



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

**NATÁLIA CAVALCANTE BARBOSA LIMA**

**EFEITOS DE ANÁLOGOS DA PROPAFENONA NA REATIVIDADE VASCULAR EM  
ANÉIS DE AORTA ISOLADOS DE RATO WISTAR**

**FORTALEZA**  
**2024**

**NATÁLIA CAVALCANTE BARBOSA LIMA**

**EFEITOS DE ANÁLOGOS DA PROPAFENONA NA REATIVIDADE VASCULAR EM  
ANÉIS DE AORTA ISOLADOS DE RATO WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Morfologia.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Jeane Bezerra Jorge.

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo de Freitas Lima.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

L699e Lima, Natália Cavalcante Barbosa.  
Efeitos de análogos da Propafenona na reatividade vascular em anéis de aorta isolados de rato Wistar / Natália Cavalcante Barbosa Lima. – 2024.  
81 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Roberta Jeane Bezerra Jorge.

Coorientação: Prof. Dr. Ricardo de Freitas Lima.

1. Propafenona. 2. Reatividade vascular. 3. Vasodilatação. 4. Análogos da propafenona. 5. Docking molecular. I. Título.

CDD 611

---

NATÁLIA CAVALCANTE BARBOSA LIMA

EFEITOS DE ANÁLOGOS DA PROPAFENONA NA REATIVIDADE VASCULAR EM  
ANÉIS DE AORTA ISOLADOS DE RATO WISTAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Morfofuncionais da  
Universidade Federal do Ceará, como requisito  
parcial à obtenção do título de mestre em  
Ciências Morfofuncionais. Área de  
concentração: Morfologia.

Aprovada em: 31/07/2024.

BANCA EXAMINADORA

*Ana Celeste Ximenes Oliveira*

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ana Celeste Ximenes Oliveira  
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

---

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*João Alison de Moraes Silveira*

---

Prof. Dr. João Alison de Moraes Silveira  
Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à minha família e amigos em especial, Bruno Wurlitzer, Érika Camboim, Caio Sousa, Izy Rebeka, Beatriz Ayres, Philipe Brito, Debora Luiza e Rafael Gediel por todo o suporte familiar e apoio que sempre me deram.

À Universidade Federal do Ceará, ao Departamento de Morfologia e ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, pela oportunidade da realização do trabalho, além de todo o suporte e estrutura oferecidos.

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

A minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Roberta Jeane Bezerra Jorge, por sempre acreditar no meu potencial durante todos esses anos como orientadora, desde a graduação, pela sua amizade, conselhos e por sempre estender a mão para mim e não medir esforços para me ajudar sempre que necessário.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Ricardo de Freitas Lima, por todos os ensinamentos, parceria e ajuda, por ter despertado em mim a curiosidade pela área cardiovascular, sempre ter me apoiado e confiado em mim e por ter sido um exemplo de pesquisador, ético e sempre buscando estudar, aprender mais e nos ensinar.

Aos professores da banca de qualificação, Prof. Marcos Matos, Prof. João Alison e a Dr<sup>ª</sup>. Ana Celeste pelo tempo disponibilizado para avaliação do trabalho, bem como pelas sugestões para engrandecimento do mesmo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais pelas contribuições para o meu crescimento científico e meu conhecimento e, em especial, às Prof<sup>ª</sup>. Renata Alvez, Renata Leitão e Camila Roncari.

Um agradecimento em especial a Prof<sup>ª</sup> Helena Serra Azul, por todo seu conhecimento e contribuições.

Ao Prof. Dr. Marcos Mattos e a Msc. Gabriela Lima pela ajuda com a síntese química dos análogos da propafenona.

A secretária Laisa, por sempre estar disposta a ajudar no que fosse preciso.

Aos funcionários do biotério, Marta, Gabriela, Yara, Alisson e Dayvson, por todo o cuidado com os nossos animais.

Aos meus colegas de laboratório, Danilo Galvão, Amanda de Oliveira, Lucas Fechine, Simone Simonato, por todo o suporte e ajuda durante esses anos, obrigada de verdade por toda a ajuda que vocês me deram.

Aos meus demais colegas do LAFAVET obrigada pela parceria e por tornarem o laboratório um lugar onde todos se sintam bem.

A Brenda Failache, por sempre me incentivar sempre com palavras de apoio e acreditar no meu potencial, muitas vezes mais do que eu mesma. Seu apoio foi fundamental para essa caminhada.

A minha amiga e colega de jogos Isabela Rodrigues, pelos momentos de descontração e palavras de apoio.

Aos meus colegas de pós-graduação Dara Mesquita e Lívia Gurgel, pelos momentos compartilhados durante as cadeiras da Pós-graduação.

“Dentro ou fora de mim, todos os dias acontece algo que me surpreende, algo que me comove, desde a possibilidade do impossível a todos os sonhos e ilusões.” (José Saramago).

## RESUMO

**Efeitos de análogos da propafenona na reatividade vascular em anéis de aorta isolados de rato Wistar.** Natália Cavalcante Barbosa Lima. Orientadora: Roberta Jeane Bezerra Jorge. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Universidade Federal do Ceará, 2024.

O presente trabalho buscou investigar os efeitos de análogos da propafenona na reatividade vascular utilizando anéis de aorta isolados de ratos Wistar, visando desenvolver novos medicamentos para doenças cardiovasculares, que são a principal causa de mortalidade global. O estudo se concentra em quatro análogos, identificados como RAC-5a, RAC-5b, RAC-5c e RAC-5d, avaliando suas potencialidades como vasodilatadores. Objetivou-se realizar um screening para avaliar os efeitos dos análogos da propafenona na reatividade vascular, verificando o efeito vasodilatador dos análogos e identificando o mais promissor com base em sua potência e eficácia, avaliando a afinidade dos análogos com os receptores  $\beta$ , canais de  $K^+$  e  $Ca^{2+}$ , no intuito de posteriormente caracterizar o mecanismo de ação do análogo selecionado. A metodologia envolve a utilização de ratos Wistar adultos, cujas aortas foram isoladas e montadas em um banho de órgãos e, após um período de estabilização, foram realizados testes de viabilidade tecidual para garantir a integridade do músculo liso e do endotélio. O efeito vasodilatador foi avaliado por meio de curvas dose-resposta com os análogos em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (PHE) ou KCl, sendo esses experimentos cruciais para determinar a eficácia e o potencial terapêutico de cada análogo. Além dos testes fisiológicos, o estudo incluiu a realização de docking molecular para prever a afinidade dos análogos com canais de cálcio e potássio, e proteínas relacionadas à via do óxido nítrico, ajudando a identificar os análogos com maior especificidade e potencial eficácia, proporcionando um entendimento mais profundo de sua interação com alvos vasculares. Os resultados mostraram que os análogos apresentaram efeitos vasodilatadores significativos, com variações em sua potência e eficácia. O análogo RAC-5b destacou-se como o mais promissor, demonstrando efeitos vasodilatadores robustos em anéis de aorta pré-contraídos, e os estudos de docking confirmaram a alta afinidade de RAC-5b por canais de cálcio e potássio, sugerindo seu mecanismo de ação como vasodilatador. A pesquisa concluiu que os análogos da propafenona, especialmente o RAC-5b, possuem potencial significativo como agentes vasodilatadores. Esses resultados sugerem que o RAC-5b, devido à sua eficácia e ação vasodilatadora, poderia ser desenvolvido como um novo medicamento para o tratamento de doenças cardiovasculares, oferecendo uma alternativa terapêutica com possivelmente menos efeitos colaterais em comparação com os tratamentos



existentes. Esta pesquisa abre caminhos promissores para o desenvolvimento de novos tratamentos cardiovasculares com base na modificação estrutural da propafenona, visando uma maior especificidade e eficácia dos novos compostos. O estudo enfatiza a necessidade de pesquisas contínuas para entender melhor os mecanismos de ação e os possíveis benefícios clínicos desses novos agentes, destacando a relevância do desenvolvimento contínuo de novos fármacos para melhorar o tratamento das doenças cardiovasculares.

**Palavras-chave:** propafenona, reatividade vascular, vasodilatação, análogos da propafenona, e docking molecular.

## ABSTRACT

**Effects of Propafenone Analogs on Vascular Reactivity in Isolated Aortic Rings of Wistar Rats.** Natália Cavalcante Barbosa Lima. Advisor: Roberta Jeane Bezerra Jorge. Master's Degree Dissertation. Postgraduate Program in Morphological Sciences, Federal University of Ceará, 2024.

The present study aimed to investigate the effects of propafenone analogs on vascular reactivity using isolated aortic rings from Wistar rats, with the goal of developing new medications for cardiovascular diseases, which are the leading cause of global mortality. The study focuses on four analogs, identified as RAC-5a, RAC-5b, RAC-5c, and RAC-5d, evaluating their potential as vasodilators. The objective was to conduct a screening to assess the effects of these propafenone analogs on vascular reactivity, verifying their vasodilatory effect, and identifying the most promising one based on its potency and efficacy. Additionally, the study aimed to evaluate the affinity of the analogs for  $\beta$  receptors,  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  channels, in order to subsequently characterize the mechanism of action of the selected analog. The methodology involved the use of adult Wistar rats, whose aortas were isolated and mounted in an organ bath. After a stabilization period, tissue viability tests were performed to ensure the integrity of the smooth muscle and endothelium. The vasodilatory effect was evaluated through dose-response curves with the analogs in aortic rings pre-contracted with phenylephrine (PHE) or KCl, with these experiments being crucial to determine the effectiveness and potential therapeutic use of each analog. In addition to the physiological tests, the study included molecular docking to predict the affinity of the analogs for calcium and potassium channels, as well as proteins related to the nitric oxide pathway, helping to identify the analogs with the highest specificity and potential efficacy, providing a deeper understanding of their interaction with vascular targets. The results showed that the analogs exhibited significant vasodilatory effects, with variations in their potency and efficacy. Among the analogs, RAC-5b stood out as the most promising, demonstrating robust vasodilatory effects in pre-contracted aortic rings, and the molecular docking studies confirmed RAC-5b's high affinity for calcium and potassium channels, suggesting its mechanism of action as a vasodilator. The research concluded that propafenone analogs, especially RAC-5b, have significant potential as vasodilatory agents. These findings suggest that RAC-5b, due to its high efficacy and strong vasodilatory action, could be developed into a new medication for treating cardiovascular diseases, offering a therapeutic alternative with potentially fewer side effects compared to existing treatments. This research opens

promising avenues for the development of new cardiovascular treatments based on the structural modification of propafenone, aiming for greater specificity and efficacy of the new compounds. The study emphasizes the need for continued research to better understand the mechanisms of action and potential clinical benefits of these new agents, highlighting the relevance of ongoing drug development to improve cardiovascular disease treatments.

**Keywords:** propafenone, vascular reactivity, vasodilation, propafenone analogs, and molecular docking.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de representação do músculo liso multiunitário (A) e músculo liso unitário (B) .....	15
Figura 2 - Esquema de contração do musculo liso .....	23
Figura 3 - Esquema da via da Rho-quinase .....	24
Figura 4 - Esquema de relaxamento do musculo liso .....	26
Figura 5 - Análogos da propafenona RAC-5a, RAC-5b, RAC-5c e RAC-5d.....	40
Figura 6 - Imagem do banho de órgãos (modular compacto).....	42
Figura 7 - Protocolo do efeito vasodilatador em segmentos de aorta pré-contraídos com PHE ou KCL .....	42
Figura 8 - Protocolo para verificar o efeito vasodilatador do análogo em segmentos de artéria pré-contraídos com KCl.....	43
Figura 9 - Protocolo para verificar o efeito vasodilatador do análogo em segmentos de artéria pré-contraídos com PHE (1µM) .....	44
Figura 10 - Protocolo de investigação do efeito inibitório do análogo sobre o influxo de Ca <sup>2+</sup> através dos canais de cálcio dependentes de voltagem.....	45

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito do RAC – 5a (n=6) e do veículo (DMSO) (n=6) em preparações de segmentos de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE (1 $\mu$ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM).....	58
Gráfico 2 - Efeito do RAC – 5b (n=6) e do veículo (DMSO) (n=6) em preparações de segmentos de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE (1 $\mu$ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM).....	58
Gráfico 3 - Efeito do RAC – 5c (n=6) e do veículo (DMSO) (n=6) em preparações de segmentos de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE (1 $\mu$ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM).....	59
Gráfico 4 - Efeito do RAC – 5d (n=6) e do veículo (DMSO) (n=6) em preparações de segmentos de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE (1 $\mu$ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (SEM), média da CE50 e média da pCE50. ....	59
Gráfico 5 - Efeito do RAC – 5b em anéis de aorta pré-contraídas com cloreto de potássio (80mmol/L) em endotélio íntegro (E+) .....	61
Gráfico 6 - Efeito do 4-AP em preparações de aorta com endotélio íntegro pré-contraídas com PHE (1 $\mu$ mol/L) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de 4-AP (10 $\mu$ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (SEM). pCE50: Controle: 4,96 $\pm$ 0,15; 4-AP: 63	
Gráfico 7- Efeito do TEA em preparações de aorta com endotélio íntegro pré-contraídas com PHE (1 $\mu$ mol/L) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de TEA (10 $\mu$ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (SEM). pCE50: Controle: 4,96 $\pm$ 0,15; TEA: 10,66 $\pm$ 947,53. ....	64
Gráfico 8 - Efeito da Glibenclamida em preparações de aorta com endotélio íntegro pré-contraídas com PHE (1 $\mu$ mol/L) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de Glibenclamida (10 $\mu$ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (SEM). pCE50: Controle: 4,96 $\pm$ 0,15; Glibenclamida: 5,26 $\pm$ 0,18. ....	65
Gráfico 9 - Efeito da Nifedipina em preparações de aorta com endotélio íntegro pré-contraídas com PHE (1 $\mu$ mol/L) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de nifedipina (10 $\mu$ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (SEM). pCE50: Controle: 4,96 $\pm$ 0,15; Nifedipina: 4,71 $\pm$ 0,13.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prevalência de hipertensão entre adultos com idade entre 30 e 79 anos.....	17
Tabela 2 - Composição da solução de Krebs-Henseleit .....	38
Tabela 3 - Composição da solução de Krebs-Henseleit sem cálcio .....	38
Tabela 4 - Fármacos utilizados .....	39
Tabela 5 - Resultado da força de afinidade entre as proteínas alvo e os ligantes.....	47
Tabela 6 - Efeito vasorrelaxante dos análogos em anéis de aorta pré-contraídos com PHE (1 $\mu$ M) com endotélio íntegro (E+).....	60
Tabela 7 - Efeito vasorrelaxante do análogo RAC – 5b em anéis de aorta pré-contraídas com PHE (1 $\mu$ mol/L) em endotélio íntegro na ausência (Controle) ou na presença dos bloqueadores. ....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AP	4-aminopiridina
ACh	Acetilcolina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina Trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BCCs	Bloqueadores dos canais de cálcio diidropiridínicos
BK	canais de K do tipo de grande condutância ativados por cálcio e voltagem
BRAs	Bloqueadores dos receptores da angiotensina
CaM	Calmodulina
CE <sub>50</sub>	Concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima
DAG	Diacilglicerol
DCV	Doenças Cardiovasculares
DFT	Teoria Funcional da Densidade
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether) -N,N,N',N'-tetraacetic acid
eNOS	NO endotelial sintase
ET-1	Endotelina-1
ET-2	Endotelina-2
ET-3	Endotelina-3
GEFs	Fatores de troca de nucleotídeos de guanina
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
HA	Hipertensão Arterial
IECAS	Inibidores da enzima de conversão da angiotensina
IP	Receptores de prostaciclina
IP <sub>3</sub>	Trifosfato de Inositol
K <sub>ATP</sub>	Os canais de potássio dependentes de ATP
K <sub>Ca</sub>	Canais de potássio ativados por cálcio
K <sub>v</sub>	Canais de potássio dependentes de voltagem
LABS	Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica
MLC	Cadeia leve da miosina - <i>myosin light chain</i>
MLCK	cinase de cadeia leve de miosina - <i>myosin light chain kinase</i>
MLPC	fosfatase da cadeia leve de miosina - <i>myosin light chain phosphatase</i>

NEMPI	Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamentos de Imagem
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PHE	Fenilefrina
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol-4,5
PKA	Proteína quinase A
PKG1 $\alpha$	Proteína quinase G1 $\alpha$
RAC – 5B	Análogo B
RAC – 5D	Análogo D
RAC -5A	Análogo A
RAC-5C	Análogo C
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR	Receptor de rianodina
SEM	Erro padrão da média
SNP	Nitroprusseto de sódio
TEA	Tetraetilamônio
UFC	Universidade Federal do Ceará
VSMC	Células musculares lisas vasculares



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1</b>	<b>Sistema Cardiovascular .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2</b>	<b>Hipertensão arterial uma doença cardiovascular.....</b>	<b>16</b>
<b>1.3</b>	<b>Contração muscular .....</b>	<b>21</b>
<b>1.4</b>	<b>Relaxamento Muscular .....</b>	<b>24</b>
<b>1.5</b>	<b>Redirecionamento de fármaco.....</b>	<b>29</b>
<b>1.6</b>	<b>Propafenona e análogos .....</b>	<b>31</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>Local de realização do estudo .....</b>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Aspectos éticos .....</b>	<b>36</b>
<b>4.4</b>	<b><i>Docking</i> molecular .....</b>	<b>36</b>
<b>4.4.1</b>	<b><i>Docking</i> molecular .....</b>	<b>36</b>
<b>4.5</b>	<b>Fármacos e reagentes .....</b>	<b>37</b>
<b>4.5.1</b>	<b>Solução de Krebs-Henseleit .....</b>	<b>37</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Reagentes utilizados .....</b>	<b>38</b>
<b>4.6</b>	<b>Análogos da Propafenona .....</b>	<b>39</b>
<b>4.7</b>	<b>Procedimento experimental.....</b>	<b>41</b>
<b>4.7.1</b>	<b>Avaliação e caracterização do efeito vasodilatador dos análogos da propafenona em anéis de aorta isoladas de ratos .....</b>	<b>41</b>
<b>4.7.2</b>	<b>Screening: Avaliação do efeito vasodilatador dos 4 análogos da propafenona</b>	<b>42</b>
<b>4.8</b>	<b>Caracterização do mecanismo de ação vasodilatador do análogo escolhido no screening.....</b>	<b>43</b>
<b>4.8.1</b>	<b>Avaliação do efeito vasodilatador do análogo RAC – 5b em segmentos de aorta pré-contraídos com KCL .....</b>	<b>43</b>
<b>4.8.2</b>	<b>Influência dos Canais de potássio no efeito vasodilatador dos análogos da propafenona em anéis de aorta pré-contraídos com PHE.....</b>	<b>43</b>
<b>4.8.3</b>	<b>Efeito do pré-tratamento com o análogo RAC – 5b na contração induzida por cálcio na presença de alta concentração de K<sup>+</sup>.....</b>	<b>44</b>
<b>4.9</b>	<b>Análise histológica dos anéis de aorta.....</b>	<b>45</b>
<b>4.10</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>45</b>

<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
<b>5.1</b>	<b>Docking molecular</b> .....	<b>46</b>
<b>5.2</b>	<b>Resultados do screening de avaliação dos análogos</b> .....	<b>57</b>
<b>5.3</b>	<b>Efeito do RAC – 5b em anéis de aorta pré-contraídas com cloreto de potássio (80mM) em endotélio íntegro (E+) (n=6)</b> .....	<b>60</b>
<b>5.4</b>	<b>Comparação do efeito do RAC-5b com a propafenona em anéis de aorta pré-contraídos com PHE (1 µM) em endotélio íntegro</b> .....	<b>61</b>
<b>5.5</b>	<b>Caracterização dos mecanismos de vasodilatação do análogo RAC – 5b</b> .....	<b>62</b>
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>68</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>71</b>
<b>8.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>72</b>
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>73</b>
<b>10.</b>	<b>ANEXO</b> .....	<b>75</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Sistema Cardiovascular

O sistema cardiovascular, de forma simplificada, pode ser compreendido como uma rede de tubos, conhecidos como vasos sanguíneos, interligados ao coração. A pressão gerada pelo coração impulsiona o sangue continuamente pelo sistema circulatório. À medida que o sangue é transportado, um conjunto de válvulas, presentes tanto no coração quanto nas veias, assegura que o fluxo sanguíneo ocorra em um único sentido.

O coração, órgão responsável pelo bombeamento sanguíneo, é dividido em duas metades por um septo: a direita e a esquerda. Cada metade atua como uma bomba independente, composta por um átrio e um ventrículo. Os átrios recebem o sangue que retorna ao coração através dos vasos sanguíneos, enquanto os ventrículos impulsionam o sangue para os vasos (KARLINER, 2002). O sangue, ao fluir do átrio direito para o ventrículo direito, é então bombeado pelas artérias pulmonares em direção aos pulmões, onde ocorre a oxigenação. Dos pulmões, o sangue oxigenado retorna ao lado esquerdo do coração pelas veias pulmonares. Os vasos sanguíneos que transportam o sangue do ventrículo direito para os pulmões e de volta ao átrio esquerdo constituem a circulação pulmonar (SINGH, et al., 2024).

