β -adrenoceptors (Kukovetz *et al.* 1981). These receptors are also expressed on endothelial cells, whose stimulation leads to •NO release (Gray & Marshall, 1992). It has been demonstrated that cilostazol increases cAMP levels in several cell types (Umekawa *et al.* 1984; Tanaka *et al.* 1988). In the current study, we analyzed the contribution of cAMP pathway on actions of cilostazol in aging arteries. Results obtained here revealed that cilostazol treatment did not

modify the relaxation induced by isoproterenol (a β -adrenoceptor agonist) or by forskolin (an adenylate cyclase activator) in aging resistance arteries. This result was surprising, since by its ability to increase cAMP levels, we expected that cilostazol would potentiate the relaxation induced by isoproterenol and/or forskolin. Thus, given these results we postulate that cilostazol in aging resistance arteries act preferentially by increasing cGMP-dependent pathway.

In rat mesenteric resistance arteries, relaxation to acetylcholine is also mediated by EDHF release (Lagaud *et al.* 1999). The relaxation mediated by this endothelial factor is resistant to a combination of NOS and COX inhibitors and leads to hyperpolarization and relaxation of vascular smooth muscle (Triggle *et al.* 2012). Thus, to investigate the role of EDHF on effects of cilostazol in aging resistance arteries, we assessed the acetylcholine-induced relaxation in presence of L-NAME plus indomethacin. The response to acetylcholine decreased drastically in arteries from both cilostazol-treated and untreated rats. In presence of these inhibitors there were no differences on relaxation to acetylcholine between cilostazol-treated and untreated groups. This suggest that EDHF does not play a role on effects of cilostazol in aging resistance arteries, contrasting previous results showing that cilostazol restored acetylcholine-induced EDHF-type relaxation in diabetic aged rats (Matsumoto *et al.* 2008). On the other hand, this results reinforces the main role of $\bullet$ NO/cGMP on cilostazol effects in aging resistance arteries.

It has been suggested that $\bullet$ NO/cGMP activates K_{Ca} channels, which are present in rat mesenteric resistance arteries. In the current study, we analyzed the possibility that the increase in acetylcholine response by cilostazol was mediated by activation of K_{Ca} channels. The preincubation of arteries with apamin (a small conductance calcium-activated K^+ -channel, SK_{Ca} , blocker) plus TRAM-34 (an intermediate conductance calcium-activated K^+ -channel, IK_{Ca} , blocker) decreased relaxation to acetylcholine only in cilostazol-treated group.

This suggests that aging courses with decrease in K_{Ca} channels activity in resistance arteries, which in turn can contribute to decreased acetylcholine-induced relaxation. Cilostazol treatment seems to restore the participation of these channels on endothelium-dependent relaxation in aging resistance arteries. The mechanism involved in this cilostazol effect is unknown, but could involve increased cGMPc levels and PKG-dependent phosphorylation of these K_{Ca} channels. On the other hand, a direct effect of cilostazol cannot be discarding. Li *et al.* (2015) showed that the cilostazol induces vasodilation by activation of K^+ channels in vascular smooth muscle rabbits.

In summary, results obtained here indicate that cilostazol reverses endothelial function in aged rats by a $\bullet$ NO/cGMP-dependent mechanism, involving probably an increase in endothelial $\bullet$ NO release and cGMP levels and subsequent activation of the K_{Ca} channel in vascular smooth muscle. Although these results are preliminary, they suggest a possible use of cilostazol as an alternative for the prevention/ treatment of vascular disorders induced by aging.

Acknowledgements

Hicla S. Moreira and Geórgia A. Lima-Leal were supported by a master degree fellowship from *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES); Francine I. G de Sá was supported by a doctoral degree fellowship from *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE). Gloria P. Duarte and Fabiano E. Xavier are recipients of research fellowship from *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq). We are grateful to José Antônio de Albuquerque for his technical assistance.

Conflict of interest

None

References

ASSAR M, ANGULO J, VALLEJO S, PEIRÓ C, SÁNCHEZ-FERRER CF & RODRÍGUEZ-MAÑAS L. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction. *Front Physiol.* **3**:132, 2012.

BARODKA VM, JOSHI BL, BERKOWITZ DE, HOGUE CW JR & ANDNYHAN D. Review article: implications of vascular aging. *Anesth Analg.* **112**:1048–60, 2011.

BIRK S, EDVINSSON L, OLESEN J & KRUUSE C. Analysis of the effects of phosphodiesterase type 3 and 4 inhibitors in cerebral arteries. *Eur J Pharmacol.* **489**:93-100, 2004.

BRANDES RP, FLEMING I & BUSSE R. Endothelial aging. *Cardiovasc Res.* **66**:286-94, 2005.

CHOI JM, SHIN HK, KIM KY, LEE JH & HONG KW. Neuroprotective effect of cilostazol against focal cerebral ischemia via antiapoptotic action in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* **300**:787-93, 2002.

CORNWELL TL & LINCOLN TM. Regulation of intracellular Ca^{2+} levels in cultured vascular smooth muscle cells. Reduction of Ca^{2+} by atriopeptin and 8-bromo-cyclic GMP is mediated by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* **264**:1146-55, 1989.