O sangue oxigenado, proveniente dos pulmões, entra no átrio esquerdo e flui para o ventrículo esquerdo, de onde é bombeado para a aorta, uma grande artéria que se ramifica em artérias menores, que por sua vez se dividem em artérias ainda menores até alcançarem a rede capilar. Após deixar os capilares, o sangue flui para o lado venoso da circulação, movendo-se de pequenas veias para veias progressivamente maiores. As veias da parte superior do corpo convergem para formar a veia cava superior, enquanto as veias da parte inferior convergem para formar a veia cava inferior. Ambas as veias cavas desembocam no átrio direito. Os vasos sanguíneos que conduzem o sangue do lado esquerdo do coração para os tecidos corporais e de volta ao lado direito são conhecidos como circulação sistêmica.

Ao sair do ventrículo esquerdo, o sangue flui pelas artérias coronárias, que nutrem o próprio músculo cardíaco. O sangue dessas artérias perfunde os capilares e é coletado pelas veias coronárias, que desembocam diretamente no seio coronário, no átrio direito. Ramos ascendentes da aorta suprem os braços, a cabeça e o encéfalo, enquanto a aorta abdominal fornece sangue ao tronco, pernas e órgãos internos, como fígado (através da artéria hepática), trato digestório e rins (através da artéria renal).

O músculo cardíaco difere significativamente do músculo esquelético e compartilha algumas propriedades com o músculo liso. De forma simplificada o músculo liso é dividido em dois tipos: músculo liso multiunitário e músculo liso unitário. O primeiro, músculo liso multiunitário, é composto de fibras musculares separadas e discretas, onde cada fibra opera de forma independente das outras e seu controle é feito principalmente por sinais nervosos.

O segundo tipo, apesar de seu nome sugerir que as fibras são isoladas, na verdade consiste em centenas de milhares de fibras musculares lisas que se contraem simultaneamente, como uma única unidade. Essas fibras estão organizadas em camadas ou feixes, e suas membranas estão conectadas em diversos pontos, permitindo que a força gerada em uma fibra seja transmitida para a próxima. A maior parte do controle sobre essas fibras é exercida por sinais não nervosos. O músculo liso unitário é encontrado em diversas partes do corpo, como no trato gastrointestinal, ductos biliares, útero, ureteres e muitos vasos sanguíneos (Figura 1) (HALL, 2017). Entender o funcionamento do músculo liso é fundamental para que seja possível o estudo e compreensão de doenças atreladas ao sistema cardiovascular (BKAILY; JACQUES, 2023).

Figura 1 - Esquema de representação do músculo liso multiunitário (A) e músculo liso unitário (B)



**A** Músculo liso multiunitário

**B** Músculo liso unitário

A contração do ventrículo é o que gera a força necessária para o fluxo sanguíneo pelo sistema circulatório. Quando o ventrículo esquerdo se contrai, ele ejeta o sangue para a aorta e as artérias, ambas se expandem para acomodar esse sangue. Dessa maneira, a pressão arterial está diretamente relacionada ao tônus do músculo liso nas paredes das artérias. A pressão arterial é mais alta nas artérias e vai diminuindo à medida que o sangue flui pelo sistema circulatório (SINGH, et al., 2024).

## 1.2 Hipertensão arterial uma doença cardiovascular

As doenças cardiovasculares englobam um conjunto de condições que afetam o coração e os vasos sanguíneos, incluindo: doença coronariana, cerebrovascular, doença arterial periférica, doença cardíaca reumática, Cardiopatia congênita, trombose venosa profunda e embolia pulmonar. Eventos agudos, como infartos e acidentes vasculares cerebrais (AVCs), geralmente ocorrem devido à obstrução do fluxo sanguíneo para o coração ou o cérebro. A principal causa é o acúmulo de depósitos de gordura nas paredes internas dos vasos que irrigam essas áreas. No caso dos AVCs, podem ocorrer tanto por obstruções quanto por hemorragias nos vasos cerebrais ou por coágulos. Os fatores de risco mais comuns para esses eventos incluem o uso de tabaco, dietas inadequadas, obesidade, sedentarismo, consumo excessivo de álcool, hipertensão arterial, diabetes e dislipidemias.

Do ponto de vista patológico as doenças cardiovasculares (DCV) se definem como um grupo de doenças não transmissíveis que acometem o coração e os vasos sanguíneos (OPAS, 2024). A maioria das DCV podem ser prevenidas por meio de práticas regulares de exercício e intervenções aos fatores comportamentais de risco supracitados. Além disso fatores descritos anteriormente destaca-se ainda a inflamação onde estudos recentes mostram seu papel na progressão de DCV, incluindo infarto do miocárdio, hipertensão, aterosclerose e insuficiência cardíaca hipertrófica (GOSWAMI *et al.*, 2021). Nos últimos sete anos as DCV foram responsáveis por um terço de todas as mortes do mundo. Em 2019, estima-se que 17,9 milhões de com menos de 70 anos tenham falecido devido a doença. No Brasil, no mesmo ano, aproximadamente 364.132 pessoas morreram em decorrência de doenças cardiovasculares, segundo o DATASUS (BONFIM *et al.*, 2024).

Mesmo com os significativos avanços no controle de DCV, estas continuam sendo uma das principais causas de morte no mundo. Apesar de não-transmissíveis elas possuem a capacidade de causar distúrbios principalmente no coração, vasos sanguíneos e até mesmo em outros órgãos. A morbidade e mortalidade por DVC permanecem altas tanto em países

desenvolvidos como em países em desenvolvimento (WANG; LI; ZHENG, 2024). Além disso, produtos farmacêuticos, drogas ilícitas e toxinas podem contribuir significativamente para o agravamento da doença (MLADĚNKA *et al.*, 2018).

A principal causa dentre as doenças cardiovasculares que causam um alto índice de mortes, são as doenças coronárias (47%) e as doenças cerebrovasculares (38%) e ambas as doenças apresentam um fator de risco em comum para o seu desenvolvimento, a hipertensão arterial (HA) (DILDORA DILMURODOVNA, 2024). A HA é um dos problemas médicos e sociais mais urgentes e que leva a uma alta taxa de doenças cardiovasculares e mortes nos países afetados. A Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) alerta que, somente nas Américas, apenas 1% da população tem controle sobre sua hipertensão, que a cada ano aumenta o número de pessoas que morrem devido a doenças cardiovasculares representando a primeira causa de morte (MARTINEZ *et al.*, 2020). A Organização Mundial da Saúde (OMS) alerta que de acordo com especialistas da área, há uma projeção que em 2025 cerca de 29% dos homens e 29,5% das mulheres ao redor do mundo terão problemas de hipertensão arterial, o que possivelmente trará problemas como acidentes vasculares cerebrais (AVC), enfartos e doença arterial coronariana (FLOOD *et al.*, 2022).

Em 2023, a OMS publicou um Relatório Global sobre a Hipertensão (OMS, 2023), o qual traz um panorama de países do mundo todo e evidencia que países com economia subdesenvolvida, ou cujo recorte das classes sociais limitam o acesso a uma renda que promova uma qualidade de vida, alimentação saudável e prática de exercícios apresentam uma prevalência de 34% de casos de hipertensão entre adultos de 30 a 79 anos, enquanto países desenvolvidos, onde sua população tem acesso com mais facilidade aos hábitos supracitados, é de 32%. Há também uma variação regional onde a região do Pacífico Ocidental apresenta uma predominância de 25% de casos de HA, enquanto na região do Mediterrâneo é de 38% como evidenciado na Tabela 1.

Tabela 1 - Prevalência de hipertensão entre adultos com idade entre 30 e 79 anos

Região	Hipertensão (%)	Cobertura do Diagnóstico (%)	Cobertura do Tratamento (%)	Cobertura Efetiva do tratamento (%)
África	36 (38, 33)	43 (46,39)	27 (30, 24)	12 (14, 9)
As Américas	35 (38, 33)	70 (73, 67)	60 (64, 57)	36 (41,32)

Sudeste Asiático	32 (36, 39)	39 (44, 34)	30 (34, 25)	14 (18,10)
Europa	37 (39, 35)	66 (69, 63)	53 (56, 50)	26 (29, 23)
Região do Oeste Mediterrâneo	38 (41, 35)	49 (53, 45)	39 (43, 34)	15 (19, 13)
Região do Oeste Pacífico	28 (32, 25)	54 (59,48)	41 (47, 35)	18 (23, 14)
Global	33 (35, 32)	54 (56, 51)	42 (45, 40)	21 (23,19)

Tabela de Hipertensão controlada entre todos os casos de hipertensão no mundo, tendo como hipertensão controlada definida como pressão arterial sistólica <140 mmHg e diastólica <90 mmHg e o paciente está tomando medicação para hipertensão. Os dados entre parênteses são intervalos de incerteza de 95%. Fonte: Adaptado de Observatório Global de Saúde (GHO).

Nas Américas foram cerca de 7.3 milhões de casos de doenças cardiovasculares e cerca de 2.1 milhões de mortes no ano de 2019 (FLOOD *et al.*, 2022). Especificamente no Brasil, cerca de 27,9% da população tem hipertensão arterial, ocorrendo mais em mulheres (29,3%) que em homens (26,4%), a incidência da doença é maior com o aumento da idade e com baixo nível de escolaridade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024). Além disso, a hipertensão arterial contribui para mais de 50% das doenças cardiovasculares, que representam a principal causa de morte nas Américas (CAMPBELL *et al.*, 2022)

A OPAS monitora anualmente as doenças cardiovasculares e busca maneiras de facilitar tanto o diagnóstico quanto o tratamento dessas condições. Embora existam ferramentas farmacológicas modernas que auxiliem nesse processo, a organização ressalta que o controle da HA enfrenta diversos obstáculos. Entre esses desafios estão o diagnóstico inadequado ou não validado, o uso de dispositivos de medição de pressão arterial não certificados, e a falta de padronização e treinamento das equipes especializadas nos hospitais. Além disso, a aplicação de diretrizes clínicas extensas e complexas, a prescrição arbitrária de medicamentos sem incentivo a hábitos saudáveis e a ausência de consideração pelo histórico do paciente complicam ainda mais a gestão da HA. A carência de um sistema de monitoramento e avaliação contínuo e focado na melhoria da qualidade também contribui para essa dificuldade (MARTINEZ *et al.*, 2020).

É evidente que as DCV continuam a ser uma preocupação significativa de saúde pública global. A HA, como um dos principais fatores de risco, desempenha um papel crucial no desenvolvimento dessas doenças e mesmo com avanços na medicina e nas estratégias de prevenção, a prevalência de DCV e HA permanece alta, especialmente em países subdesenvolvidos e em populações com acesso limitado a cuidados de saúde adequados. A

urgência de estratégias eficazes de prevenção e controle, incluindo a promoção de hábitos de vida saudáveis e o aprimoramento dos sistemas de saúde para diagnósticos e tratamentos mais precisos e padronizados, é clara. A colaboração entre organizações de saúde, governos e comunidades é essencial para enfrentar esse desafio de forma eficaz e reduzir a morbidade e mortalidade associadas às DCV.

Atualmente, no contexto do controle da hipertensão, a clínica possui uma série de fármacos que buscam produzir efeitos interferindo nos mecanismos normais de regulação da pressão arterial. Estes fármacos são divididos de acordo com o principal local regulador, ou mecanismo sobre o qual atuam, e em virtude de seus mecanismos comuns de ação, estes são classificados nas seguintes categorias:

- Diuréticos – Hidroclorotiazida, furosemida, esprirolactona, eplerenona;
- Agentes simpaticoplégicos – Cloridina, metildopa;
- Bloqueadores das terminações nervosas simpáticas – Reserpina, guanetidina;
- $\alpha$ -bloqueadores – Prazosina, terazosina, doxazosina;
- $\beta$ -bloqueadores – Metoprolol, carvedilol; propranolol, atenolol;
- Vasodilatadores diretos – Verapamil, diltiazem, nifedipino, hidralazina, minoxidil;
- Agentes Parenterais – Nitroprusseto, fenoldopam, diazóxido, labetalol.
- Inibidores da Enzima conversora de Angiotensina (ECA) – Captopril;
- Bloqueadores dos receptores de Angiotensina II (BRA) – Losartana;
- Inibidores da Renina – Alisquireno;

A atuação diferenciada desses grupos de fármacos em distintos mecanismos regulatórios da pressão arterial permite a associação terapêutica de dois ou mais agentes. Essa combinação não apenas potencializa a eficácia no controle da hipertensão, mas também pode reduzir a toxicidade, ao se aproveitar de suas características complementares de cada classe medicamentosa. Fármacos como o nitroprusseto de sódio (SNP) tem sido empregado em situações emergenciais hipertensivas bem como na insuficiência cardíaca. Administrado por infusão intravenosa o SNP tem um poderoso efeito vasodilatador, dilatando tanto vasos arteriais quanto venosos com conseqüente redução da resistência vascular periférica e de retorno venoso. Sua farmacodinâmica ocorre em decorrência da ação da guanililciclase, ativada por óxido nítrico ou pela estimulação direta da enzima, que aumenta a concentração do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) intracelular, causando assim o relaxamento da musculatura lisa (COHN et al., 1986). Apesar da sua ação



rápida, seus efeitos desaparecem em 1 a 10 minutos após a suspensão do fármaco. Sua dose começa em 0,5mcg/kg/min, podendo ser aumentada até 10 mcg/kg/min caso necessário para o controle da pressão arterial. Velocidades maiores resultam em toxicidade, devido ao acúmulo de cianeto, podendo causar acidose metabólica, hipotensão excessiva, arritmias e até mesmo morte. Outra ferramenta comum no tratamento de HA é o uso de bloqueadores de cálcio, que além de seus efeitos antianginosos e antiarrítmicos, apresentam mecanismo de ação na hipertensão diminuindo a resistência periférica e a pressão arterial ao inibir o influxo de cálcio nas células musculares lisas arteriais (FURBERG *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da hipertensão arterial é de grande importância por diversas razões, tanto para aprimorar as opções terapêuticas disponíveis quanto para enfrentar os desafios globais associados ao controle dessa condição. Um dos principais fatores é a resistência ao tratamento e a variabilidade individual, já que muitos pacientes apresentam hipertensão resistente ou respondem de maneira insatisfatória aos medicamentos atualmente utilizados, em função de variabilidade genética, interações medicamentosas ou características fisiológicas específicas. Dessa forma, novos fármacos podem oferecer alternativas mais eficazes, melhorando o controle da pressão arterial nesses casos.

Outro aspecto relevante é a redução de efeitos colaterais. Embora os fármacos anti-hipertensivos existentes sejam eficazes, muitos pacientes interrompem o tratamento devido a efeitos adversos, como tontura, fadiga, disfunção sexual e problemas metabólicos. Portanto, o desenvolvimento de novos medicamentos com menor incidência de efeitos colaterais pode melhorar a adesão ao tratamento e garantir que os pacientes sigam as terapias prescritas de forma consistente e prolongada.

Ademais, os avanços na farmacologia de precisão têm permitido o desenvolvimento de tratamentos mais específicos e personalizados, voltados para subgrupos de pacientes com base em fatores como genética, comorbidades e respostas a tratamentos anteriores. Esses fármacos personalizados podem aumentar a eficiência terapêutica e melhorar o controle da hipertensão. Além disso, a inovação nos mecanismos de ação dos medicamentos é essencial, uma vez que a maioria dos tratamentos atuais atua sobre os mesmos alvos fisiológicos, como o sistema renina-angiotensina e os canais de cálcio. Fármacos que explorem novos mecanismos podem oferecer alternativas para pacientes que não respondem bem às opções disponíveis, além de permitir combinações terapêuticas mais eficazes.

A melhoria da qualidade de vida também é um aspecto central, pois a hipertensão está associada a complicações graves, como doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral e insuficiência renal. Novos fármacos podem prevenir essas complicações de maneira mais eficiente, garantindo melhor qualidade de vida a longo prazo para os pacientes hipertensos. Além disso, muitos pacientes com hipertensão também apresentam comorbidades, como diabetes, dislipidemia e obesidade, o que exige tratamentos concomitantes. Fármacos que possam abordar vários aspectos da síndrome metabólica de forma integrada seriam altamente benéficos, reduzindo a necessidade de múltiplos medicamentos e minimizando o risco de interações medicamentosas.

Por fim, o desenvolvimento de novos fármacos também pode resultar em maior acessibilidade e custo-benefício, especialmente em países em desenvolvimento, onde o custo dos medicamentos e a infraestrutura de saúde são desafios significativos. Assim, o desenvolvimento contínuo de fármacos inovadores para o tratamento da hipertensão arterial é crucial para atender às necessidades clínicas diversificadas e melhorar o manejo dessa condição em escala global.

### **1.3 Contração muscular**

Para que ocorra a contração muscular pelo músculo liso, é necessário que haja uma elevação da concentração citosólica do  $\text{Ca}^{2+}$ , que pode ser causada por uma estimulação nervosa, ação de hormônios, estriamento da fibra, ou alteração química do ambiente.

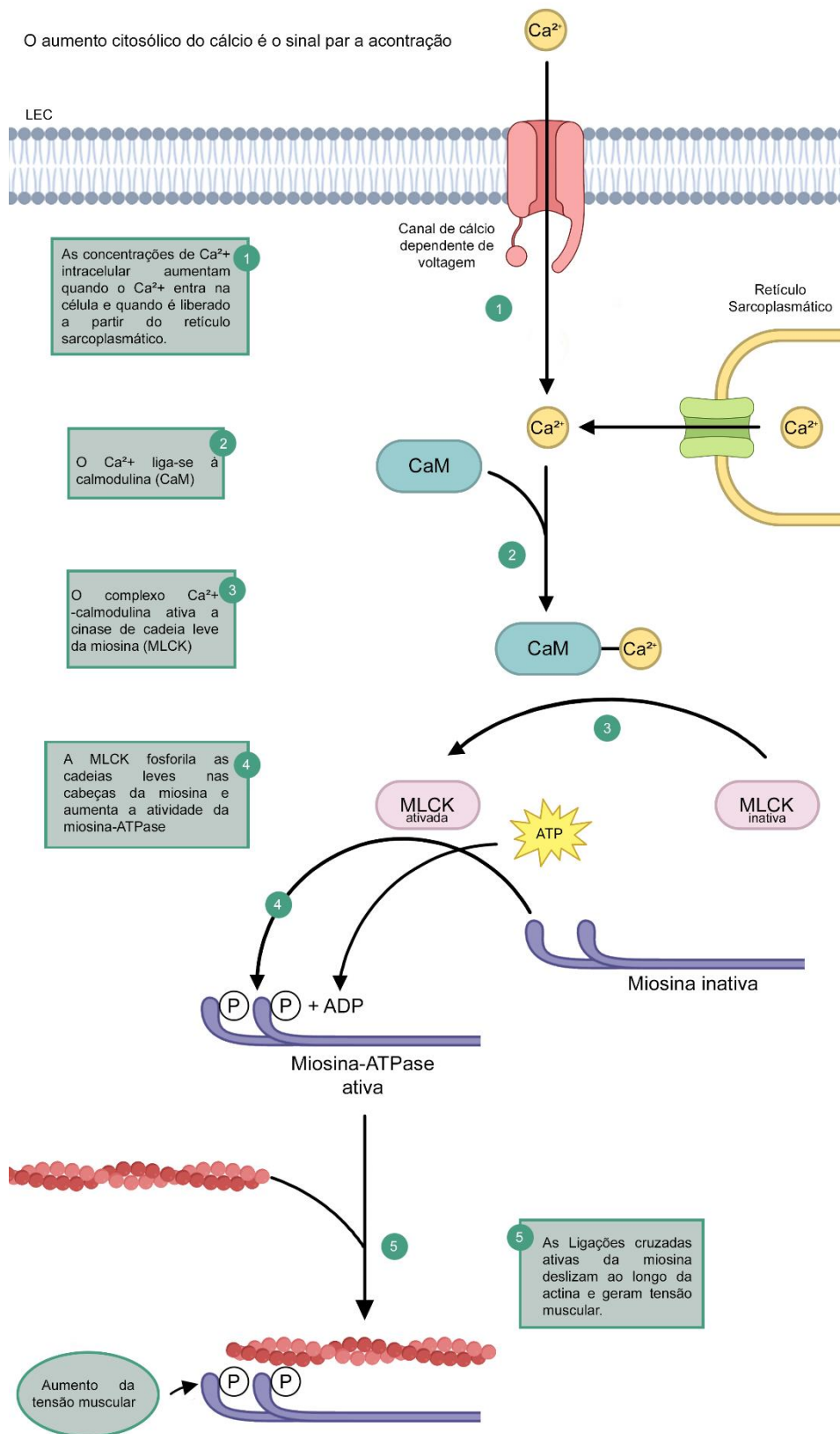
Quando o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ocorre por meio de influxo, isso significa que o cálcio entra na célula a partir do ambiente extracelular. Esse processo é independente dos estoques internos de  $\text{Ca}^{2+}$  e é mediado por canais de membrana que podem ser ativados de diferentes formas: por variações de voltagem, pela ligação a moléculas específicas (ligantes) ou por estímulos mecânicos. Os canais dependentes de voltagem, por exemplo, se abrem em resposta a uma despolarização da membrana, ou seja, uma mudança no potencial elétrico. Quando há um estímulo que não atinge o limiar necessário (potencial graduado sub-limiar), ainda assim pode ocorrer a abertura de alguns canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , permitindo a entrada de pequenas quantidades de cálcio na célula. Essa entrada inicial causa uma despolarização adicional, abrindo mais canais de cálcio dependentes de voltagem e intensificando o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Além disso, o influxo também pode ocorrer por canais dependentes de ligantes, que se abrem quando uma molécula específica (ligante) se liga ao

canal. Esse mecanismo permite a entrada de cálcio suficiente para desencadear a liberação de cálcio armazenado no retículo sarcoplasmático (RS) (MATSUDA; LOZINSKAYA, 1997; FÉLÉTOU; VERBEUREN; VANHOUTTE, 2009). Independente da origem, esses íons cálcio se ligam a uma proteína reguladora chamada calmodulina (CaM) formando um complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, esse complexo ativa uma cadeia proteica reguladora chamada cinase de cadeia leve de miosina (*myosin light chain kinase* – MLCK) que está localizada na base da cabeça da miosina e os processos de fosforilação e desfosforilação controlam a contração e relaxamento do músculo.