DAWSON DL, CUTLER BS, MEISSNER MH & STRANDNESS DE Jr. Cilostazol has beneficial effects in treatment of intermittent claudication: results from a multicenter, randomized, prospective, double-blind trial. *Circulation.* **98**:678-86, 1998.

GOTOH F, TOHGI H, HIRAI S, TERASHI A, FUKUUCHI Y, OTOMO E, SHINOHARA Y, ITOH E, MATSUDA T, SAWADA T, YAMAGUCHI T, NISHIMARU K & OHASHI Y. Cilostazol stroke prevention study: A placebo-controlled double-blind trial for secondary prevention of cerebral infarction. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* **9**:147-57, 2000.

GRAY DW & MARSHALL I. Novel signal transduction pathway mediating endothelium-dependent beta-adrenoceptor vasorelaxation in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol.* **107**:684-90, 1992.

HONGO K, NAKAGOMI T, KASSELL NF, SASAKI T, LEHMAN M, VOLLMER DG, TSUKAHARA T, OGAWA H & TORNER J. Effects of aging and hypertension on endothelium-dependent vascular relaxation in rat carotid artery. *Stroke.* **19**:892-7, 1988.

IIDA O, NANTO S, UEMATSU M, MOROZUMI T, KITAKAZE M & NAGATA S. Cilostazol reduces restenosis after endovascular therapy in patients with femoropopliteal lesions. *J Vasc Surg.* **48**:144-9, 2008.

IKEWAKI K, MOCHIZUKI K, IWASAKI M, NISHIDE R, MOCHIZUKI S & TADA N. Cilostazol, a potent phosphodiesterase type III inhibitor, selectively increases antiatherogenic high-density lipoprotein subclass LpA-I and improves postprandial lipemia in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* **51**:1348-1354, 2002.

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

KIM KY, SHIN HK, CHOI JM & HONG KW. Inhibition of lipopolysaccharide-induced apoptosis by cilostazol in human umbilical vein endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* **300**:709-15, 2002.

KIM MJ, PARK KG, LEE KM, KIM HS, KIM SY, KIM CS, LEE SL, CHANG YC, PARK JY, LEE KU & LEE IK. Cilostazol inhibits vascular smooth muscle cell growth by downregulation of the transcription factor E2F. *Hypertension.* **45**:552-6, 2005.

KIMURA Y, TANI T, KANBE T & WATANABE K. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneimittelforschung.* **35**:1144-9, 1985.

KOGA T, TAKATA Y, KOBAYASHI K, TAKISHITA S, YAMASHITA Y & FUJISHIMA M. Age and hypertension promote endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension*. **14**:542-8, 1989.

KUKOVETZ, W.R., POCH, G. & HOLZMANN, S. Cyclic nucleotides and relaxation of vascular smooth muscle. In *Vasodilatation*. ed. Vanhoutte, P.M. & Leuzen, I. Raven Press, New York. 339-353, 1981.

LAGAUD GJ, SKARSGARD PL, LAHER I & VAN BREEMEN C. Heterogeneity of endothelium-dependent vasodilation in pressurized cerebral and small mesenteric resistance arteries of the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. **290**:832-9, 1999.

LAKATTA EG & LEVY D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a “set up” for vascular disease. *Circulation*. **107**:139-46, 2003a.

LEE JH, LEE YK, ISHIKAWA M, KOGA K, FUKUNAGA M, MIYAKODA G, MORI T, HOSOKAWA T & HONG KW. Cilostazol reduces brain lesion induced by focal cerebral ischemia in rats an MRI study. *Brain Res*. **994**:91-8, 2003.

LEE JH, OH GT, PARK SY, CHOI JH, PARK JG, KIM CD, LEE WS, RHIM BY, SHIN YW & HONG KW. Cilostazol reduces atherosclerosis by inhibition of superoxide and tumor necrosis factor- α formation in low-density lipoprotein receptor-null mice fed high cholesterol. *J Pharmacol Exp Ther*. **313**:502-9, 2005.

LI H, HONG DA H, 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*. **70**:15-22, 2015.

LINCOLN TM, CORNWELL TL & TAYLOR AE. cGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca^{2+} by cAMP in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*. **258**:C399-407, 1990.

MA L, WANG K, SHANG J, CAO C, ZHEN P, LIU X, WANG W, ZHANG H, DU Y & LIU H. Anti-peroxynitrite treatment ameliorated vasorelaxation of resistance arteries in aging rats: involvement with NO-sGC-cGKs pathway. *PLoS One*. **9**:104788, 2014.

MATSUMOTO T, NOGUCHI E, ISHIDA K, NAKAYAMA N, KOBAYASHI T & KAMATA K. Cilostazol improves endothelial dysfunction by increasing endothelium-derived hyperpolarizing factor response in mesenteric arteries from Type 2 diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. **599**:102-9, 2008.

MATSUMOTO Y, TANI T, WATANABE K & KIMURA Y. Effects of cilostazol, an antiplatelet drug, on smooth muscle cell proliferation after endothelial denudation in rats. *Jpn J Pharmacol.* **58**:284, 1992.