A fosforilação ocorre quando o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina ativa a MLCK, a enzima então ativa as cadeias proteicas leves de miosina. A fosforilação da miosina intensifica a atividade da miosina-ATPase, uma vez ativa a ligação à actina e os ciclos das ligações cruzadas resultam no aumento da tensão muscular. Essa isoforma da miosina-ATPase do músculo liso é muito mais lenta comparada com a do músculo esquelético, o que acaba reduzindo a frequência de ciclos das ligações cruzadas (Figura 2).

O estoque intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  do músculo liso está no RS, e sua liberação é mediada por um receptor de rianodina (RyR), que é um canal de liberação de cálcio, e por um canal receptor de trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ). O canal de RyR se abre em resposta ao  $\text{Ca}^{2+}$  devido ao processo chamado liberação de cálcio induzida por cálcio já os canais de  $\text{IP}_3$  abrem quando o receptor acoplado a proteína G ativa as vias de transdução de sinal da fosfolipase C convertem o fosfatidilinositol-4,5 ( $\text{PIP}_2$ ) em diacilglicerol (DAG) e  $\text{IP}_3$  onde este último ao se difundir no citoplasma, se liga ao canal receptor do RS e libera o  $\text{Ca}^{2+}$  armazenado no RS para o citosol (SILVA, 2009).

Figura 2 - Esquema de contração do músculo liso

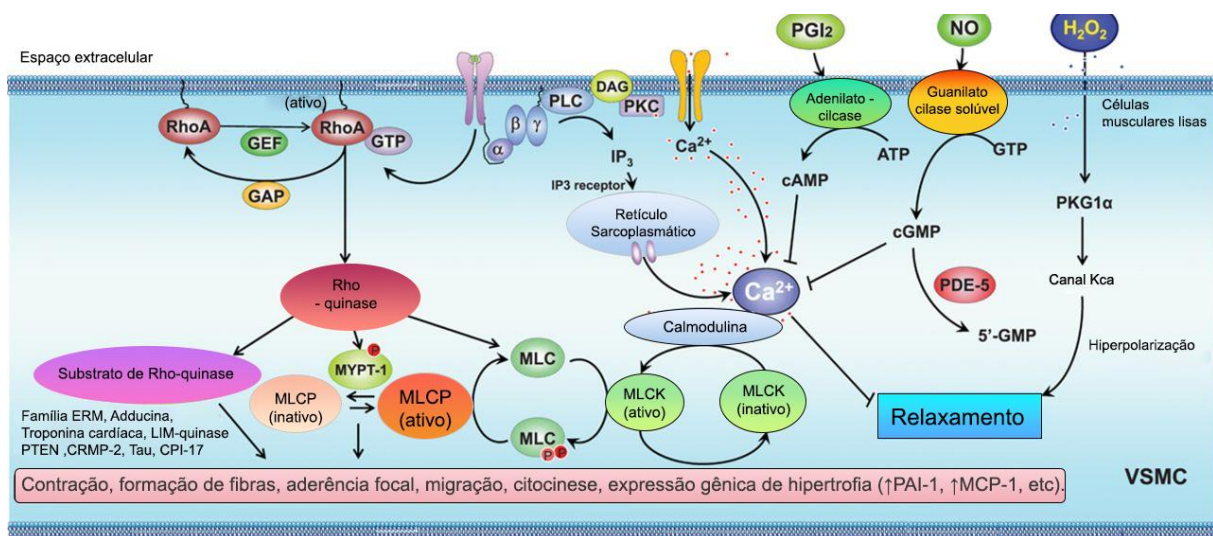


Fonte: Adaptado de SILVERTHOR, 2017

Outra via crucial para a contração muscular é mediada pela Rho-quinase. A Rho-quinase desempenha papéis importantes em muitas vias de sinalização intracelular. Agonistas ligam-se aos receptores acoplados à proteína G e induzem a contração muscular, aumentando a concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  e a atividade da Rho-quinase através da ativação dos fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs). A atividade da Rho-quinase é aumentada por ligação ao RhoA ativo que está ligado ao GTP (SHIMOKAWA; SUNAMURA; SATOH, 2016).

A Rho-quinase pode fosforilar várias proteínas, incluindo a cadeia leve da miosina (MLC), a subunidade alvo da miosina fosfatase (MYPT-1), a família ezrina/radixina/moesina, a aducina, a fosfatase e homólogo de tensina, a NO endotelial sintase (eNOS), a proteína Tau e a LIM-quinase. A MLC é crucial para a contração das células musculares lisas vasculares (VSMC), sendo fosforilada pela MLC quinase (MLCK) ativada por  $Ca^{2+}$ /calmodulina e desfosforilada pela MLC fosfatase (MLCP) (Figura 3).

Figura 3 - Esquema da via da Rho-quinase



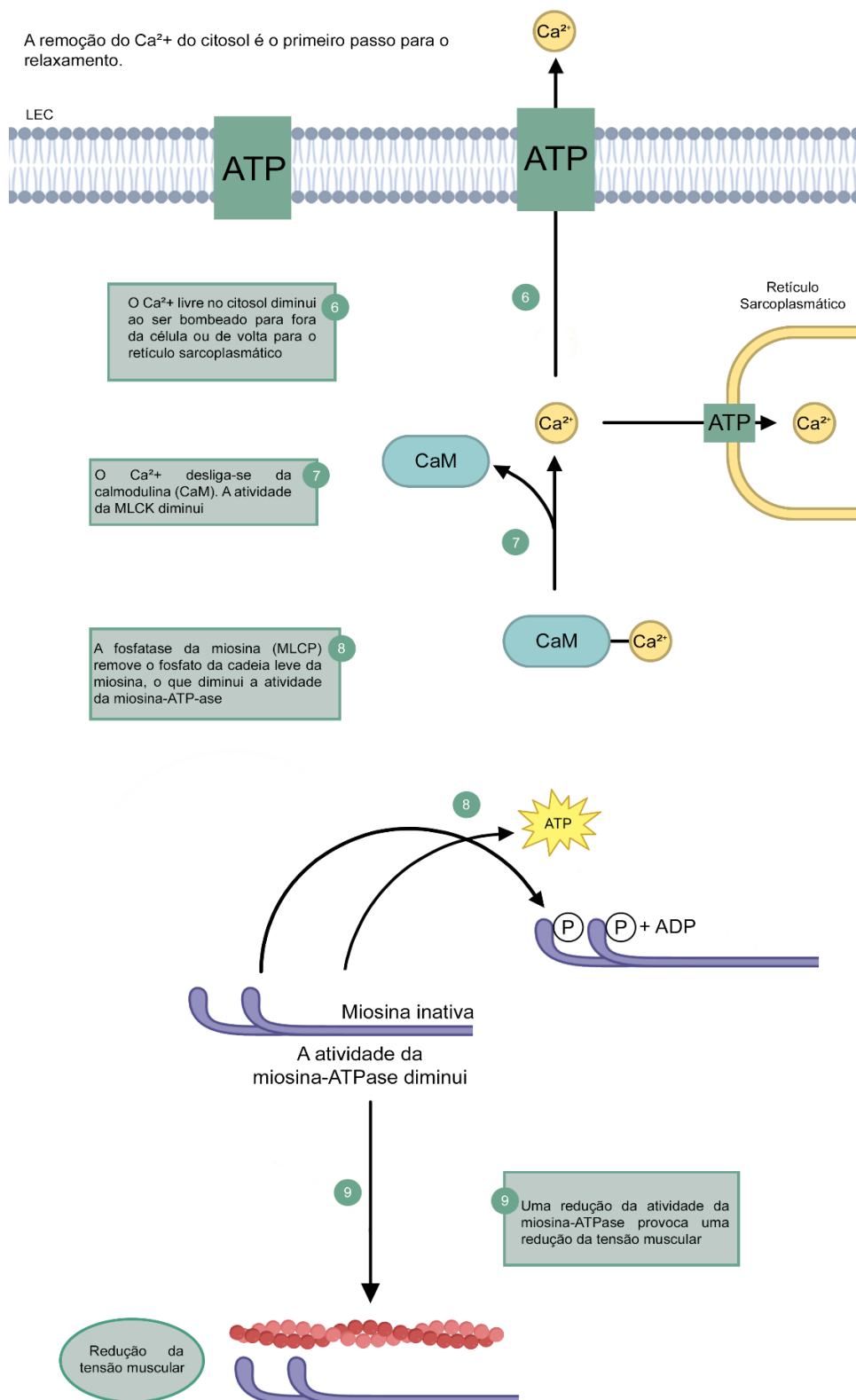
Fonte: Adaptado de SHIMOKAWA; SUNAMURA; SATOH, 2016)

## 1.4 Relaxamento Muscular

O relaxamento da fibra muscular lisa envolve múltiplas etapas, nas quais o  $Ca^{2+}$  livre é removido do citosol pela ação da  $Ca^{2+}$ -ATPase, que o bombeia de volta para o retículo sarcoplasmático (RS), e pelo efluxo de  $Ca^{2+}$  para fora da célula por meio das bombas  $Ca^{2+}$ -ATPase e  $Na^{+}$ - $Ca^{2+}$  (Figura 4). Pela lei de ação das leis das massas, a diminuição

do  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma livre faz o  $\text{Ca}^{2+}$  se desligar da calmodulina. Uma vez que o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina está ausente, a cinase da cadeia leve da miosina torna-se inativada. À medida que a MLCK se torna menos ativa, a fosfatase da cadeia leve da miosina desfosforila a miosina. A atividade da miosina-ATPase diminui e o músculo relaxa. Para o relaxamento de uma fibra muscular lisa a desfosforilação da miosina não resulta automaticamente no relaxamento muscular.

Figura 4 - Esquema de relaxamento do musculo liso



Fonte: Adaptado, SILVERTHORN, 2017

Há uma enzima, a eNOS que está presente na parede dos vasos sanguíneos e é expressa de forma constitutiva, sendo regulada pelo complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina ( $\text{Ca}^{2+}$ /CAM) (SALERON et al., 2002), ela é capaz de produzir óxido nítrico (NO) mediante determinados estímulos. Em condições fisiológicas basais, o NO liberado exerce um papel crucial na proteção dos vasos sanguíneos e está envolvido em diversos processos de relaxamento vascular (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). Alguns estudos apontaram que distúrbios nesta enzima podem resultar em uma diminuição da disponibilidade de NO, o que pode levar ao aparecimento de DCV (KOLLURU; SIAMWALA; CHATTERJEE, 2010).

O principal mecanismo de ativação da eNOS depende do cálcio e ocorre por meio do aumento da concentração intracelular deste íon, um importante sinalizador celular, que possui uma alta afinidade pela proteína calmodulina (DIAS; NEGRÃO; RIEGER, 2011). Na reação catalisada pela eNOS, inicialmente, o NADPH doa elétrons ( $e^-$ ) para o domínio redutase da enzima, que são então transferidos para o domínio oxigenase, através dos transportadores redox FAD e FMN (MONCADA; HIGGS, 1993). Esses elétrons, por fim, interagem com o ferro heme e  $\text{BH}_4$  no sítio ativo, catalisando a reação do oxigênio com L-arginina, formando o radical livre NO e a citrulina. Após sua síntese, o NO é liberado no endotélio (ALDERTON et al., 2019).

A prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) é outro importante mediador da vasodilatação, produzida pelas células endoteliais a partir do ácido araquidônico através da ação da enzima prostaciclina sintase.  $\text{PGI}_2$  atua ligando-se aos receptores de prostaciclina (IP) nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos, acarretando à ativação da adenilato ciclase, enzima esta que converte adenosina trifosfato (ATP) em adenosina monofosfato cíclico (AMPc). O aumento dos níveis de AMPc resulta na ativação da proteína quinase A (PKA), que fosforila várias proteínas, promovendo o relaxamento das células musculares lisas e a consequente vasodilatação. A disfunção na produção ou sinalização da  $\text{PGI}_2$  pode estar associada a condições como hipertensão pulmonar e aterosclerose. A administração de análogos da  $\text{PGI}_2$  é uma estratégia terapêutica usada no tratamento de hipertensão pulmonar, evidenciando a importância clínica desta via na regulação do tônus vascular e na prevenção de doenças cardiovasculares (VANHOUTTE *et al.*, 2017).

O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) é mais um mediador na sinalização redox e desempenha um papel significativo na vasodilatação. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser produzido como um subproduto do metabolismo celular e age ativando a proteína quinase  $\text{G}1\alpha$  ( $\text{PKG}1\alpha$ ). A



ativação de PKG1 $\alpha$  leva à abertura dos canais de potássio ativados por cálcio (K<sub>Ca</sub>), resultando na hiperpolarização da membrana das células musculares lisas vasculares. Esta hiperpolarização reduz a entrada de cálcio na célula, transduzindo ainda mais o sinal associado ao vasorrelaxamento muscular (FEELISCH *et al.*, 2020). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atua como um modulador importante em várias vias de sinalização celular, influenciando processos como a resposta ao estresse oxidativo e a regulação do apoptose. Estudos indicam que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ter efeitos benéficos na função endotelial e na regulação do tônus vascular. Níveis elevados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estão associados a danos oxidativos e a patologias cardiovasculares, como a aterosclerose. A regulação precisa da produção e degradação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é crucial para manter a saúde vascular.

A endotelina é um peptídeo com 21 aminoácidos existente em três isoformas, a endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3). A ET-1 é principalmente conhecida por seus potentes efeitos vasoconstritores, ela também pode contribuir indiretamente para a vasodilatação através da ativação dos receptores ETB nas células endoteliais. A ativação destes receptores pode estimular a produção de NO e PGI<sub>2</sub>, ambos potentes vasodilatadores. Assim, a ET-1 pode ter um papel dual na regulação do tônus vascular, promovendo a vasodilatação em determinadas condições fisiológicas (VIZZA *et al.*, 2008). É uma via de sinalização é complexa e depende do equilíbrio entre os efeitos vasoconstritores mediados pelos receptores ETA nas células musculares lisas e os efeitos vasodilatadores mediados pelos receptores ETB nas células endoteliais, este último também encontrado nas células musculares lisas, porém preferencialmente nas células endoteliais. Alterações no balanço entre essas vias podem contribuir para doenças cardiovasculares como hipertensão arterial e insuficiência cardíaca. Por isso, a modulação da sinalização de ET-1 é uma área de interesse terapêutico para o tratamento de distúrbios vasculares (VANHOUTTE *et al.*, 2017).

A adenosina é um nucleosídeo que desempenha um papel crucial na regulação do fluxo sanguíneo e do tônus vascular. A adenosina exerce seus efeitos vasodilatadores ligando-se aos receptores de adenosina tipo A<sub>2A</sub> nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos (GODOY-MARÍN *et al.*, 2021). A ligação da adenosina aos receptores A<sub>2A</sub> ativa a adenilato ciclase, aumentando a produção de AMPc. O AMPc, por sua vez, ativa a PKA, que promove o relaxamento das células musculares lisas e a vasodilatação. A sinalização mediada pela adenosina é essencial na resposta ao estresse isquêmico e na proteção do tecido cardíaco durante eventos de isquemia/reperfusão. Dessa forma, a

modulação dos receptores de adenosina tem potencial terapêutico significativo no tratamento de doenças cardiovasculares e outras condições relacionadas. Por a adenosina atuar diretamente nos receptores A2A das células musculares lisas levando a produção de AMPc o relaxamento muscular é independente do endotélio (DONOSO; AEDO; HUIDOBRO-TORO, 2006).

Os receptores muscarínicos, particularmente os do tipo M3, desempenham um papel fundamental na mediação da vasodilatação. Quando a ACh se liga aos receptores muscarínicos M3 nas células endoteliais, ocorre a ativação do eNOS. Isso leva à produção de NO, que se difunde para as células musculares lisas e ativa a guanilato ciclase solúvel, resultando em um aumento de GMPc e consequente relaxamento muscular. Esta via é particularmente importante no controle do tônus vascular durante a resposta parasimpática, contribuindo para a regulação da pressão arterial e do fluxo sanguíneo regional. Disfunções na sinalização muscarínica estão associadas a diversas condições patológicas, incluindo hipertensão e doenças vasculares. A compreensão detalhada desta via pode auxiliar no desenvolvimento de terapias para melhorar a função endotelial e tratar disfunções vasculares.

## **1.5 Redirecionamento de fármaco**

O redirecionamento de fármacos, também conhecido como reposicionamento de medicamentos, é uma abordagem inovadora no desenvolvimento farmacêutico que visa encontrar novos usos terapêuticos para medicamentos já aprovados ou em fases avançadas de desenvolvimento. Essa estratégia oferece vantagens consideráveis, pois aproveita dados já existentes sobre a segurança, farmacocinética e toxicidade dos medicamentos, reduzindo significativamente o tempo e os custos associados à criação de novos fármacos (SHAKIBFAR et al., 2024). Nos últimos 60 anos, houve grandes avanços científicos e tecnológicos que impulsionaram o desenvolvimento de medicamentos comerciais, como o uso de química combinatória, que aumentou o número de moléculas com potencial farmacológico. Durante as décadas de 80 e 90, a biblioteca química expandiu-se consideravelmente, auxiliada pelo sequenciamento genético nos anos 70, o que facilitou a descoberta de novos alvos moleculares. Paralelamente, houve esforços substanciais para melhorar e gerenciar o processo de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos (SCANNELL et al., 2012).

Tradicionalmente, o desenvolvimento de medicamentos é um processo oneroso e lento, apesar de proporcionar grandes avanços à sociedade. Esse atraso no lançamento de novos tratamentos pode deixar pacientes com opções limitadas, sobretudo em casos de doenças urgentes. Nesse cenário, o redirecionamento de fármacos surge como uma alternativa rápida e de baixo custo, especialmente para pacientes que precisam de novas terapias com urgência (SHAKIBFAR et al., 2024). O reaproveitamento farmacológico ganhou ainda mais destaque durante a pandemia de COVID-19, quando houve uma busca intensiva por medicamentos que pudessem ser usados no tratamento da doença, já que as vacinas ainda não estavam amplamente disponíveis. Um exemplo relevante foi o redirecionamento do Veklury (remdesivir), um antiviral originalmente utilizado contra o Ebola, que foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 25 de maio de 2022 para o tratamento de infecções por SARS-CoV-2 (ANVISA, 2022).

Outro exemplo clássico de redirecionamento de fármacos é o Minoxidil, que inicialmente foi desenvolvido para tratar úlceras gástricas, mas revelou-se um potente vasodilatador durante os ensaios clínicos, o que o levou a ser utilizado no tratamento da hipertensão severa. Mais tarde, o Minoxidil foi novamente redirecionado, desta vez para o tratamento da alopecia, devido ao efeito colateral inesperado de estimular o crescimento capilar. O Sildenafil também exemplifica o sucesso dessa técnica. Inicialmente desenvolvido para tratar angina e hipertensão arterial pulmonar, descobriu-se que o Sildenafil era eficaz no tratamento da disfunção erétil. Posteriormente, ele foi aprovado também para o tratamento da hipertensão arterial pulmonar, evidenciando a versatilidade do redirecionamento de fármacos.

A Talidomida, originalmente desenvolvida nos anos 1950 como sedativo e tratamento para enjoo matinal em gestantes, a talidomida foi retirada do mercado devido a seus efeitos teratogênicos, que causaram má-formação fetal. Décadas mais tarde, foi redirecionada para o tratamento da lepra e do mieloma múltiplo, graças às suas propriedades imunomoduladoras. A Amantadina, originalmente criada como antiviral para o tratamento de gripe causada pelo vírus influenza A, foi redirecionada para o tratamento da doença de Parkinson e outras condições neurológicas, devido às suas propriedades dopaminérgicas. A aspirina, por sua vez, foi desenvolvida para aliviar dor e febre, mas foi redirecionada como medicamento preventivo para doenças cardiovasculares, graças à sua capacidade de inibir a agregação plaquetária, o que a torna útil na prevenção de infartos e acidentes vasculares cerebrais. Outro caso notável é o da zidovudina (AZT), que inicialmente foi concebida

como um tratamento contra o câncer, mas foi redirecionada nos anos 1980 para o tratamento da infecção por HIV, sendo o primeiro medicamento aprovado para combater o vírus da AIDS.