MATZ RL & ANDRIANTSITOHAINA R. Age-related endothelial dysfunction: potential implications for pharmacotherapy. *Drugs Aging.* **20**:527-50, 2003.

MATZ RL, SCHOTT C, STOCLET JC & ANDRIANTSITOHAINA R. Age-related endothelial dysfunction with respect to nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factor and cyclooxygenase products. *Physiol Res.* **49**:11-8, 2000.

MINAMINO T & KOMURO I. Vascular aging: insights from studies on cellular senescence, stem cell aging, and progeroid syndromes. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* **5**:637-48, 2008.

MORISHITA R, HIGAKI J, HAYASHI SI, 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.* **40**:1053-61, 1997.

MUROHARA T, YASUE H, OHGUSHI M, SAKAINO N & JOUGASAKI M. Age related attenuation of the endothelium dependent relaxation to noradrenaline in isolated pig coronary arteries. *Cardiovasc Res.* **25**:1002-9, 1991.

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**:86-94, 2006.

NISHI T, TABUSA F, TANAKA T, SHIMIZU T, KANBE T, KIMURA Y & NAKAGAWA K. Studies on 2-oxoquinoline derivatives as blood platelet aggregation inhibitors. II. 6-[3-(1-cyclohexyl-5-tetrazolyl)propoxy]-1,2-dihydro-2-oxoquinoline and related compounds. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. **31**:1151-7, 1983.

NISHIO Y, KASHIWAGI A, TAKAHARA N, HIDAKA H & KIKKAWA R. Cilostazol, a cAMP phosphodiesterase inhibitor, attenuates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in response to tumor necrosis factor-alpha in vascular endothelial cells. *Horm Metab Res.* **29**:491-5, 1997.

OHASHI S, IWATANI M, HYAKUNA Y & MORIOKA Y. Thermographic evaluation of the hemodynamic effect of the antithrombotic drug cilostazol in peripheral arterial occlusion. *Arzneimittelforschung.* **35**:1203-8, 1985.

OTSUKI M, SAITO H, XU X, SUMITANI S, KOUHARA H, KURABAYASHI M & KASAYAMA S. Cilostazol represses vascular cell adhesion molecule-1 gene transcription via inhibiting NF-kappaB binding to its recognition sequence. *Atherosclerosis*. **158**:121-8, 2001.

PARK SY, LEE SW, BAEK SH, LEE SJ, LEE WS, RHIM BY, HONG KW & KIM CD. Induction of heme oxygenase-1 expression by cilostazol contributes to its anti-inflammatory effects in J774 murine macrophages. *Immunol Lett*. **136**:138-45, 2011.

RODRIGUEZ-MAÑAS L, EL-ASSAR M, VALLEJO S, LÓPEZ-DÓRIGA P, SOLÍS J, PETIDIER R, MONTES M, NEVADO J, CASTRO M, GÓMEZ-GUERRERO C, PEIRÓ C & SÁNCHEZ-FERRER CF. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell*. **8**:226-38, 2009.

RUBANYI GM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *J Cell Biochem*. **46**:27-36, 1991.

SUN D, HUANG A, YAN EH, WU Z, YAN C, KAMINSKI PM, OURY TD, WOLIN MS & KALEY G. Reduced release of nitric oxide to shear stress in mesenteric arteries of aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **286**:2249-56, 2004.

TADDEI S, VIRDIS A, GHIADONI L, SALVETTI G, BERNINI G, MAGAGNA A & SALVETTI A. Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans. *Hypertension*. **38**:274-9, 2001.

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**:313-20, 1988.

TANANO I, NAGAOKA T, OMAE T, ISHIBAZAWA A, KAMIYA T, ONO S, AND 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*. **54**:1443-9, 2013.

TODA N. Age-related changes in endothelial function and blood flow regulation. *Pharmacol Ther*. **133**:159-76, 2012.

TOYOTA T, OIKAWA DS, ABE R, SANO R, SUZUKI N, HISAMICHI S & FUKAO A. Effect of cilostazol on lipid, uric acid and glucose metabolism in patients with impaired glucose tolerance or type 2 diabetes mellitus: a double-blind, placebo-controlled study. *Clin Drug Invest*. **21**:325-335, 2001.

TRIGGLE CR, SAMUEL SM, RAVISHANKAR S, MAREI I, ARUNACHALAM G & DING H. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Can J Physiol Pharmacol.* **90**:713-38, 2012.

TSUCHIKANE E, SUZUKI T, KATOH O & SUZUKI T. Examination of anti-intima hyperplastic effect on cilostazol-eluting stent in a porcine model. *J Invasive Cardiol.* **19**:109-12, 2007.

UMEKAWA H, TANAKA T, KIMURA Y & HIDAKA H. Purification of cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase from human platelets using new-inhibitor Sepharose chromatography. *Biochem Pharmacol.* **33**:3339-44, 1984.

VANHOUTTE PM. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Arch Mal Coeur Vaiss.* **6**:9-19, 1997.

VIRDIS A, GHIADONI L, TADDEI S. Human endothelial dysfunction: EDCFs. *Eur J Physiol.* **459**: 1015-23, 2010.