As vantagens dessa estratégia vão além da economia de tempo e dinheiro. O uso crescente de ferramentas de bioinformática tem aumentado as taxas de sucesso dessas abordagens, promovendo maior eficiência no processo de redirecionamento. Além disso, produtos naturais, que têm sido utilizados por milhares de anos, são uma grande promessa para novas indicações terapêuticas. Contudo, o desafio com esses compostos está em determinar a dosagem adequada para essas novas indicações, que pode diferir da usada na doença original. O uso de ferramentas de bioinformática, aliado a ensaios clínicos, oferece uma metodologia eficaz para o desenvolvimento de tratamentos, especialmente no contexto de epidemias de doenças virais.

## **1.6 Propafenona e análogos**

A propafenona é um fármaco antiarrítmico da classe 1C, utilizada principalmente no tratamento de arritmias cardíacas, como taquicardia supraventricular, fibrilação atrial e taquicardia ventricular. Ela age inibindo os canais de sódio nas células cardíacas, o que diminui a excitabilidade e a condução dos impulsos elétricos pelo miocárdio. Isso ajuda a estabilizar o ritmo cardíaco, sendo particularmente útil em situações em que há batimentos irregulares.

Entre as principais características da propafenona estão sua potente capacidade de bloquear os canais de sódio, o que resulta em uma desaceleração da condução elétrica nas fibras cardíacas. Essa desaceleração é mais pronunciada nos tecidos com alta frequência de despolarização, como o tecido de condução do coração em arritmias. A propafenona também tem efeitos betabloqueadores fracos, inibindo parcialmente a atividade dos receptores beta-adrenérgicos, o que contribui para a redução da frequência cardíaca em alguns pacientes.

Além de sua ação antiarrítmica, o uso da propafenona deve ser cuidadosamente monitorado, pois pode causar efeitos colaterais como tontura, distúrbios visuais, náusea e, em alguns casos, agravar a insuficiência cardíaca ou induzir novas arritmias. Devido ao risco de pró-arritmia, o medicamento deve ser prescrito com cautela, especialmente em pacientes com doença cardíaca estrutural (PETEL, 2010).

Desde 2011 pesquisadores estudam a hipótese de que fármacos  $\beta$ -bloqueadores podem ter aplicações terapêuticas em arritmias cardíacas, hipertensão e insuficiência cardíaca. Tal ação pode ainda ser melhorada com estudos sobre seletividade e exploração de novas propriedades (BAKER; HILL; SUMMERS, 2011). Tanto que estudos posteriores com a propafenona, ou derivados dela comprovaram o potencial de  $\beta$ -bloqueadores e suas possíveis ações.

O principal mecanismo de ação da propafenona é a inibição dos canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ) no miocárdio. Esses canais são essenciais para a despolarização rápida das células cardíacas durante o potencial de ação. Ao bloquear esses canais, a propafenona reduz a velocidade e a amplitude da condução do impulso elétrico através do coração, o que resulta em uma desaceleração do ritmo cardíaco e ajuda a normalizar o ritmo em situações de arritmia.

Além de seu efeito sobre os canais de sódio, a propafenona afeta principalmente as fibras de condução e os tecidos com alta frequência de despolarização, como o nó atrioventricular (AV) e o sistema de His-Purkinje. Essa redução na velocidade de condução é fundamental para controlar arritmias supraventriculares e ventriculares. A propafenona também possui uma ação beta-bloqueadora fraca, inibindo parcialmente os receptores beta-adrenérgicos no coração. Essa ação adicional contribui para a redução da frequência cardíaca e da força de contração cardíaca, o que auxilia na estabilização do ritmo cardíaco.

Além disso, a propafenona estabiliza a membrana das células cardíacas, ajudando a prevenir a ocorrência de arritmias ao aumentar o limiar para a despolarização espontânea. Esse efeito é particularmente útil em condições em que há uma tendência para a formação de impulsos elétricos anormais. Devido a essas ações, a propafenona é eficaz no tratamento de várias arritmias cardíacas, incluindo taquicardia supraventricular, fibrilação atrial e taquicardia ventricular. No entanto, a propafenona deve ser utilizada com cautela, pois pode causar efeitos colaterais como tontura, distúrbios visuais e, em alguns casos, agravar a insuficiência cardíaca ou induzir novas arritmias (Brunton et al., 2018; Rang et al., 2016; Patel et al., 2010).

Se a propafenona fosse redirecionada para novas indicações terapêuticas, suas propriedades antiarrítmicas e bloqueadoras dos canais de sódio poderiam ser exploradas em várias áreas além do tratamento de arritmias cardíacas. Por exemplo, a propafenona poderia ser estudada para o tratamento de neuropatias periféricas ou neuropatias dolorosas, como a neuropatia diabética. Sua capacidade de modular a excitabilidade neuronal pode ajudar a reduzir a dor e melhorar a função nervosa (Brunton et al., 2018).

Além disso, a propafenona poderia ser investigada para o manejo da dor crônica em condições como fibromialgia ou dor neuropática crônica. Sua ação sobre a condução dos impulsos nervosos pode ser benéfica na modulação da dor, oferecendo uma alternativa aos tratamentos existentes (Rang et al., 2016). Outra possibilidade seria a utilização da propafenona no tratamento da epilepsia, especialmente em casos onde os medicamentos antiepilépticos tradicionais não são eficazes. A capacidade do fármaco de estabilizar a atividade elétrica pode ajudar a prevenir crises epiléticas (Patel et al., 2010).

A propafenona também poderia ser estudada para o tratamento da síndrome do QT longo, uma condição em que há um prolongamento do intervalo QT no eletrocardiograma, o que pode levar a arritmias potencialmente fatais. Seu efeito sobre os canais de sódio poderia ajudar a corrigir a condução elétrica alterada no coração. Além disso, a propafenona poderia ser avaliada para o tratamento de certas doenças autoimunes, onde a desregulação da condução elétrica ou neuronal pode estar envolvida. Embora esta área seja menos explorada, a sua capacidade de modulação da atividade elétrica pode ter implicações em condições autoimunes que afetam o sistema nervoso ou cardiovascular (Brunton et al., 2018; Rang et al., 2016; Patel et al., 2010).

E mesmo que geralmente não seja utilizada no tratamento de hipertensão arterial a propafenona é conhecida por bloquear os canais de sódio e ter um efeito moderado na redução da excitabilidade elétrica do coração, o que pode teoricamente ajudar a regular o ritmo cardíaco e potencialmente influenciar a pressão arterial. A hipertensão arterial é frequentemente associada a um aumento da carga de trabalho no coração e desregulação dos ritmos cardíacos, e, portanto, a estabilização elétrica oferecida pela propafenona poderia, em teoria, auxiliar na redução da pressão arterial ao melhorar a função cardíaca e reduzir a sobrecarga ventricular (Brunton et al., 2018).

Além disso, a propafenona possui uma leve atividade beta-bloqueadora, o que pode contribuir para a redução da pressão arterial ao diminuir a frequência cardíaca e a força de contração do coração. A combinação de efeitos na condução elétrica e na função cardíaca poderia, teoricamente, ter um impacto positivo na hipertensão. No entanto, essa aplicação seria bastante inovadora e exigiria extensa pesquisa e ensaios clínicos para determinar a eficácia e a segurança da propafenona para tratar hipertensão arterial (Rang et al., 2016).

Em resumo, enquanto a propafenona não é atualmente utilizada para tratar hipertensão arterial, a exploração de seu redirecionamento para esta condição poderia ser interessante, considerando seus efeitos sobre a condução elétrica e a atividade beta-bloqueadora. No

entanto, tal uso exigiria uma avaliação rigorosa para garantir que os benefícios superem os riscos potenciais (Patel et al., 2010).

Diante do exposto acima, pesquisas bibliográficas revelaram que em 2012 um estudo de um derivado da propafenona, o fenilpropiofenona (PhPds), foi desenvolvido com um potencial efeito vasorrelaxante. Os resultados apresentados mostraram que tanto a propafenona como também seus análogos induziram o relaxamento independente do endotélio em anéis de aorta de ratos.

Ficou evidente com o auxílio de bloqueadores como 4-aminopiridina e nifedipina que os canais iônicos de  $K^+$  e  $Ca^{2+}$  parecem estar parcialmente envolvidos no mecanismo de ação dos derivados. Além disso, canais iônicos sensíveis a lidocaína e nifedipina estão envolvidos na vasodilatação induzida por concentrações micromolares baixas de propafenona. Os resultados sugeriram que um grupo atômico com efeitos de doação de elétrons, tamanho moderado e lipofilicidade moderada, como o grupo  $-CH_3$  na posição para do anel benzênico da propafenona, é importante para a afinidade pelos canais de  $K^+$  sensíveis a 4-AP (IVKOVIĆ *et al.*, 2012).

O mecanismo de vasodilatação induzido por outros derivados de propafenona ainda não está definido e mais investigações são necessárias. Os efeitos vasodilatadores observados da propafenona e seus novos derivados podem ser benéficos para alguns pacientes, mas indesejados para outros, como pacientes hipotensos. Dessa forma, derivados com menor eficácia vasodilatadora seriam vantajosos para esses pacientes.

## 2 JUSTIFICATIVA

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de morbidade e mortalidade global, evidenciando a necessidade urgente de novas abordagens terapêuticas que superem as limitações dos tratamentos convencionais. Nesse contexto, o redirecionamento de fármacos, técnica que explora novas aplicações para compostos existentes, surge como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de tratamentos inovadores, seguros e mais acessíveis. O reaproveitamento de medicamentos permite explorar a farmacodinâmica e a farmacocinética já conhecidas dos fármacos, potencialmente acelerando o processo de desenvolvimento e aprovação de novos tratamentos.

Neste projeto, o redirecionamento da propafenona e a preparação de seus análogos visa explorar um novo efeito vasodilatador desses compostos, o que poderia preencher lacunas terapêuticas no manejo de doenças cardiovasculares, especialmente em pacientes refratários a

tratamentos tradicionais. Os resultados obtidos em estudos de docking molecular indicam que os análogos desenvolvidos apresentam maior especificidade e afinidade aos alvos moleculares investigados, sugerindo um potencial promissor para novas indicações terapêuticas.

A utilização do modelo de aorta isolada de ratos possibilitará a validação *ex vivo* do efeito vasodilatador dos análogos, contribuindo para a elucidação de seu mecanismo de ação e corroborando os achados computacionais. Essa abordagem permite não apenas a comprovação experimental da atividade dos compostos, mas também fornece dados preliminares que podem servir de base para futuros estudos clínicos.

Dessa forma, o presente trabalho busca contribuir para a ampliação das opções terapêuticas no tratamento de doenças cardiovasculares, oferecendo uma alternativa potencialmente mais eficaz e de baixo custo para pacientes que não respondem adequadamente aos tratamentos convencionais. Ao redirecionar um fármaco já conhecido, espera-se minimizar o tempo de desenvolvimento e os custos associados, viabilizando a disponibilização de novas terapias com maior agilidade e segurança.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Realizar *screening* e avaliar os efeitos de quatro compostos análogos da propafenona na reatividade vascular em anéis de aorta isolados.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Verificar o efeito vasodilatador dos análogos da propafenona em anéis de aorta isolados;
- Definir o análogo mais promissor com base em sua potência, eficácia e *docking* molecular;
- Comparar o efeito do análogo mais promissor com a propafenona;
- Avaliar a afinidade dos análogos de propafenona com canais de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ;
- Caracterizar o mecanismo de ação vasodilatador do análogo escolhido.



## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Animais**

Para os ensaios biológicos, foram utilizados ratos Wistar, em idade adulta, pesando entre 280 e 320g provenientes do Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (NPDM-UFC). Os animais foram devidamente acondicionados em sala climatizadas à temperatura de 23° C, com estantes apropriadas e circulação de ar e permaneceram sob o ciclo claro-escuro de 12/12h com água e ração à vontade, em ambiente de microisolamento no biotério supracitado.

### **4.2 Local de realização do estudo**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas - LAFAVET e no Laboratório de Farmacologia Pré-Clínica, ambos integrantes do NPDM-UFC e possui infraestrutura e equipamentos adequados para a realização dos experimentos.

### **4.3 Aspectos éticos**

O trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (CEUA- NPDM) e aprovado sob o número de protocolo: 270607220.

### **4.4 Docking molecular**

#### **4.4.1 Docking molecular**

O método de docking molecular é uma técnica essencial para avaliar a interação de compostos potencialmente farmacológicos com receptores biológicos através de abordagens computacionais. Essa ferramenta permite investigar a melhor conformação e orientação dos ligantes em relação à molécula alvo, estimando e classificando as afinidades de ligação no complexo de menor energia (PINZI; RASTELLI, 2019).

Foi conduzido um estudo de docking molecular para prever a interação da propafenona e dos análogos sintetizados rac-5a, rac-5b, rac-5c e rac-5d com diversos receptores biológicos. Os alvos do estudo incluíram o receptor adrenérgico beta 1 (PDB: 7BTS) (XU et. al., 2020), o receptor adrenérgico beta 2 (PDB: 3NY9) (WACKER, et. al., 2010) e o canal de sódio I217C (PDB: 6MVX) (GAMAL EL-DIN, et. al., 2018) de Homo sapiens.

Os canais iônicos são proteínas de membrana que conectam as faces intra e extracelular, permitindo o transporte passivo de íons. O fluxo iônico é crucial para a contração

muscular, transmissão de impulsos nervosos, controle da pressão osmótica, entre outras funções. Esse fluxo pode ser seletivamente transportado através de poros na membrana, que se abrem e fecham conforme estímulos (como ligantes, estímulos mecânicos, pH, nucleotídeos cíclicos, voltagem, etc.), sendo classificados como canais de sódio, potássio, cálcio ou cloro (HUANG; JAN, 2014; HILLE, 2001).

Os receptores adrenérgicos, em geral, estão envolvidos em processos fisiológicos como a contração do músculo liso, função cardíaca e metabolismo energético. Especificamente, os receptores adrenérgicos  $\beta 1$  estão associados ao aumento da força de contração do músculo cardíaco e à atividade cardíaca (ROHRER, 1998), enquanto os receptores adrenérgicos  $\beta 2$  promovem o relaxamento do músculo liso, resultando em broncodilatação e vasodilatação (FITZGERALD, 2007).

Para as simulações de Docking Molecular, o software AutoDock Tools (ADT) v4.2 foi utilizado para preparação dos ligantes e alvos (MORRIS et al., 2009) e o AutoDock Vina 1.1.2 para execução dos cálculos (TROTT; OLSON, 2010). Os resultados foram analisados pelos softwares ADT e UCSF Chimera X (PETTERSEN et al., 2021) e afinidade de ligação e as interações entre resíduos foram usados para determinar melhores interações moleculares.

## **4.5 Fármacos e reagentes**

### **4.5.1 Solução de Krebs-Henseleit**

Foi utilizada a solução de Krebs-Henseleit para manter o tecido viável durante todo o experimento. Para isto foram utilizadas duas soluções diferentes, a primeira uma Solução de Krebs-Henseleit normal (Tabela 2) e uma solução de Krebs-Henseleit sem cálcio (Tabela 3). Sendo que a solução sem cálcio foi utilizada apenas em protocolos envolvendo o estudo dos canais de cálcio.

Tabela 2 - Composição da solução de Krebs-Henseleit

<b>Substância</b>	<b>Concentração (mM)</b>
NaCl	118
KCl	4,7
CaCl <sub>2</sub>	2,5
MgSO <sub>4</sub>	1,2
CaCl <sub>2</sub>	2,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2
NaHCO <sub>3</sub>	25
Glicose	5,5

Fonte: BRITO, 2015

Tabela 3 - Composição da solução de Krebs-Henseleit sem cálcio

<b>Substância</b>	<b>Concentração (mM)</b>
NaCl	118
KCl	4,7
MgSO <sub>4</sub>	1,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2
NaHCO <sub>3</sub>	25
Glicose	5,5

Fonte: BRITO, 2015

#### **4.5.2 Reagentes utilizados**

Os reagentes utilizados neste estudo foram obtidos da empresa Sigma Aldrich Co. (St. Louis, EUA) e estão dispostos na tabela abaixo (Tabela 4).

Tabela 4 - Fármacos utilizados

Fármaco	Concentração	Descrição
Cloreto de potássio (KCl)	80 mM	O eletrólito na concentração descrita causa uma vasoconstrição por despolarização de membrana
Fenilefrina (PHE)	10 $\mu$ M	Agonista dos receptores $\alpha$
Acetilcolina (ACh)	5 $\mu$ M	Agonista dos receptores muscarínicos
Tetraetilamônio (TEA)	5mM	Bloqueador não seletivo dos canais de K <sup>+</sup>
4-Aminopiridina (4-AP)	200 $\mu$ M	Bloqueador dos canais de K <sup>+</sup> dependentes de voltagem
Glibenclamida (GLIB)	1 $\mu$ M	Bloqueador dos canais de K <sup>+</sup> dependentes de ATP
Nifedipina (NIF)		Bloqueador dos canais de cálcio tipo L

Fonte: Brito, 2015

#### 4.6 Análogos da Propafenona

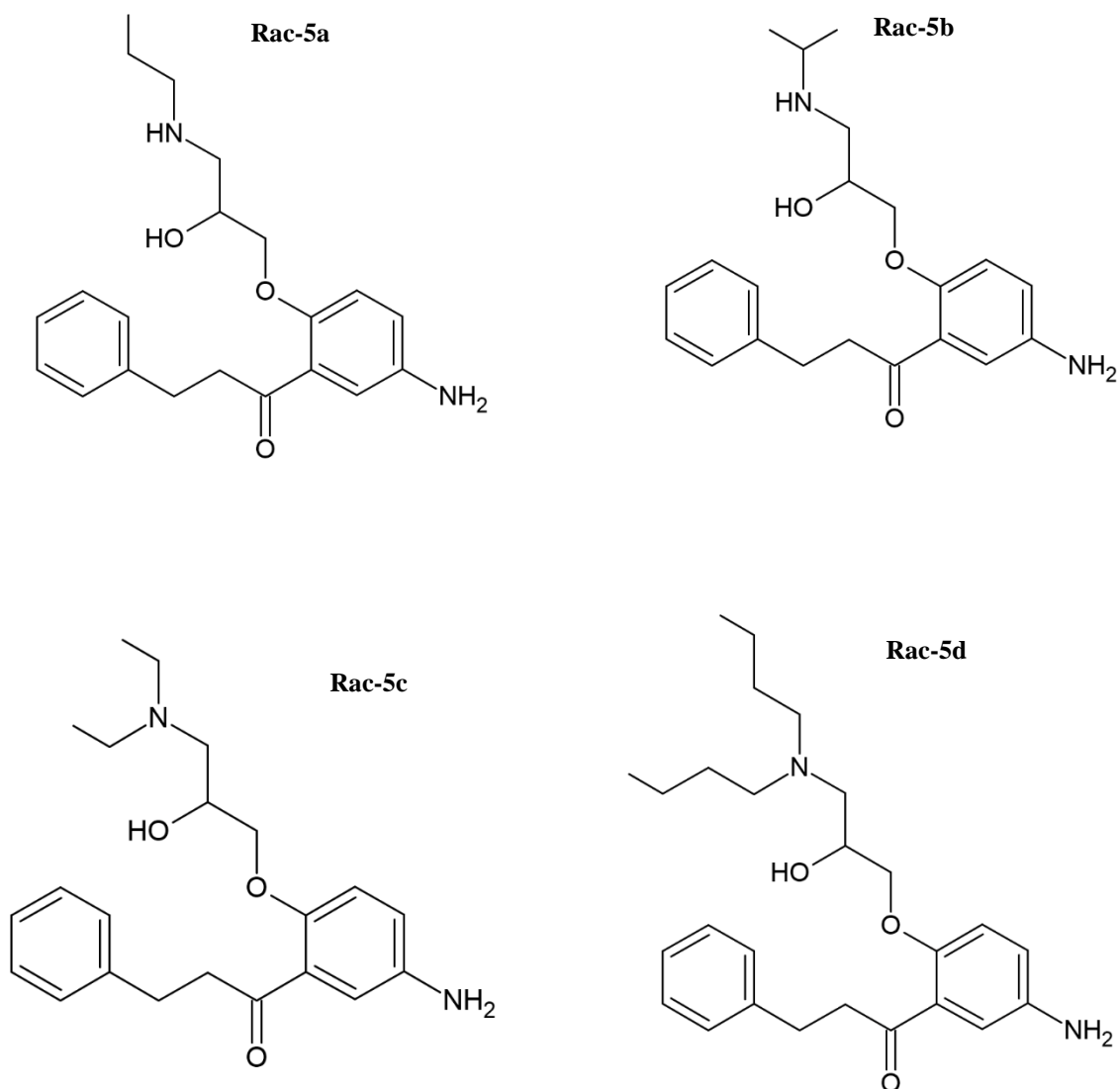
Os análogos foram sintetizados no Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS) da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob a coordenação do Professor Marcos Carlos de Mattos. Os análogos do presente estudo foram sintetizados a partir da cloridrina aminada (RAC – 5), mas utilizando diferentes aminas como reagentes, além de alterar sua temperatura e tempo racional visando otimizar o rendimento de cada síntese. De forma geral os análogos de caracterizaram principalmente pela inserção de um grupo amino no anel fenólico do benzênico e a introdução de alquilaminas na cadeia lateral, como propilamina, isopropilamina, dietilamina e dibutilamina, foram obtidos os análogos rac-5a (50%), rac-5b (60%), rac-5c (70%) e rac-5d (40%), respectivamente (Figura 5). Estudos in silico revelaram que todos os análogos apresentaram uma boa biodisponibilidade oral, além de estarem em conformidade com a "regra do 5" de Lipinski.