WIGGERS GA, PEÇANHA FM, BRIONES AM, PÉREZ-GIRÓN JV, MIGUEL M, VASSALLO DV, CACHOFEIRO V, ALONSO MJ & SALAICES M. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **295**:1033-1043, 2008.

WU S, RUAN Y, YIN M & LAI W. Research on the age-related changes in the nitric oxide pathway in the arteries of rats and the intervention effect of dehydroepiandrosterone. *Gerontology*. **53**:234-7, 2007.

XAVIER FE, ARAS-LÓPEZ R, ARROYO-VILLA I, DEL CAMPO L, SALAICES M, ROSSONI LV, FERRER M & BALFAGÓN G. Aldosterone induces endothelial dysfunction in resistance arteries from normotensive and hypertensive rats by increasing thromboxane A2 and prostacyclin. *Br J Pharmacol*. **154**:1225-35, 2008.

XAVIER FE, BLANCO-RIVERO J, AVENDAÑO MS, SASTRE E, YELA R, VELÁZQUEZ K, SALAÍCES M, & BALFAGÓN 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.

Legends for figures

Figure 1. Systolic (A), diastolic (B), mean arterial pressure (C) and heart rate (D) from 3- and 18-month-old untreated and cilostazol-treated rats. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. ANOVA one-way: $P > 0.05$, $N = 6$.

Figure 2. Endothelium-dependent and -independent relaxation to acetylcholine (A) and sodium nitroprussiate (SNP, B), respectively, and concentration-dependent vasoconstriction to noradrenaline in mesenteric resistance arteries (MRA) from 3- and 18-month-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. $N = 6-8$ rats in each group.

Figure 3. Relaxation to acetylcholine (A) and sodium nitroprussiate (SNP, B), and concentration-dependent vasoconstriction to noradrenaline in mesenteric resistance arteries (MRA) from 18-month-old cilostazol-treated and untreated rats. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. $N = 6-8$ rats in each group.

Figure 4. Cumulative concentration–relaxation curves for isoproterenol (A) and forskolin (B) in mesenteric resistance arteries (MRA) from 18-month-old cilostazol-treated untreated and rats. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. $N = 6-8$ rats in each group.

Figure 5. Effect of preincubation with L-NAME (A,B) or ODQ (C,D) on the concentration-dependent relaxation to acetylcholine in mesenteric resistance arteries (MRA) from 18-

month-old cilostazol-treated and untreated rats. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. N=6-8 rats in each group.

Figure 6. Effect of preincubation with L-NAME plus indomethacin (A) and apamin plus TRAM-34 (B,C) on the concentration-dependent relaxation to acetylcholine in mesenteric resistance arteries (MRA) from 18-month-old cilostazol-treated and untreated rats. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. N=6-8 rats in each group.

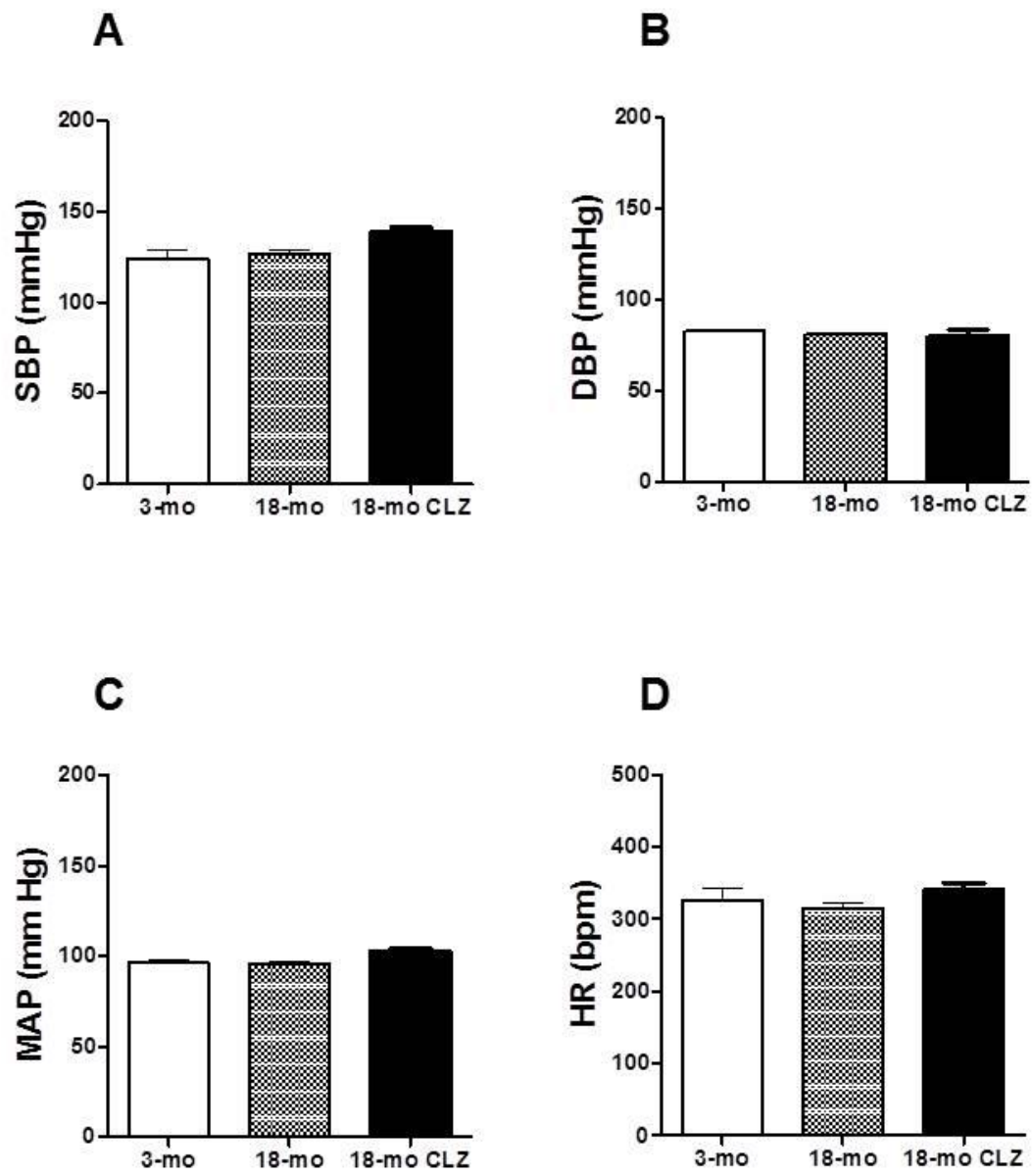
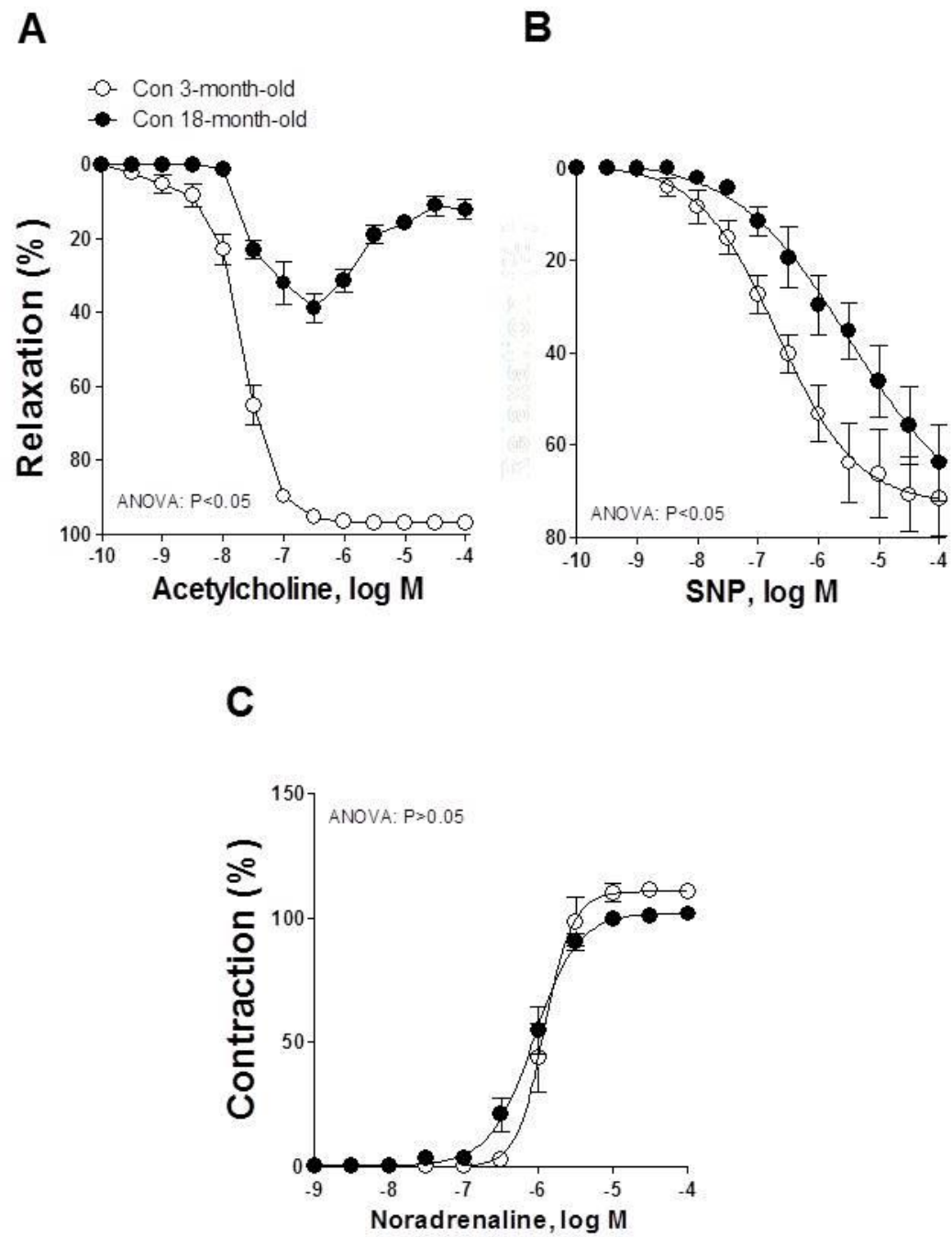