A "regra do 5" de Lipinski é um conjunto de critérios propostos por Christopher A. Lipinski em 1997 para prever se uma substância química pode ser um bom candidato a fármaco oral. Essa regra sugere que, para que uma molécula tenha maior probabilidade de ser eficaz como medicamento, ela deve atender a quatro condições principais. Primeiramente, seu peso molecular deve ser inferior a 500 daltons. Em segundo lugar, o coeficiente de partição octanol-

água (Log P) deve ser igual ou inferior a 5, indicando que a molécula não é excessivamente lipofílica. Além disso, o número de grupos doadores de hidrogênio deve ser no máximo 5, assim como o número de grupos aceitantes de hidrogênio, que deve ser igual ou inferior a 10. Esses critérios são fundamentais para avaliar a solubilidade, permeabilidade e estabilidade de um composto, sendo ferramentas valiosas na fase inicial do desenvolvimento de novos medicamentos.

Análises de docking molecular demonstraram que o análogo rac-5c apresentou afinidades superiores à propafenona em relação aos receptores adrenérgicos beta 1 e beta 2, bem como aos canais de sódio.

Figura 5 - Análogos da propafenona RAC-5a, RAC-5b, RAC-5c e RAC-5d



Fonte: LABS

## **4.7 Procedimento experimental**

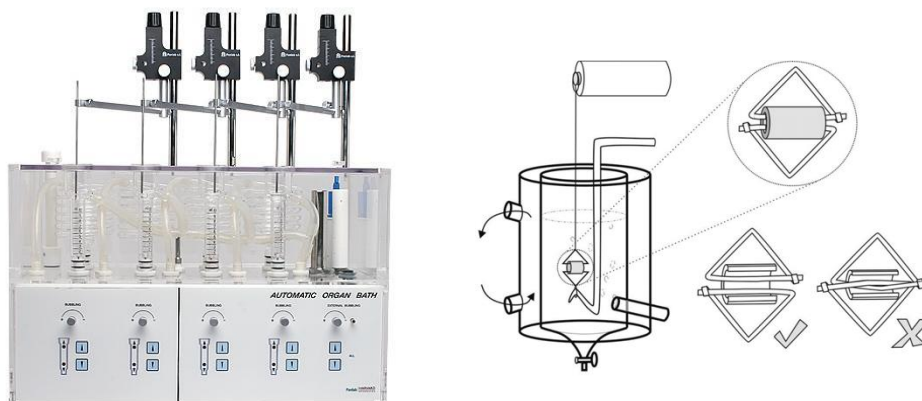
### **4.7.1 Avaliação e caracterização do efeito vasodilatador dos análogos da propafenona em anéis de aorta isoladas de ratos**

Os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), eutanasiados por exsanguinação, mediante incisão dos vasos cervicais, em seguida foi realizada toracotomia e a aorta torácica foi cuidadosamente retirada e mantida em solução de Krebs-Henseleit (Composição (mM): NaCl 118, KCl 4,7, MgSO<sub>4</sub> 1,2, CaCl<sub>2</sub> 2,5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, NaHCO<sub>3</sub> 25, glicose 5,5) com pH ajustado em 7,4 para limpeza do tecido. A aorta foi então segmentada em quatro anéis de 4 mm de comprimento, que foram montados horizontalmente em dois cliques metálicos triangulares para, posteriormente, montagem no Banho de órgãos (Figura 8), em que um clipe fica preso a uma haste metálica fixa e outro conectado a um transdutor de força, que mediu a tensão isométrica exercida. Após montados no banho de órgãos, os anéis de aorta ficam em cubas individuais, contendo 10 mL de solução de Krebs-Henseleit (SKH), com temperatura controlada a 37° C e aerada com carbogênio, uma mistura gasosa contendo 95% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub>.

A tensão isométrica foi mensurada por um transdutor de força (MLT0201, ADInstruments, Australia), cujo sinal será amplificado (Quad Bridge Amp, ML224, ADInstruments, Australia) e transmitido a um conversor analógico-digital (PowerLab, ML8661P, 4130, ADInstruments, Australia) que por sua vez será enviado para o computador para registro temporal da tensão pelo software de aquisição e processamento de sinais (LabChart 8.1.7.4, ADInstruments, Australia).

Após montados no banho de órgãos, os anéis de aorta passaram por um período de 60 minutos de estabilização com tensão basal de 10 mN, para finalmente serem realizados os testes de viabilidade tecidual. Tais testes consistem em realizar uma contração com KCl 80 mM, para verificar a integridade da musculatura lisa, lavar a artéria com SKH e, em seguida, induzir outra contração com Fenilefrina 1 μM, seguido da adição de Acetilcolina 10 μM com o objetivo de verificar a integridade do endotélio. Foi considerado viável o tecido que obtiver contração superior a 70% do basal e relaxamento endotélio-dependente induzido por acetilcolina maior que 80% da contração induzida por fenilefrina (CUNHA, 2012). Após os testes de viabilidade, foram iniciados os protocolos para verificação e caracterização do efeito vasodilatador. Cada anel de aorta passará por apenas um protocolo.

Figura 6 - Imagem do banho de órgãos (modular compacto).



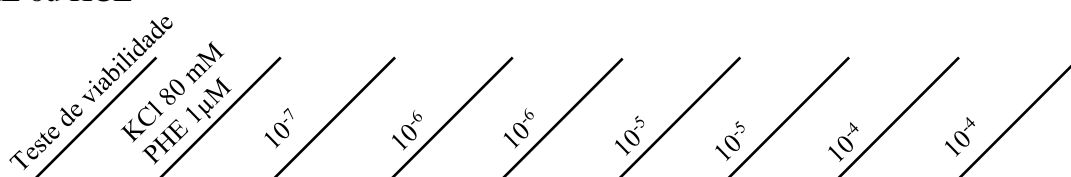
Fonte: Panlab

#### 4.7.2 Screening: Avaliação do efeito vasodilatador dos 4 análogos da propafenona

Inicialmente foi feito um screening com os 4 análogos para avaliação do efeito vasodilatador em anéis de aorta. Tais compostos podem ser agrupados em 2 pares com relação a sua similaridade estrutural, são eles: *rac-5a* e *rac-5b*; *rac-5c* e *rac-5d*. Portanto, após os testes foi avaliado o melhor análogo, com base na potência ( $\log CE_{50}$ ) e eficácia ( $Emax$ ) e nos ensaios de *docking* realizados posteriormente, para que as outras fases do estudo (caracterização do mecanismo de ação e estudos *in vivo*) fossem realizadas apenas com o par considerado mais adequado.

Nessa fase foi realizada uma curva dose-reposta acumulativa em escala logarítmica ( $10^{-7}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) com cada substância em anéis de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com Fenilefrina (PHE) 1  $\mu$ M (n=6) ou KCl 80 mM (n=6). Foi realizado ainda um grupo Controle (n=6) com o veículo dos fármacos, em concentração equivalente às usadas na curva, em anéis pré-contraídos com PHE ou KCl (Figura 7).

Figura 7 - Protocolo do efeito vasodilatador em segmentos de aorta pré-contraídos com PHE ou KCL



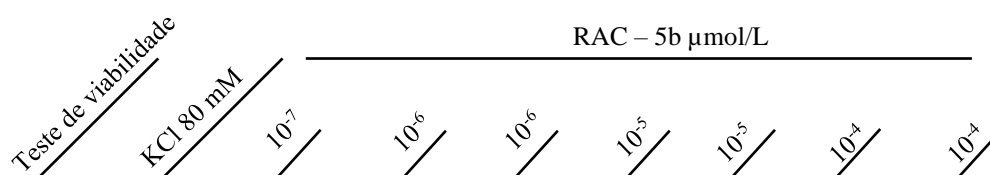
Fonte: LFAVET

## 4.8 Caracterização do mecanismo de ação vasodilatador do análogo escolhido no screening

### 4.8.1 Avaliação do efeito vasodilatador do análogo RAC – 5b em segmentos de aorta pré-contraídos com KCL

Com o objetivo de se verificar o efeito vasodilatador do análogo RAC – 5b, os segmentos aorta com endotélio íntegro (n=6) foram pré-contraídos, após os testes de viabilidade tecidual, com KCl (80 mM), para então ser realizada uma curva concentração-resposta do análogo ( $10^{-7}$  a  $3 \cdot 10^{-4}$ M). Para tanto, o análogo foi adicionado às cubas, após o platô de contração, em concentrações acumulativas, em que cada concentração era mantida por 7 minutos, para então se adicionar a dose subsequente (Figura 8).

Figura 8 - Protocolo para verificar o efeito vasodilatador do análogo em segmentos de artéria pré-contraídos com KCl



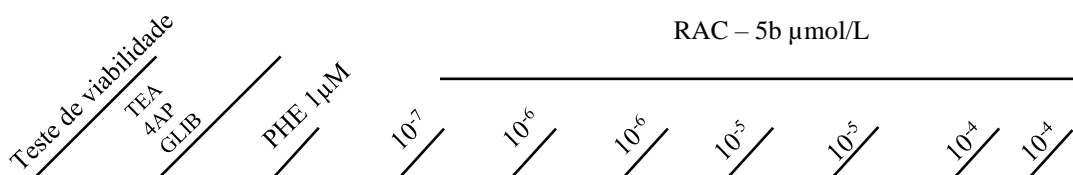
Fonte: LAFAVET

### 4.8.2 Influência dos Canais de potássio no efeito vasodilatador dos análogos da propafenona em anéis de aorta pré-contraídos com PHE.

Esse protocolo teve como objetivo avaliar se os análogos da propafenona atuam por meio de canais de potássio. Para tanto, anéis de aorta com endotélio íntegro foram incubados com Tetraetilamônio (TEA) 10 mM, bloqueador não seletivo de canais de potássio; 4-aminopiridina (4-AP) 1 mM, bloqueador de canais de potássio voltagem dependente; ou com Glibenclamida 10 µM, um bloqueador de canais de potássio dependente de ATP, por 30 minutos, após isso foi realizada uma pré-contração com PHE 1 µM e então uma curva de dose-resposta acumulativa em escala logarítmica ( $10^{-7}$  a  $3 \cdot 10^{-4}$  M) com os análogos da propafenona (n=6) (Figura 9) (RIBEIRO, 2008; ZHANG *et al.*, 2010; CUNHA, 2012).



Figura 9 - Protocolo para verificar o efeito vasodilatador do análogo em segmentos de artéria pré-contraídos com PHE (1 $\mu$ M)



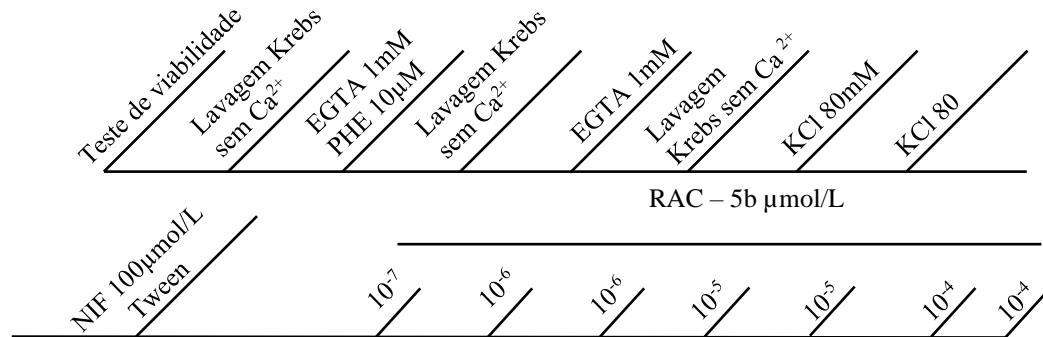
Fonte: LAFAVET

#### 4.8.3 Efeito do pré-tratamento com o análogo RAC - 5b na contração induzida por cálcio na presença de alta concentração de K<sup>+</sup>

O objetivo deste protocolo foi investigar o efeito inibitório do RAC - 5b sobre o influxo de Ca<sup>2+</sup> através dos canais de cálcio regulados por voltagem, sem depleção do Ca<sup>2+</sup> intracelular, utilizando como controle a Nifedipina ou Tween (ADARAMOYE et al., 2009; HIPÓLITO et al., 2009; HIPÓLITO et al., 2011; HOE et al., 2011).

A primeira parte deste protocolo inclui a estabilização do fragmento de aorta, bem como os testes de viabilidade do tecido, o que se dá em solução de Krebs Normal. Após este procedimento, realizam-se seis lavagens com solução de Krebs sem Ca<sup>2+</sup>. O *Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid* (EGTA) (1mmol/L), um quelante dos íons Ca<sup>2+</sup> é adicionado ao meio, permanecendo por 15 minutos (ADARAMOYE et al., 2009; HIPÓLITO et al., 2009). Em seguida, ocorrem três lavagens com Krebs sem Ca<sup>2+</sup>, para retirada do EGTA. Este procedimento causa a depleção do Ca<sup>2+</sup> extracelular, sendo depois acrescentado KCl a 60 mmol/L ao meio. Após três minutos de incubação do KCl, adiciona-se em cada uma das cubas o RAC - 5b (30, 100 e 300  $\mu$ g/ml); 30  $\mu$ L de Tween ou Nifedipina (100 $\mu$ mol/L). Cada preparação é exposta a apenas uma concentração do análogo. Em seguida, realiza-se curva com CaCl<sub>2</sub> (0,01 - 30 mmol/L). Estes experimentos foram realizados em artérias com endotélio íntegro (N = 6) (Figura 10).

Figura 10 - Protocolo de investigação do efeito inibitório do análogo sobre o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais de cálcio dependentes de voltagem.



Fonte: LAFAVET

#### 4.9 Análise histológica dos anéis de aorta

Depois da devida fixação dos tecidos em formol tamponado a 10% por 24 a 48 horas, os fragmentos dos tecidos provenientes dos experimentos de vasoatividade, foram desidratados, diafanizados e cortados numa espessura de 5  $\mu\text{m}$ . O material foi corado por hematoxilina-eosina e as lâminas avaliadas por microscopia óptica.

#### 4.10 Análise estatística

Nos ensaios de relaxamento da musculatura lisa vascular, o efeito relaxante (R) das substâncias ou associações foi calculado, para cada concentração, em função da máxima contração proporcionada pelo agonista, sendo normalizado e expresso em termos percentuais, conforme a seguinte expressão:

$$R = \frac{T_A - T_S}{T_A} \times 100$$

onde  $T_A$  e  $T_S$  são, respectivamente, as tensões decorrentes da ação do agonista e de uma dada substância.

Em seguida, foi realizada a transformação logarítmica (base 10) das concentrações molar. Os gráficos foram então elaborados a partir dos valores médios da magnitude do efeito vasodilatador (após normalização) calculados para cada concentração da substância (após transformação logarítmica). Tais dados foram usados para construir as curvas concentração-efeito mediante o uso de análise de regressão não linear utilizando uma função sigmóide para

obtenção da  $EC_{50}$ , utilizada para quantificar a potência do composto, e do  $E_{max}$ , utilizado para quantificar a eficácia.

As variáveis quantitativas, contínuas e discretas, foram inicialmente analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. Para a estatística descritiva, serão calculados a média e o desvio padrão (dados paramétricos) ou a mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo (dados não paramétricos). Comparações entre os grupos foram feitas mediante o uso da análise de variância (ANOVA), baseada em um fator (*one-way analysis of variance*), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois (dados paramétricos), ou do teste de Kruskal-Wallis associado ao teste de comparações múltiplas de Dunn (dados não-paramétricos).

Em todos os casos será considerado como estatisticamente significativo um valor  $P$  menor que 0,05. O *software* GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 8 para Windows<sup>®</sup> (GraphPad Software, La Jolla, California, USA, 2019) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Docking molecular

Os alvos proteicos selecionados para este estudo foram os receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$  (o primeiro localizado no coração, rins e células cardíacas, e o segundo predominantemente nos músculos lisos das vias aéreas, bem como no músculo cardíaco). As estruturas dessas proteínas foram obtidas do Protein Data Bank. A análise dos resultados da docagem molecular, realizada utilizando os softwares ADT e UCSF Chimera X (PETTERSEN et al., 2021), revelou que os análogos investigados exibiram maior afinidade de ligação e interações mais robustas entre os resíduos do que a propafenona no receptor  $\beta_1$ . Em relação aos outros alvos, as forças de afinidade dos análogos variaram, mas ainda assim demonstraram uma capacidade significativa de se ligar firmemente às macromoléculas alvo. Considerando que uma menor energia livre de ligação favorece a interação, é possível afirmar que as modificações realizadas na síntese dos análogos foram significativas para a interação com o receptor adrenérgico  $\beta_1$ , uma vez que os valores de energia obtidos foram consideravelmente inferiores aos da propafenona.

Por outro lado, ao avaliar os alvos receptor adrenérgico  $\beta_2$ , a afinidade com a propafenona resultou no valor de -7,1 kcal/mol. Os análogos rac-5a, rac-5b e rac-5d apresentaram valores menos negativos, variando entre -6,3 e -6,7 kcal/mol, o que nos permite concluir que, para esses alvos, as interações dos análogos não foram suficientes para superar as

interações com a propafenona. No entanto, o análogo rac-5c demonstrou novamente resultados promissores, sendo o único a superar a afinidade da propafenona, apresentando energias mais negativas nos complexos com ambos os alvos. (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultado da força de afinidade entre as proteínas alvo e os ligantes

Alvos	Ligantes				
	Propafenona	RAC – 5a	RAC – 5b	RAC – 5c	RAC – 5d
<b>β1</b>	-6,4 kcal/mol	-8,1 kcal/mol	-8,7 kcal/mol	-8,5 kcal/ mol	-7,6 kcal/mol
<b>β2</b>	-7,1 kcal/mol	-6,4 kcal/mol	-6,5 kcal/mol	-7,2 kcal/mol	-6,3 kcal/mol

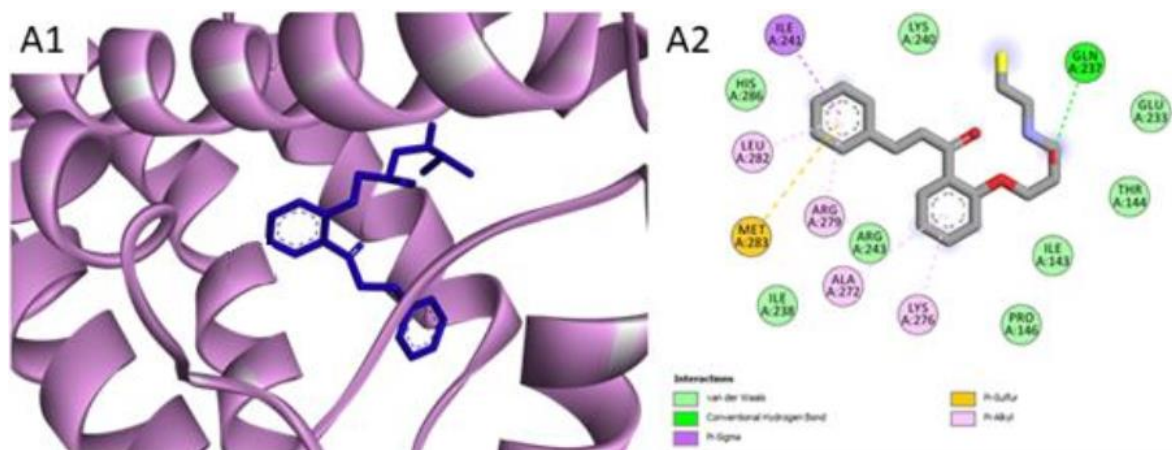
Fonte: Dados da Pesquisa

De maneira geral, apesar da maior afinidade do análogo rac-5b com o receptor beta 1, o análogo rac-5c demonstrou ser a molécula mais promissora. Este análogo apresentou as menores energias de ligação com os receptores estudados entre todos os análogos sintetizados, formando complexos com energias de ligação de -8,5 e -7,2 kcal/mol para os receptores beta 1 e beta 2, respectivamente. É importante destacar que todos os valores obtidos por este análogo foram inferiores aos alcançados pelo fármaco propafenona.

É conhecido que a formação de um complexo proteína-ligante depende de uma alta afinidade e especificidade de ligação do ligante com a proteína. A afinidade e especificidade resultam de interações intermoleculares, tais como forças de van der Waals, interações hidrofóbicas, interações  $\pi$ - $\pi$ , interações iônicas, ligações de hidrogênio e ligações covalentes (GURYANOV, FIORUCCI, TENNIKOVA, 2016).