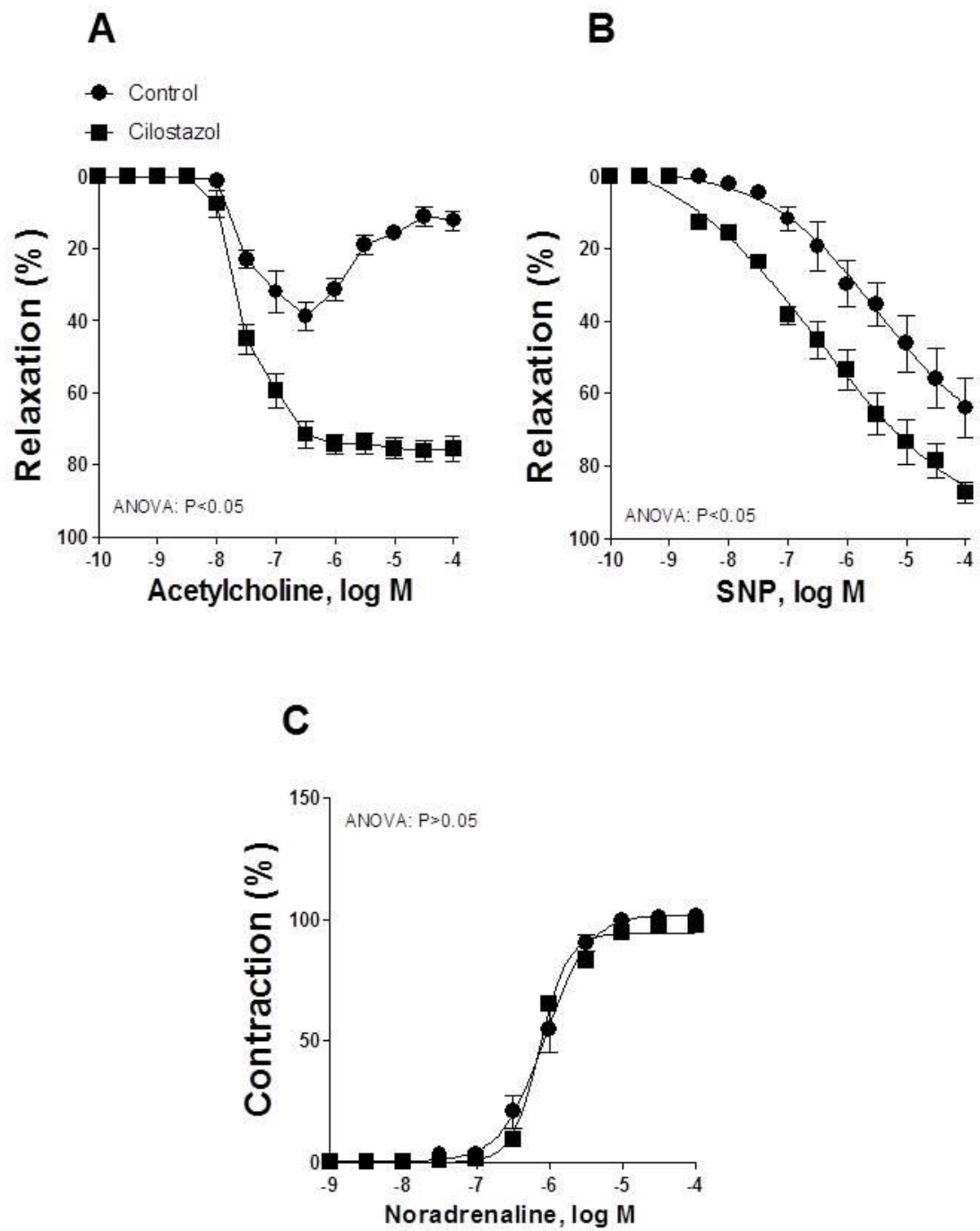