As figuras a seguir são as representações bidimensionais/tridimensionais de resíduos de interação entre os ligantes (propafenona, *rac-5a*, *rac-5b*, *rac-5c* e *rac-5d*) e os alvos  $\beta$ 1 adrenérgico,  $\beta$ 2 adrenérgico.

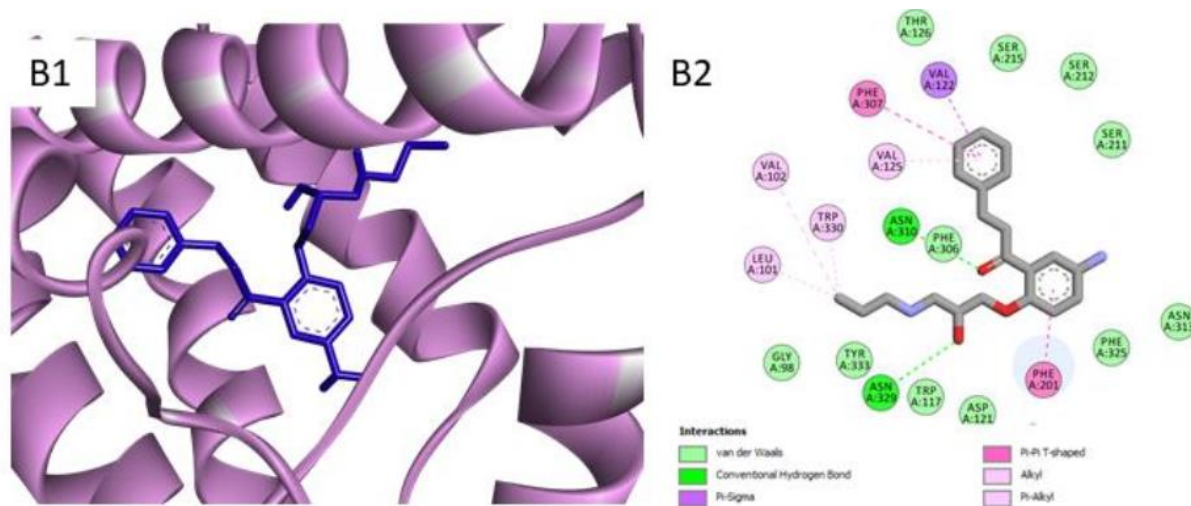
**Figura 11** - Representação bidimensional/tridimensional de resíduos de interação entre o ligante propafenona e o alvo BETA1 adrenérgico. Sendo a figura 11-A1 o sítio ativo do receptor BETA1 adrenérgico interagindo com a propafenona. Enquanto a figura 11-A2 são as interações intermoleculares entre propafenona e BETA1 adrenérgico.



Fonte: Dados da Pesquisa

Com relação as interações presentes no complexo enzima-rac-5a referente ao alvo receptor  $\beta$ 1, conforme ilustrado na figura abaixo (Figura12), destacam-se as ligações de hidrogênio dos resíduos de asparagina (ASN A:310 e ASN A:329) com o átomo de oxigênio da carbonila e com a hidroxila presente na molécula. As ligações de hidrogênio, possuindo a maior força entre as interações não covalentes, são, portanto, fundamentais para a manutenção da estabilidade de conformações bioativas de macromoléculas a nível intramolecular (DUNN, 2010).

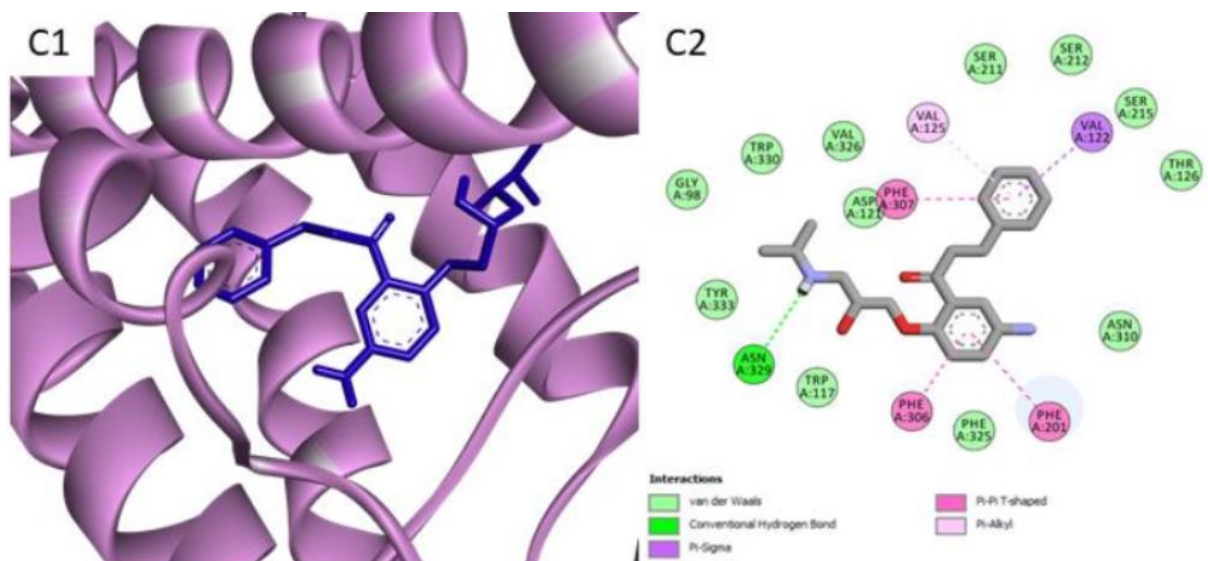
**Figura 12** - Representação bidimensional/tridimensional de resíduos de interação entre o ligante *rac-5a* e o alvo  $\beta 1$  adrenérgico. 12-B1: Sítio ativo do receptor  $\beta 1$  adrenérgico interagindo com *rac-5a*. 12-B2: interações intermoleculares entre *rac-5a* e  $\beta 1$  adrenérgico



Fonte: Dados da Pesquisa

Também estão presentes interações  $\pi$ -sigma e  $\pi$ - $\pi$  em "T shaped" com os dois anéis benzênicos, tanto no complexo com o análogo *rac-5a* quanto com o análogo *rac-5b* Figura 13. Os anéis benzênicos, apesar de não possuírem um dipolo permanente, apresentam um quadrupolo significativo, considerando que acima e abaixo do anel se formam dois polos que se cancelam, mas que contribuem de maneira eletrostática e favorável em todas as orientações, especialmente na interação em T devido à melhor orientação entre os quadrupolos (GUIMARÃES, 2012). O análogo *rac-5b* também interage com o receptor beta1 por meio de uma ligação de hidrogênio entre o resíduo de asparagina (ASN A:329) e a porção amino da molécula.

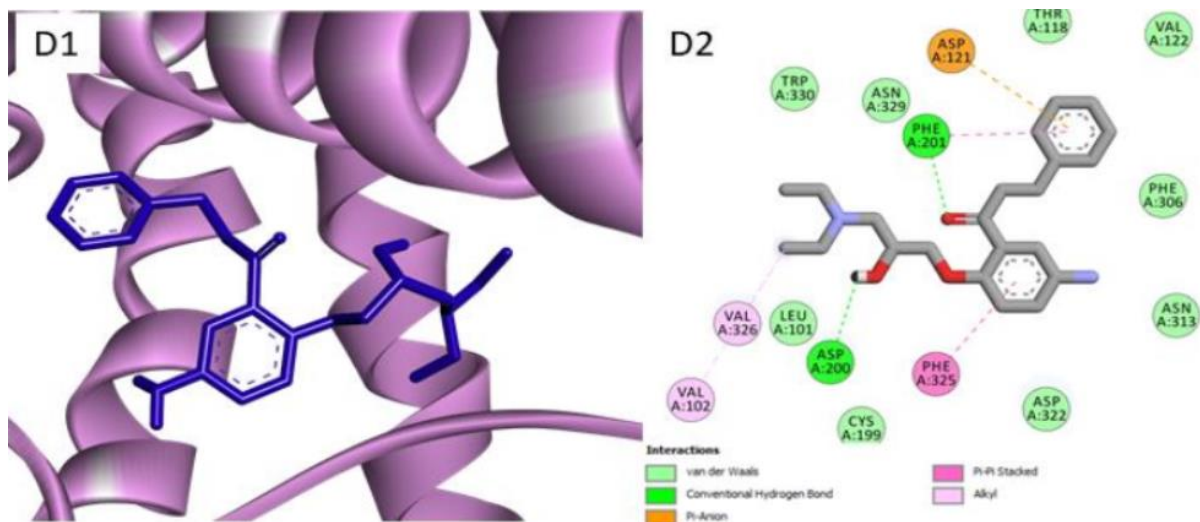
**Figura 13** - Representação bidimensional/tridimensional dos resíduos de interação entre o ligante rac-5b e o receptor  $\beta 1$  adrenérgico. 13-C1: Sítio ativo do receptor  $\beta 1$  adrenérgico em interação com rac-5b. 13-C2: Interações intermoleculares entre rac-5b e o receptor  $\beta 1$  adrenérgico.



Fonte: Dados da Pesquisa

Ligações de hidrogênio entre o resíduo de fenilalanina (PHE A:201) e a carbonila, bem como entre o resíduo de aspartato (ASP A:200) e a hidroxila da molécula, são interações observadas no complexo formado entre o receptor Beta1 e o análogo rac-5c, conforme ilustrado na Figura 14.

**Figura 14** - Representação bidimensional/tridimensional de resíduos de interação entre o ligante rac-5c e o alvo  $\beta 1$  adrenérgico. 14-D1: Sítio ativo do receptor  $\beta 1$  adrenérgico interagindo com rac-5c. 14-D2: interações intermoleculares entre rac-5c e  $\beta 1$  adrenérgico

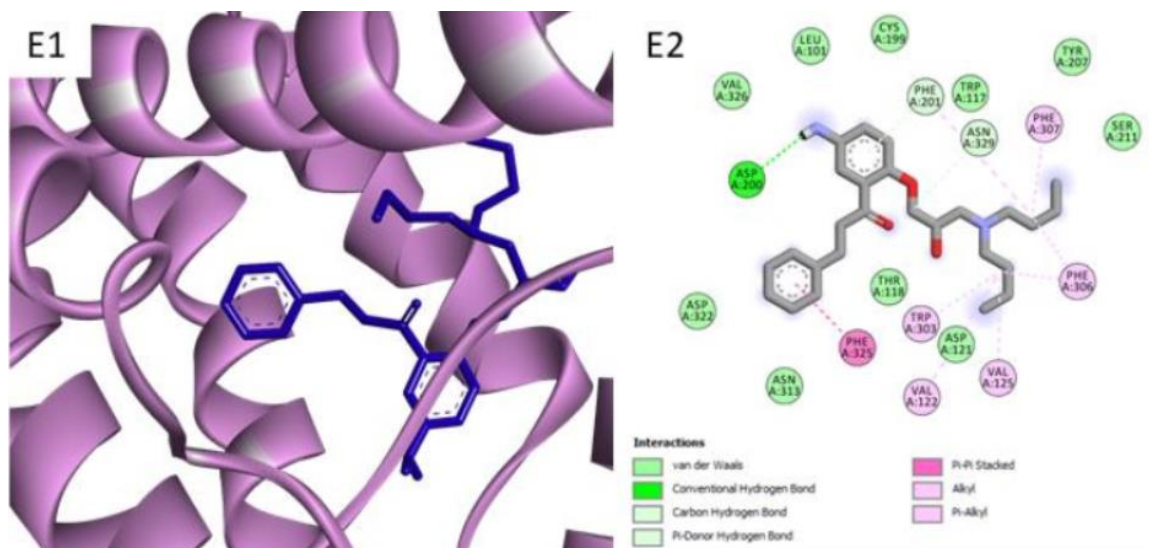


Fonte: Dados da Pesquisa

Por fim, as interações presentes no complexo entre o receptor beta1 adrenérgico e o análogo rac-5d estão ilustradas na figura 18. Provavelmente, devido ao maior número de átomos de carbono na amina inserida na cadeia lateral, ocorrem mais interações alquila (sigma-sigma).



**Figura – 15** Representação bidimensional/tridimensional dos resíduos de interação entre o ligante rac-5d e o receptor  $\beta 1$  adrenérgico. 15-E1: Sítio ativo do receptor  $\beta 1$  adrenérgico interagindo com rac-5d. 15-E2: Interações intermoleculares entre rac-5d e o receptor  $\beta 1$  adrenérgico.

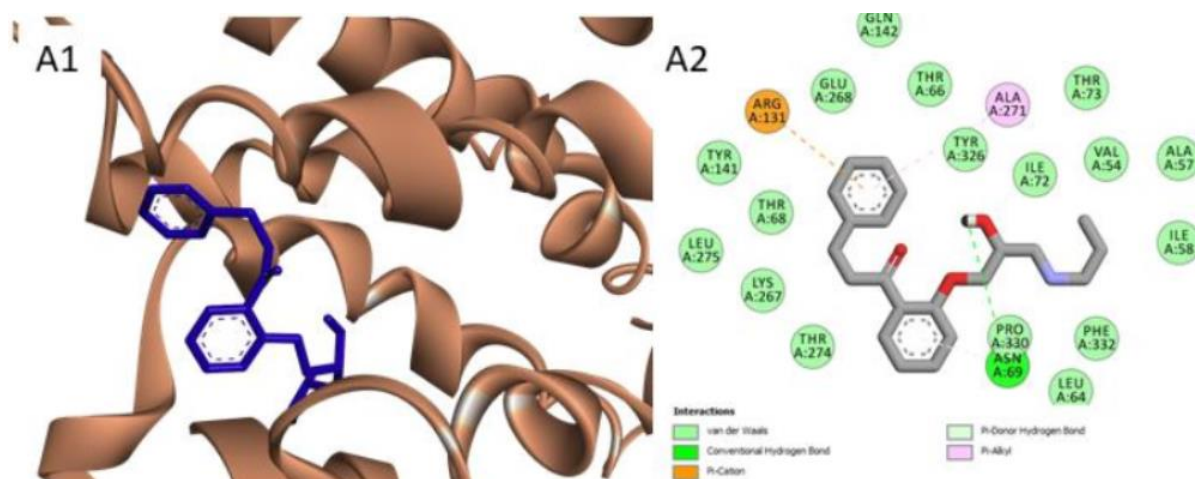


Fonte: Dados da Pesquisa

Ao contrário da propafenona, as interações dos análogos sintetizados com o receptor  $\beta 2$  adrenérgico resultaram em valores de energia superiores quando comparadas às obtidas com o receptor  $\beta 1$  adrenérgico, conforme demonstrado na tabela 5. As figuras a seguir ilustram as interações da propafenona e dos análogos rac-5a-d com o receptor  $\beta 2$  adrenérgico.

A figura 16 apresenta as interações com a propafenona. Observa-se que o complexo exibe uma maior quantidade de interações de van der Waals, além de três diferentes tipos de interações: uma interação  $\pi$ -alquila com o resíduo alanina (ALA A:271), uma ligação de hidrogênio com o resíduo asparagina (ASN A:69) e uma interação  $\pi$ -cátion com o resíduo arginina (ARG A:131).

**Figura 16** - Representação bidimensional/tridimensional dos resíduos de interação entre o ligante propafenona e o receptor  $\beta 2$  adrenérgico. 16-A1: Sítio ativo do receptor  $\beta 2$  adrenérgico interagindo com a propafenona. 16-A2: Interações intermoleculares entre a propafenona e o receptor  $\beta 2$  adrenérgico.

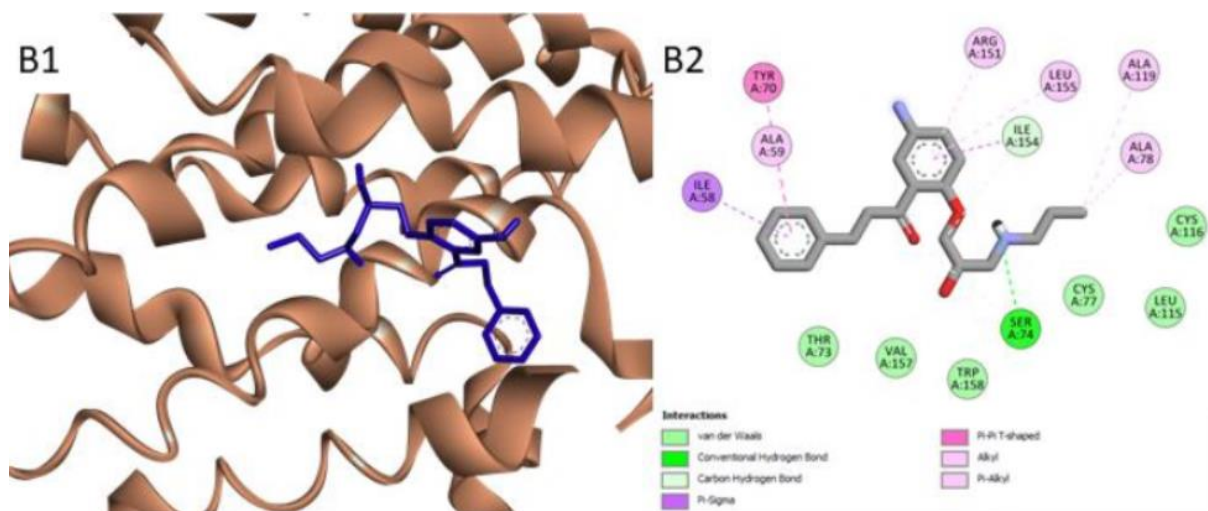


Fonte: Dados da Pesquisa

A interação  $\pi$ -cátion envolve espécies catiônicas e compostos aromáticos, sendo determinada por forças eletrostáticas. Essas interações possuem uma intensidade comparável às ligações de hidrogênio (MA, 1997) e são recorrentes em sistemas biológicos. No entanto, há uma grande dificuldade em isolar a contribuição singular dessa interação, pois ela também envolve forças de van der Waals e efeitos de polarização. Estudos demonstraram que os efeitos indutivos desempenham um papel importante nesse tipo de interação (DOUGHERTY, 2012). Ressalta-se um maior potencial quando o ligante, possuindo um sistema rico em elétrons  $\pi$ , atua como receptor da interação  $\pi$ -cátion de resíduos como arginina (Arg), lisina (Lys) ou histidina (His) protonadas (CABALEIRO-LAGO; RODRÍGUEZ-OTERO; PEÑA-GALLEGO, 2011).

No complexo entre o receptor  $\beta 2$  adrenérgico e o ligante rac-5a, Figura 17, as interações mais frequentes são do tipo alquila,  $\pi$ -alquila e van der Waals, seguidas por ligações de hidrogênio com o resíduo serina (SER A:74) e interações do tipo  $\pi$ - $\pi$  em forma de "T" e  $\pi$ -sigma com os resíduos tirosina (TYR A:70) e isoleucina (ILE A:58), respectivamente.

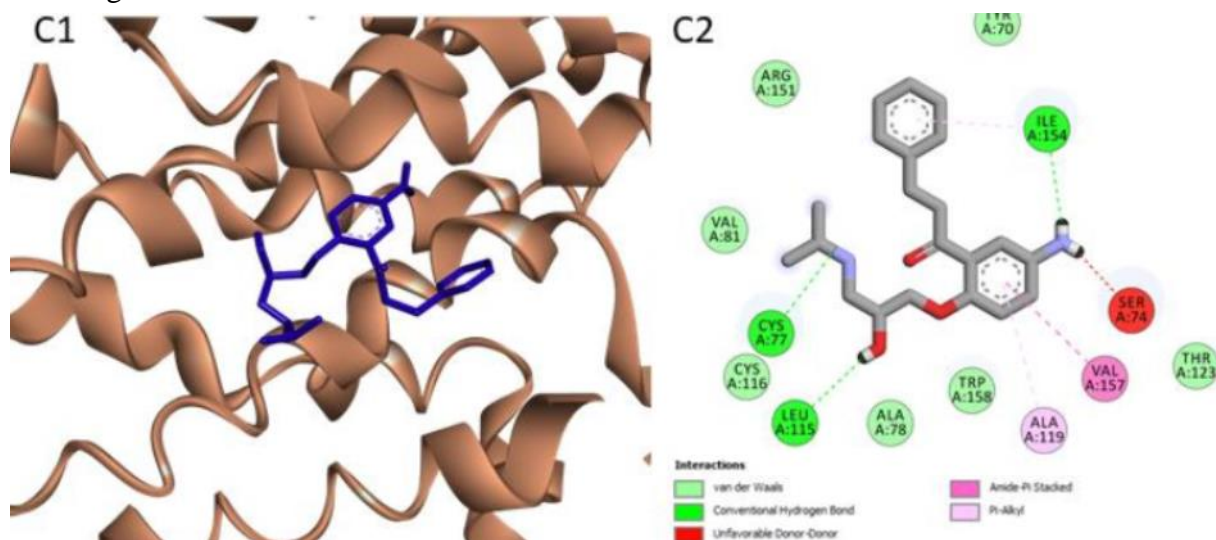
**Figura 17** - Representação bidimensional/tridimensional dos resíduos de interação entre o ligante rac-5a e o receptor  $\beta_2$  adrenérgico. 17-B1: Sítio ativo do receptor  $\beta_2$  adrenérgico interagindo com rac-5a. 17-B2: Interações intermoleculares entre rac-5a e o receptor  $\beta_2$  adrenérgico.



Fonte: Dados da Pesquisa

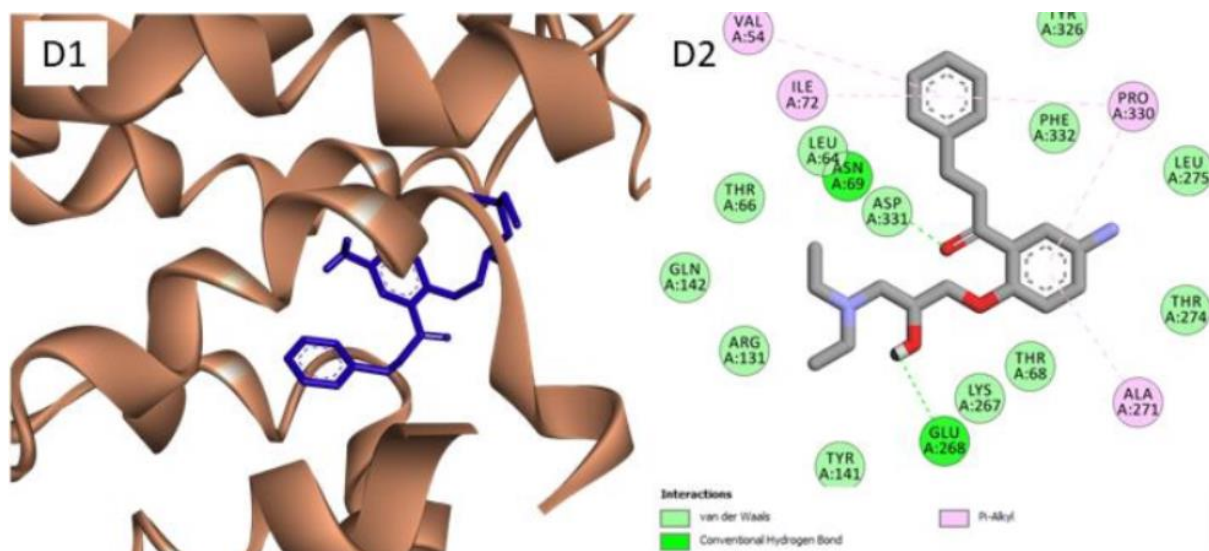
A representação das interações no complexo formado com o análogo rac-5b, conforme ilustrado na figura 18, destaca principalmente as ligações de hidrogênio nas regiões da molécula onde estão presentes a hidroxila, o grupo amino ligado ao anel benzênico e o grupo propilamino na cadeia carbônica lateral. Além disso, ocorrem interações  $\pi$ -alquila e do tipo amida- $\pi$ -stacking. Vale mencionar que a interação entre o grupo amino ligado ao anel aromático e o resíduo serina (SER A:74) ocorreu de forma não favorável, possivelmente devido às distorções na molécula ao formar o complexo, como a formação de ângulos e/ou comprimentos de ligações desfavoráveis, que podem resultar em repulsões eletrostáticas e estéricas (CARVALHO et al., 2003; IRANNEJAD et al., 2020).

**Figura 18** - Representação bidimensional/tridimensional dos resíduos de interação entre o ligante rac-5b e o receptor  $\beta_2$  adrenérgico. 18-C1: Sítio ativo do receptor  $\beta_2$  adrenérgico interagindo com rac-5b. 18-C2: Interações intermoleculares entre rac-5b e o receptor  $\beta_2$  adrenérgico.



No complexo formado com o ligante rac-5c, Figura 19, ocorre um número considerável de interações, embora sejam de apenas três tipos. Além das interações  $\pi$ -alquila e de van der Waals, destacam-se novamente as ligações de hidrogênio entre a carbonila e a hidroxila do referido análogo, semelhantes às observadas no complexo com o receptor  $\beta_1$  adrenérgico. Contudo, neste caso, as ligações de hidrogênio envolvem os resíduos asparagina (ASN A:69) e glutamato (GLU A:268), respectivamente.

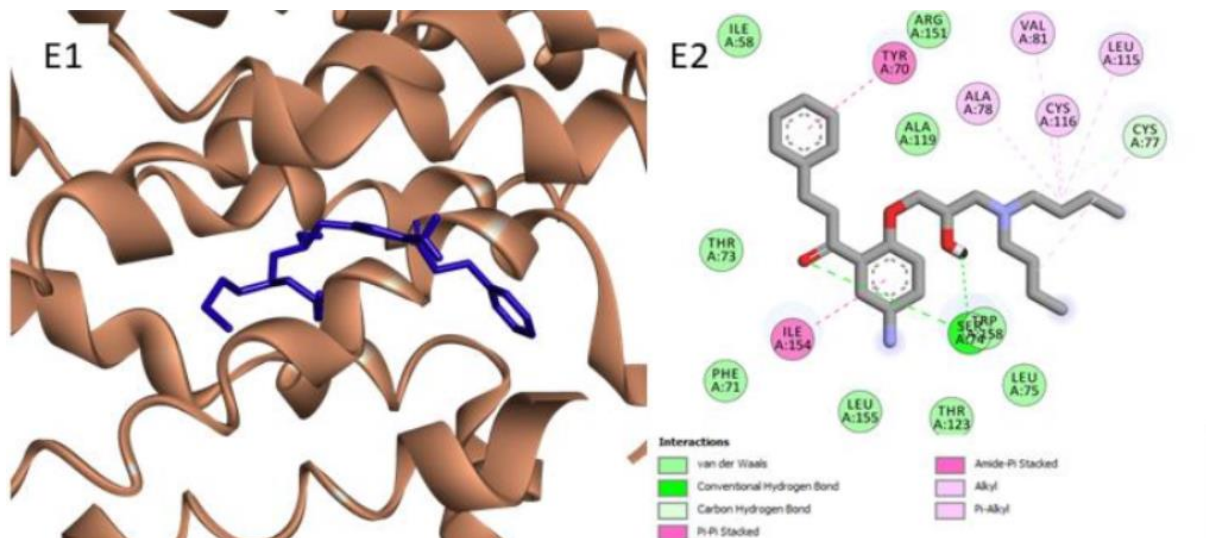
Figura 19 – Representação bidimensional/tridimensional dos resíduos de interação entre o ligante rac-5c e o receptor  $\beta 2$  adrenérgico. D1: Sítio ativo do receptor  $\beta 2$  adrenérgico interagindo com rac-5c. D2: Interações intermoleculares entre rac-5c e o receptor  $\beta 2$  adrenérgico.



Fonte: Dados da Pesquisa

Na série de moléculas avaliadas com o receptor  $\beta 2$  adrenérgico, conforme os valores apresentados na tabela 9, o análogo rac-5d apresentou a energia de ligação menos favorável. Como mostra a figura 23, estão presentes na formação desse complexo enzima-ligante interações alquila (sigma-sigma),  $\pi$ -alquila,  $\pi$ - $\pi$  stacking e amida- $\pi$  stacking. Além disso, o resíduo serina (SER A:74) forma uma ligação de hidrogênio com o referido análogo.

Figura 20 – Representação bidimensional/tridimensional dos resíduos de interação entre o ligante rac-5d e o receptor  $\beta_2$  adrenérgico. E1: Sítio ativo do receptor  $\beta_2$  adrenérgico interagindo com rac-5d. E2: Interações intermoleculares entre rac-5d e o receptor  $\beta_2$  adrenérgico.



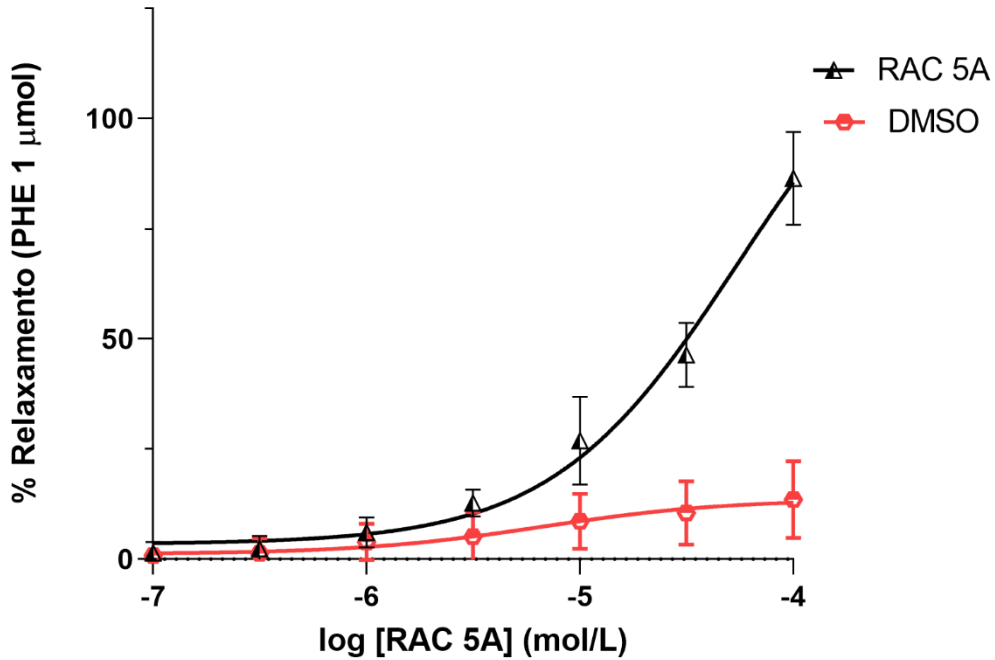
Fonte: Dados da Pesquisa

## 5.2 Resultados do screening de avaliação dos análogos

Com o objetivo de mensurar a atividade vasorrelaxante dos análogos, foram realizados experimentos comparativos entre os análogos e dimetilsulfóxido (DMSO) 1% como controle, dessa forma temos como assegurar que o mesmo não causaria interferência na atividade relaxante.

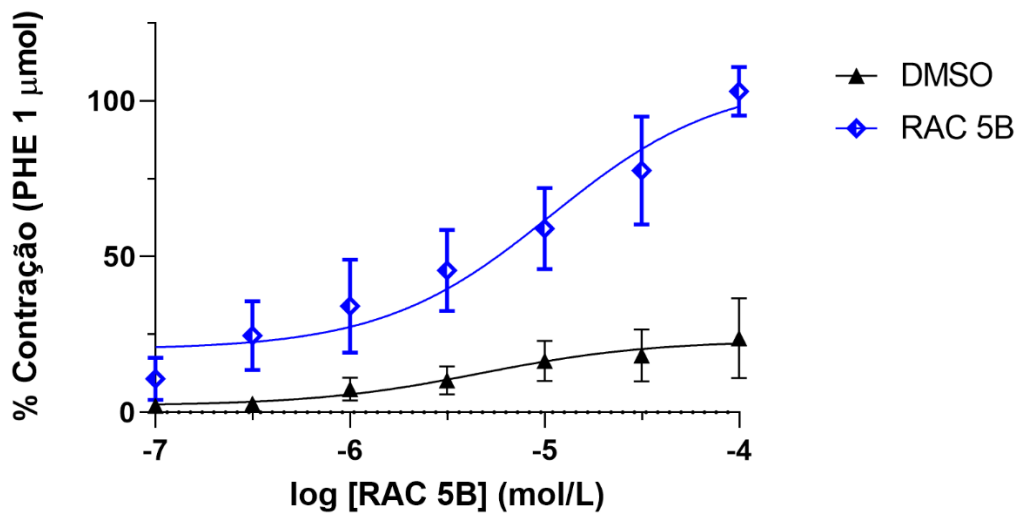
Os resultados apontaram que nas preparações que foram pré-contráidas com PHE (1 $\mu$ mol/L) os análogos RAC – 5a (130,48  $\pm$  12,03%), RAC – 5b (106,6  $\pm$  7,33%), RAC – 5c (55,5  $\pm$  6,292%) e RAC 5 – d (108,5  $\pm$  24,50%) induziram uma resposta vasodilatadora superior a 50% comparados com o controle (13,6  $\pm$  2,44%). Em contrapartida os valores da CE50 dessas preparações apresentaram resultados estatisticamente significativos (Tabela 6).

Gráfico 1 - Efeito do RAC – 5a (n=6) e do veículo (DMSO) (n=6) em preparações de segmentos de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE (1 $\mu$ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM).



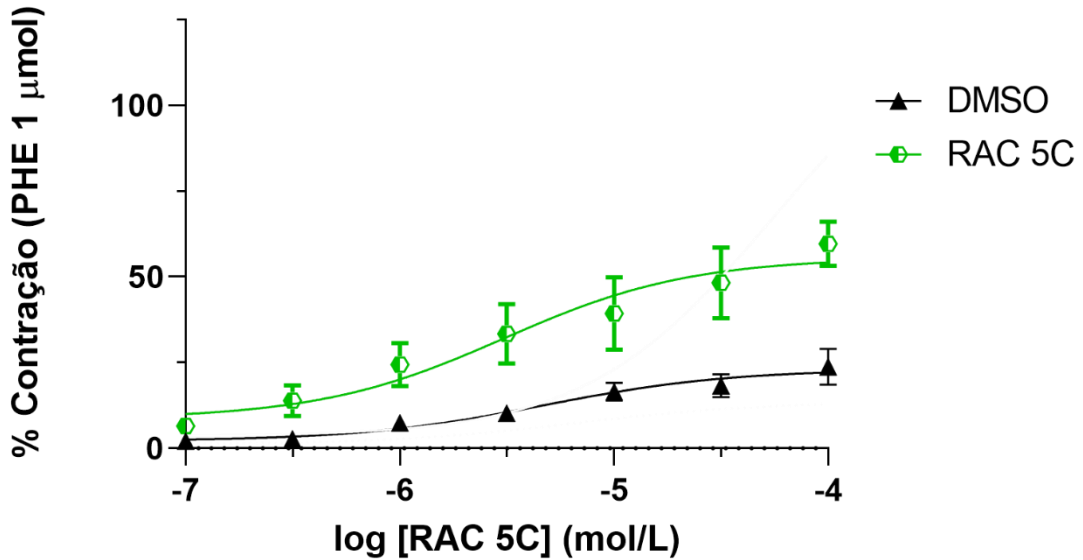
Fontes: Dados da Pesquisa

Gráfico 2 - Efeito do RAC – 5b (n=6) e do veículo (DMSO) (n=6) em preparações de segmentos de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE (1 $\mu$ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM).



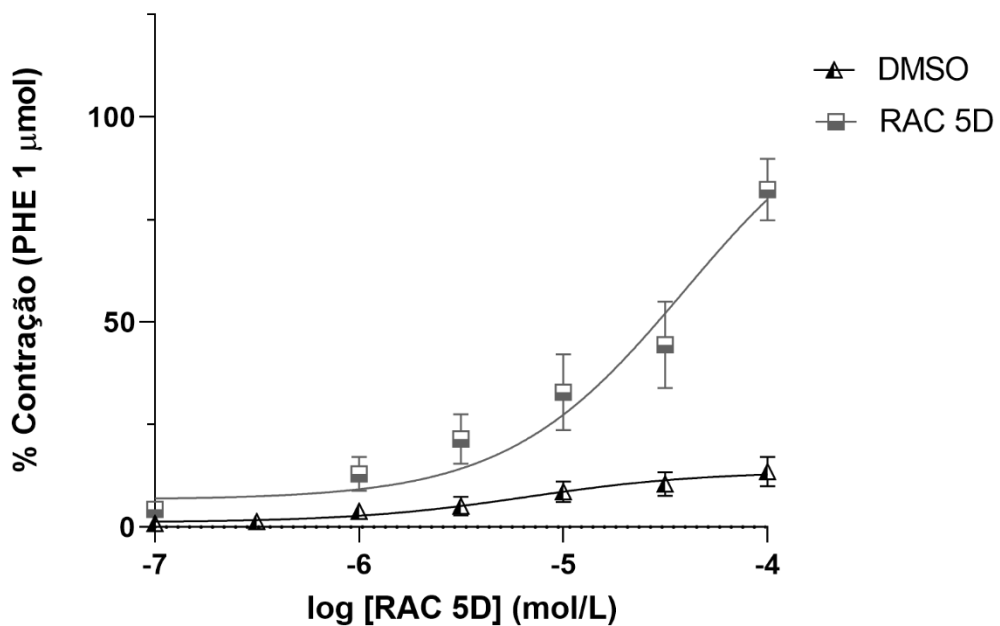
Fonte: Dados da Pesquisa

Gráfico 3 - Efeito do RAC – 5c (n=6) e do veículo (DMSO) (n=6) em preparações de segmentos de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE (1 $\mu$ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM).



Fonte: Dados da Pesquisa

Gráfico 4 - Efeito do RAC – 5d (n=6) e do veículo (DMSO) (n=6) em preparações de segmentos de aorta com endotélio íntegro pré-contraídos com PHE (1 $\mu$ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (SEM), média da CE50 e média da pCE50.



Fonte: Dados da Pesquisa



A Tabela 6 apresenta os dados, de E<sub>max</sub> e de CE<sub>50</sub> acompanhados pelo erro padrão da média (SEM) e o índice de confiança para os análogos RAC – 5a,b,c e d.

Tabela 6 - Efeito vasorrelaxante dos análogos em anéis de aorta pré-contraídos com PHE (1μM) com endotélio íntegro (E+)

	<i>n</i>	<b>E<sub>max</sub>(%)</b>	<b>CE<sub>50</sub></b>	<b>pCE<sub>50</sub></b>
		<b>Média + SEM</b>	<b>Média [IC95]</b>	<b>Média + SEM</b>
<b>DMSO 1%</b>	6	13,62 ± 2,44	6,697 [0,751 - 77,244]	5,17 ± 0,39
<b>RAC – 5a</b>	6	130,48 ± 12,03*	54,742 [35,025 - 92,313]	4,26 ± 0,09
<b>RAC – 5b</b>	6	106,60 ± 7,33**	10,842 [4,488 - 26,407]	4,96 ± 0,15
<b>RAC – 5c</b>	6	55,59 ± 6,29	3,061 [0,397 - 28,079]	5,51 ± 0,32
<b>RAC – 5d</b>	6	108,60 ± 24,50	39,260 [8,639 - 564,702]	4,41 ± 0,27

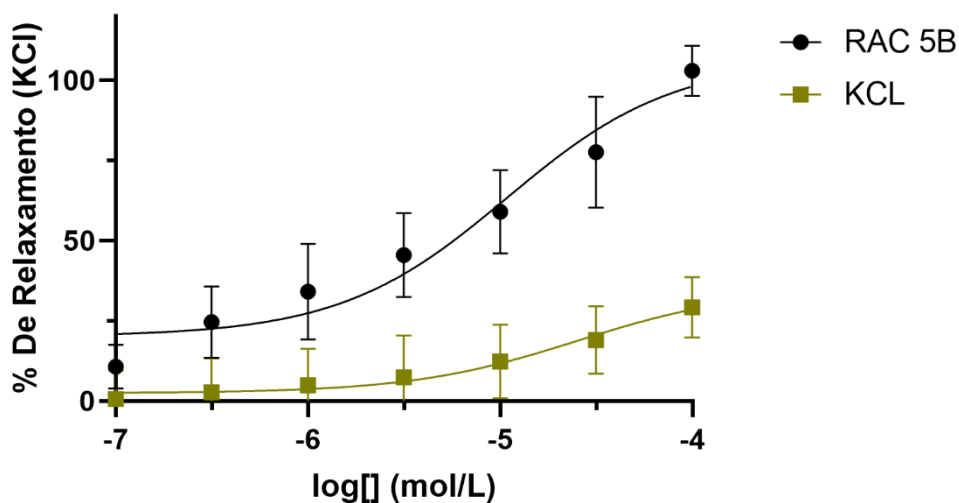
\*p<0,0001 estatisticamente diferente em relação ao efeito (E<sub>max</sub>), potência CE<sub>50</sub> e pCE<sub>50</sub> do grupo controle. Teste T de Student. Fonte: Dados da pesquisa

Com base nos dados apresentados e a análise estatística, os análogos que mais se destacaram em relação a potência, eficácia foram os análogos RAC – 5a e RAC – 5b, e mediante o *docking* molecular o análogo escolhido para posteriores teste foi o RAC – 5b.

### 5.3 Efeito do RAC – 5b em anéis de aorta pré-contraídas com cloreto de potássio (80mM) em endotélio íntegro (E+) (n=6).

Quando as preparações de anéis de aorta com endotélio íntegro foram pré-contraídas com KCl, foi possível observar uma E<sub>MAX</sub> (35,16 ± 9,26%) (n=6), um efeito significativamente menor que as preparações pré-contraídas com PHE (1μmol/L). Em contrapartida os valores de CE<sub>50</sub> não apresentaram diferença significativa (Gráfico 5).