Figure 1

**Figure 2**

**Figure 3**

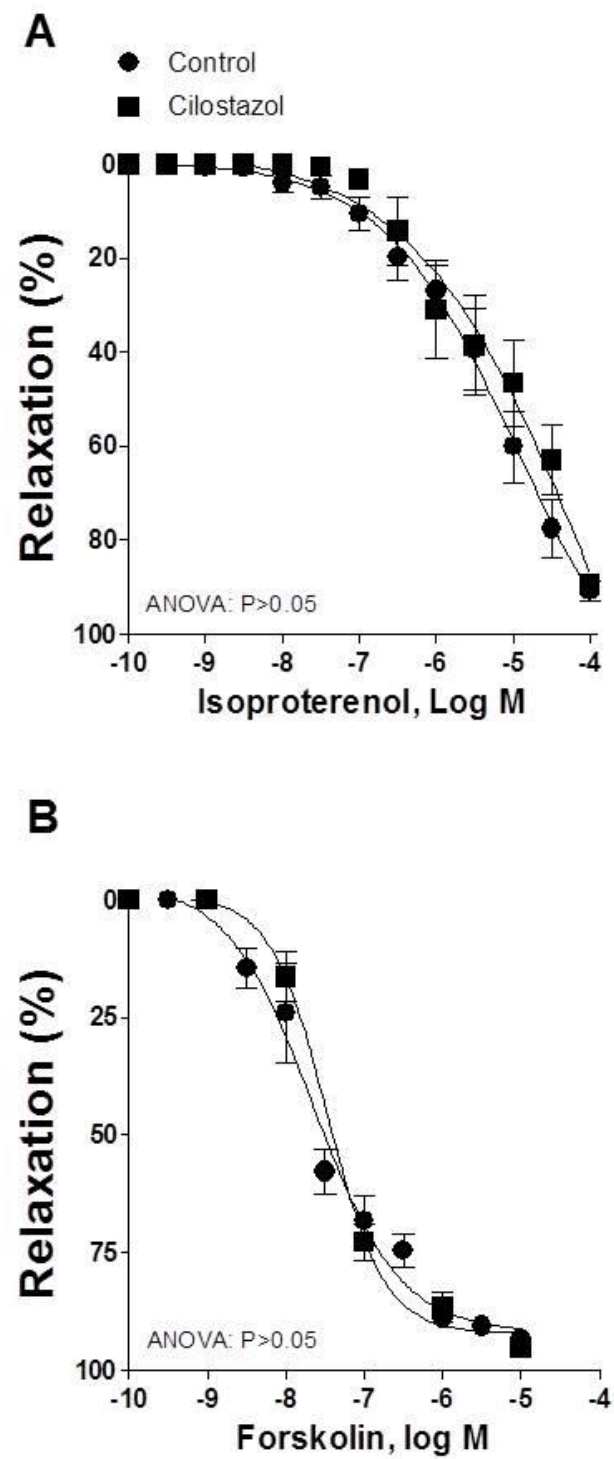
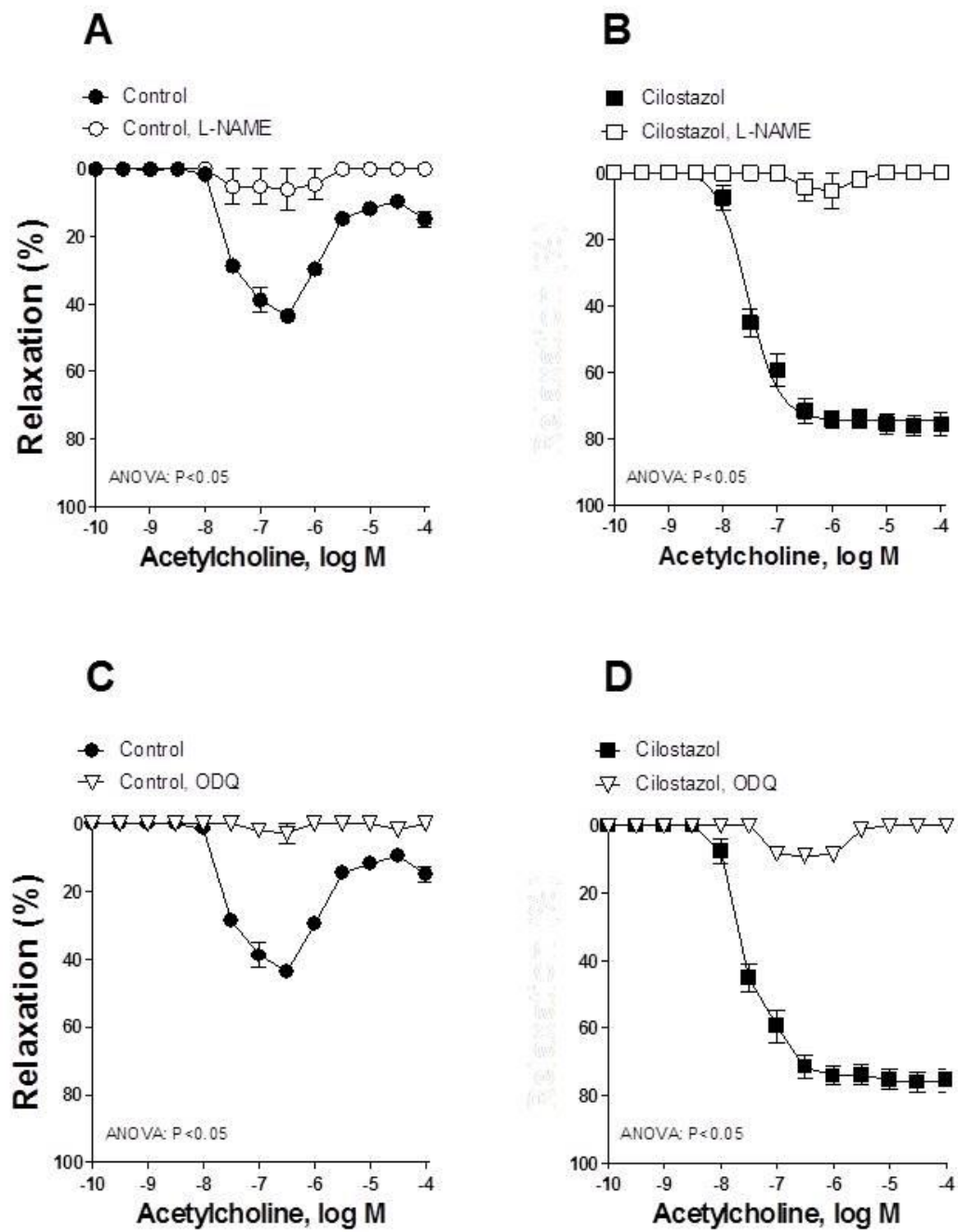
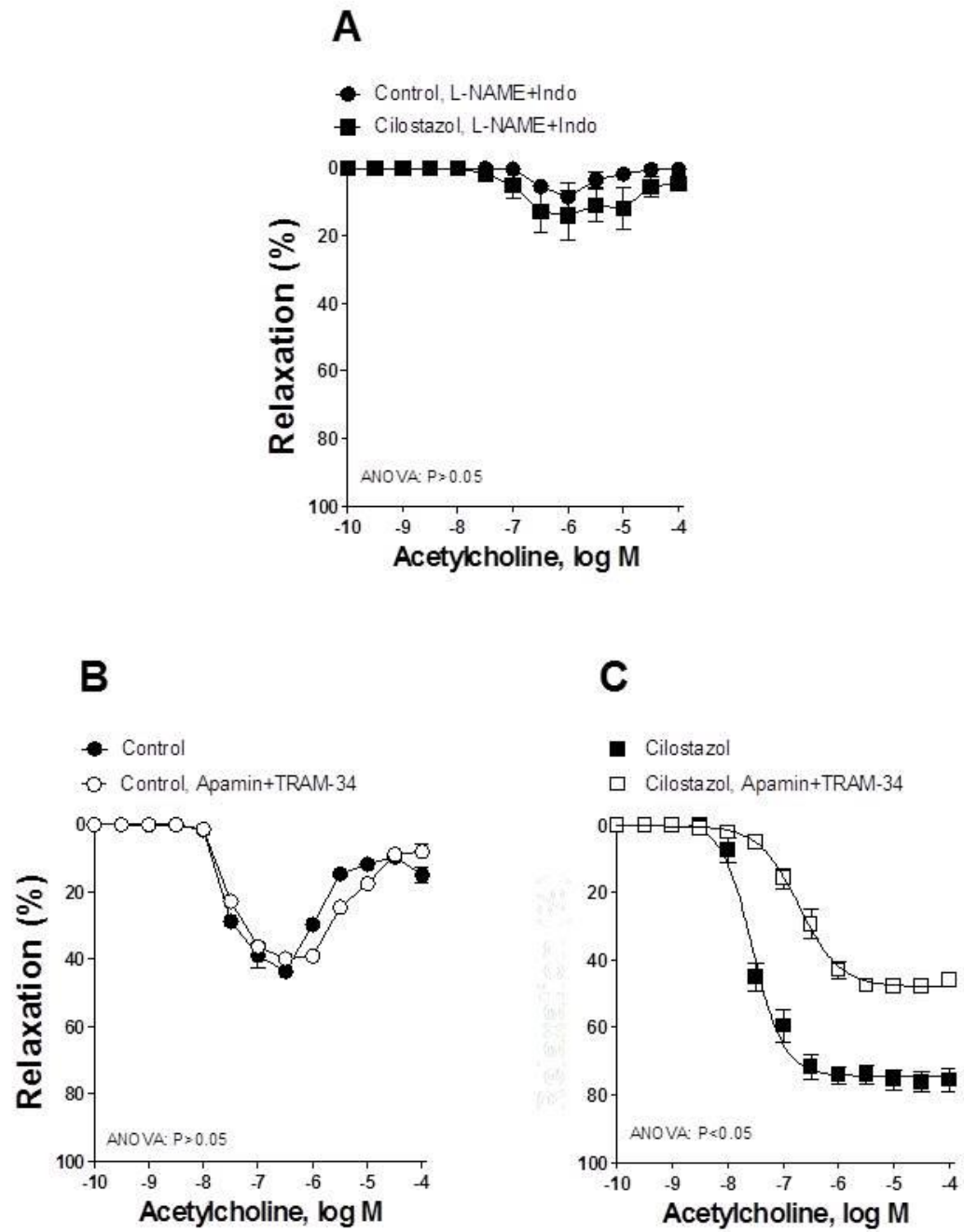


Figure 4

**Figure 5**

**Figure 6**

4. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente estudo demonstram que a administração crônica de cilostazol é capaz de reverter o prejuízo da função vascular em ratos idosos. Esta ação parece ser decorrente do provável aumento na biodisponibilidade do •NO, do aumento da participação da via de sinalização mediada pelo GMPc no músculo liso vascular e subsequente ativação dos canais para o K^+ neste tecido. Estes resultados sinalizam um possível uso deste inibidor de fosfodiesterase 3 na prevenção/ tratamento de desordens vasculares induzidas pelo envelhecimento, porém serão necessárias investigações adicionais.