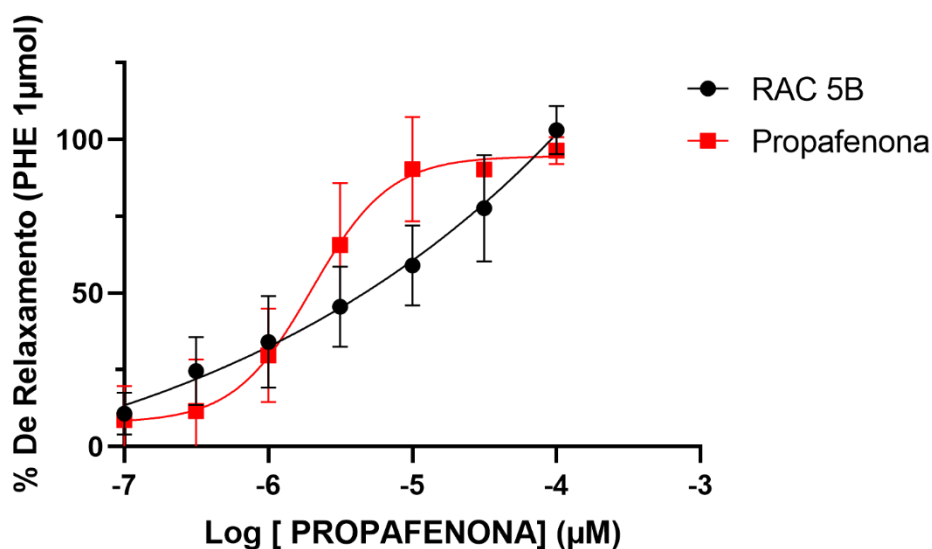
Gráfico 5 - Efeito do RAC – 5b em anéis de aorta pré-contraídas com cloreto de potássio (80mmol/L) em endotélio íntegro (E+)



Fonte: Dados da Pesquisa

#### 5.4 Comparação do efeito do RAC-5b com a propafenona em anéis de aorta pré-contraídos com PHE (1 $\mu$ M) em endotélio íntegro

Após a seleção do análogo mais promissor, procedeu-se à avaliação comparativa de seu efeito em relação à propafenona, com o objetivo de determinar se a eficácia do análogo RAC-5b supera a da propafenona. Aplicou-se o mesmo protocolo experimental, envolvendo pré-contracção com PHE 1  $\mu$ mol/L, seguido de um período de 30 minutos antes do início da curva dose-resposta. A metodologia utilizada foi idêntica à empregada nos testes dos demais análogos. Não se observou diferença estatisticamente significativa em relação à  $EC_{50}$  ou ao  $E_{MAX}$ .



Fonte: Dados da Pesquisa

## 5.5 Caracterização dos mecanismos de vasodilatação do análogo RAC – 5b

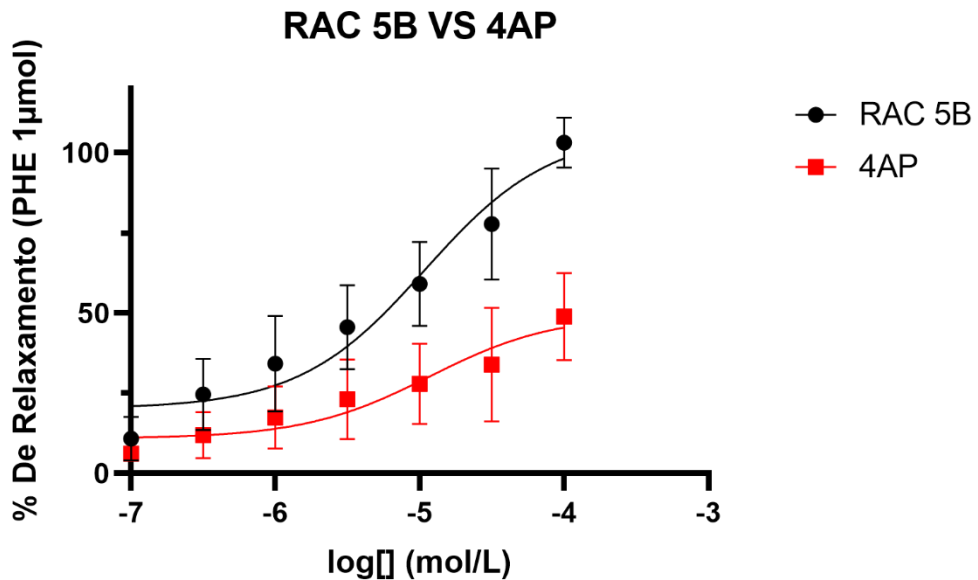
### 5.5.1 Avaliação dos efeitos dos canais de potássio no efeito vasodilatador do RAC – 5b

Para que fosse possível caracterizar os mecanismos farmacológicos responsáveis pela vasodilatação foram realizados protocolos com os usos de bloqueadores farmacológicos onde eles eram pré-contraídos com PHE (1µmol/L).

O RAC – 5b ( $10^{-7}$  a  $10^{-4}$ ), em preparações de aorta com endotélio íntegro, pré-contraídos com PHE (1µmol/L) teve seu potencial vasorrelaxante reduzido na presença de 4-aminopiridina (4-AP) (n=6) e na presença de Tetraetilamônio (TEA) (n=6) de forma dose dependente. E sua atividade vasorrelaxante foi ligeiramente menor com Glibenclamida (n=6).

Ao se analisar a curva concentração-resposta obtida na preparação de anéis de aorta pré-incubados com PHE (1µmol/L) na presença de 4-AP por regressão não linear, pode-se observar uma  $E_{MAX}$  de  $49,52 \pm 6,62\%$  e uma  $CE_{50}$  de  $11,71\mu\text{g/mL}$  ( $IC_{95\%}$  1,489 - 119,761). Não foi observada nenhuma diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os grupos 4-AP e o controle a respeito da  $CE_{50}$ , mas houve uma diferença significativa com relação a sua  $E_{MAX}$  do grupo 4-AP com o grupo controle (preparações de aorta pré-contraídos com PHE na ausência de inibidores quando comparados com o teste *t* de Student) (Gráfico 6).

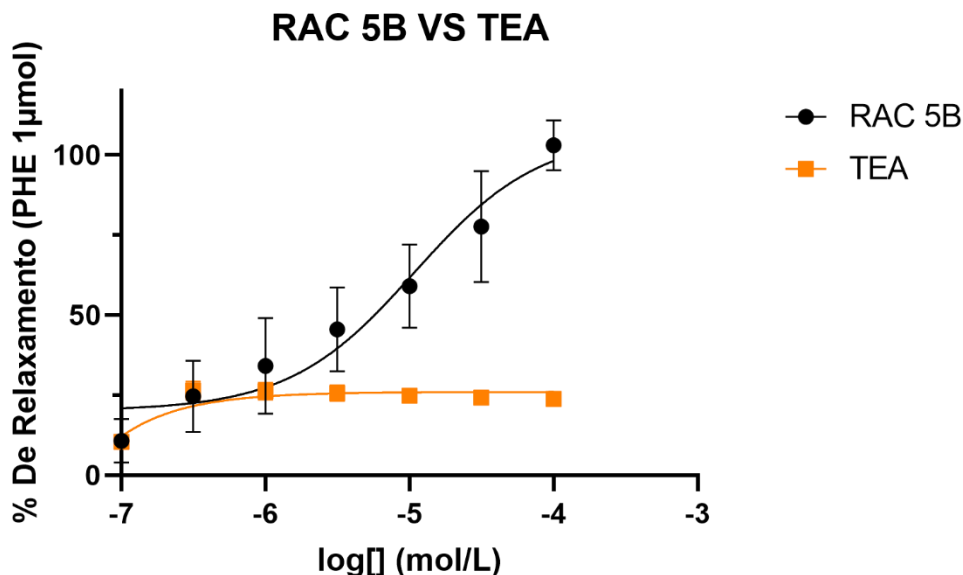
Gráfico 6 - Efeito do 4-AP em preparações de aorta com endotélio íntegro pré-contraídas com PHE (1 $\mu$ mol/L) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de 4-AP (10 $\mu$ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (SEM). pCE50: Controle: 4,96  $\pm$  0,15; 4-AP:



Fonte: Dados da pesquisa

Ao se analisar a curva concentração-resposta obtida pelas preparações de anéis de aorta pré contraídas com PHE na presença de TEA por regressão não linear, observou-se uma  $E_{MAX}$  de 26,01  $\pm$  0,66% e uma  $EC_{50}$  2,19 $\times$ 10<sup>-5</sup>  $\mu$ mol/L. Não foi observada diferença significativa na  $EC_{50}$ , enquanto na  $E_{MAX}$  pode-se observar no grupo TEA em comparação com o controle (preparações de aorta pré-contraídos com PHE na ausência de inibidores quando comparados com o teste *t* de Student) (Gráfico 7).

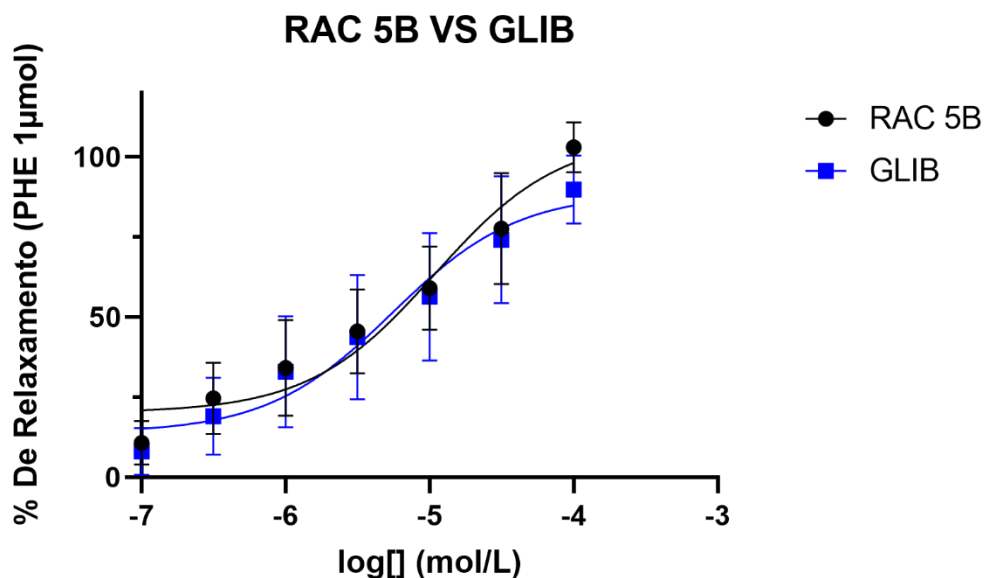
Gráfico 7- Efeito do TEA em preparações de aorta com endotélio íntegro pré-contraídas com PHE (1 $\mu$ mol/L) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de TEA (10 $\mu$ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (SEM). pCE50: Controle: 4,96  $\pm$  0,15; TEA: 10,66  $\pm$  947,53.



Fonte: Dados da Pesquisa

Ao se analisar a curva concentração-resposta obtida pelas preparações de anéis de aorta pré contraídas com PHE na presença de Glibenclamida por regressão não linear, observou-se uma  $E_{MAX}$  de 88,79  $\pm$  6,68% e uma  $EC_{50}$  de 5,502  $\mu$ g/mL (IC95% 1,765 - 16,819). Não foi observada diferença significativa na  $EC_{50}$ , enquanto na  $E_{MAX}$  pode-se observar no grupo Glibenclamida em comparação com o controle (preparações de aorta pré-contraídos com PHE na ausência de inibidores quando comparados com o teste  $t$  de Student) (Gráfico 8).

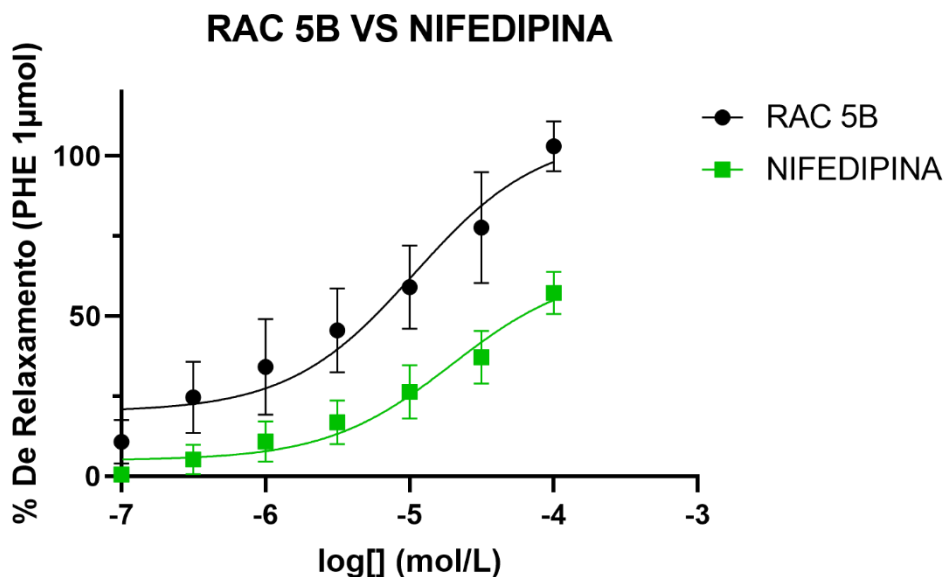
Gráfico 8 - Efeito da Glibenclamida em preparações de aorta com endotélio íntegro pré-contraídas com PHE (1 $\mu$ mol/L) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de Glibenclamida (10 $\mu$ M). Dados expressos como média e erro padrão da média (SEM). pCE50: Controle: 4,96  $\pm$  0,15; Glibenclamida: 5,26  $\pm$  0,18.



Fonte: Dados da Pesquisa

Ao se analisar a curva concentração-resposta obtida pelas preparações de anéis de aorta pré contraídas com PHE na presença de Nifedipina por regressão não linear, observou-se uma EMAX de 64,80  $\pm$  5,26% e uma EC50 de 19,616  $\mu$ g/mL (IC95% 9,635 - 41,679). Não foi observada diferença significativa na EC50, enquanto na EMAX pode-se observar no grupo Nifedipina em comparação com o controle (preparações de aorta pré-contraídos com PHE na ausência de inibidores quando comparados com o teste t de Student) acredita-se que talvez os análogos estejam modulando o potencial de membrana e interferindo nos canais de cálcio voltagem dependente (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Efeito da Nifedipina em preparações de aorta com endotélio íntegro pré-contraídas com PHE (1µmol/L) na ausência (Controle) (n=6) ou na presença (n=6) de nifedipina (10µM). Dados expressos como média e erro padrão da média (SEM). pCE50: Controle: 4,96 ± 0,15; Nifedipina: 4,71 ± 0,13



Fonte: Dados da Pesquisa

A Tabela 7 abaixo apresenta os valores de EMAX, CE50 e pCE50 acompanhados pelo erro padrão da média (SEM), índice de confiança do análogo RAC – 5b. Os valores descritos na tabela são os valores na ausência e presença dos bloqueadores analisados.

Tabela 7 - Efeito vasorrelaxante do análogo RAC – 5b em anéis de aorta pré-contraídas com PHE (1µmol/L) em endotélio íntegro na ausência (Controle) ou na presença dos bloqueadores.

	n	E <sub>max</sub> (%)	CE <sub>50</sub>	pCE <sub>50</sub>
		Média + SEM	Média [IC95]	Média + SEM
<b>RAC – 5b</b>	6	106,60 ± 7,33	10,842 [4,488 - 26,407]	4,96 ± 0,15
<b>4AP</b>	6	49,52 ± 6,62	11,711 [1,489 - 119,761]	4,93 ± 0,29
<b>TEA</b>	6	26,01 ± 0,66	2,19x10 <sup>-5</sup> [NC]*	10,66 ± 947,53
<b>GLIB</b>	6	88,79 ± 6,68	5,502 [1,765 - 16,819]	5,26 ± 0,18
<b>Nifedipina</b>	6	64,80 ± 5,26	19,616 [9,635 - 41,679]	4,71 ± 0,13
<b>Propafenona</b>	6	94,61 ± 4,02	2,002 [1,342 - 2,892]	5,70 ± 0,08

\*NC valor de intervalo de confiança não calculado, casos assim ocorrem devido a uma tendência ao infinito de realizar o cálculo da  $CE_{50}$ , o que impossibilita calcular algum parâmetro relacionado, nesse parâmetro em questão foi indicado com sigla NC (não calculado). Fonte: Dados da Pesquisa.



## 6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo estudar de forma inédita o efeito vasorrelaxante dos 4 análogos da propafenona em aortas isoladas de ratos Wistar. Com o crescente aumento de óbitos em decorrência de doenças cardiovasculares, especialmente a hipertensão, é imperativo a busca por novas terapias, fármacos e alvos que possam sanar ou ajudar a sanar tal problemática. O redirecionamento de fármaco já é algo comum e presente na indústria farmacêutica e análogos ou derivados da propafenona já foram estudados anteriormente como potencial agente anti-hipertensivo.

Primeiramente, foi criada uma curva logarítmica cumulativa dos compostos e cada um deles foi testado em preparações de anéis de aorta pré-contraídos, tal metodologia é indispensável pois este terá contato com o tecido em estudo durante todo o experimento (LIMA *et al.*, 2014), para isto os anéis foram contraídos com fenilefrina. A fenilefrina foi escolhida por ser um agonista do receptor  $\alpha 1$ -adrenérgicos, tais receptores estão acoplados a uma proteína  $G_q$  cuja principal ação é ativar a enzima fosfolipase C responsável por converter o bifosfato de  $PIP_2$  em DAG e  $IP_3$ . Pelo  $IP_3$  ser bastante solúvel no citosol vai se ligar a receptores de  $IP_3$  no RS liberando assim o  $Ca^{2+}$  armazenado no RS, já o DAG ao inibir a atividade da fosfatase de miosina aumenta a razão MLCK/MLCP promovendo assim a ligações cruzadas que resultam na tensão muscular (MEIQIN *et al.*, 2024). Os resultados demonstraram que mediante pré-contracção induzida com PHE, os análogos provocaram uma redução parcial ou total a vasoconstricção, dentre eles destacaram-se os análogos **a** ( $E_{MAX}$ :  $130,48 \pm 12,03\%$ ;  $CE_{50}$  54,742 IC 95% 35,025 - 92,313;  $pCE_{50}$ :  $4,26 \pm 0,09$ ) e **b** ( $E_{MAX}$ :  $106,60 \pm 7,33\%$ ;  $CE_{50}$ : 10,842 IC95% 4,488 - 26,407;  $pCE_{50}$   $4,96 \pm 0,15$ ), e dentre eles o escolhido foi o b por conta dos parâmetros  $E_{MAX}$  e  $CE_{50}$  supracitados.

O análogo escolhido teve sua eficácia e potência comparados com a propafenona, entretanto não foi observada diferença significativa entre o análogo e a propafenona.

Além da fenilefrina, o KCl também é amplamente utilizado como agente contrátil para induzir vasoconstricção no músculo liso. Diferente da fenilefrina o cloreto de potássio provoca uma contração eletromecânica devido à despolarização das membranas celulares, ativando canais de cálcio dependentes de voltagem e induzindo a contração muscular (FEREZIN *et al.*, 2005). Apesar de ambos terem a mesma função, o mecanismo farmacológico é diferente. Por tanto, cada agente é utilizado em diferentes contextos experimentais para estudar mecanismos específicos de contração do músculo liso.

Nas preparações de anéis de aorta, foi utilizado o KCl (80 $\mu$ mol/L) para pré-contrair os vasos. Foi observado que embora não houvesse uma abolição total da resposta vasodilatadora, houve uma diminuição significativa do relaxamento induzido pelo análogo RAC – 5b em comparação com as preparações pré-contraídas com fenilefrina. A sensibilidade da aorta de ratos à propafenona parece depender do tipo de contração induzida (IVKOVIĆ *et al.*, 2012). É possível que a concentração de KCl empregada tenha causado o bloqueio dos canais de K<sup>+</sup> que são responsáveis pelo vasorrelaxamento, a partir do vazamento do K<sup>+</sup> e bloqueio do influxo de Ca<sup>2+</sup>, dos vasos endoteliais, corroborando com a hipótese de que os canais participam no mecanismo vasodilatador dos análogos (DE LIMA *et al.*, 2014).

O estudo realizado no presente trabalho mostrou que o análogo RAC – 5b apresenta efeito vasodilatador, provavelmente por seu mecanismo de ação ser igual ao da propafenona, ele atua bloqueando os canais de Na<sup>+</sup> (KIRSCH, 1994) e esse bloqueio promove a abertura dos canais de K<sup>+</sup> abertura essa responsável pelo vazamento de K<sup>+</sup> causando assim uma hiperpolarização (CONTRERAS *et al.*, 2024). Com a hiperpolarização a probabilidade da entrada de Ca<sup>2+</sup> através dos canais dependentes de voltagem diminui tendo como um dos resultados o aumento da atividade da MLCP causando assim a diminuição da tensão muscular (SINGH, *et al.*, 2024).

Com base no que foi observado nos resultados do *screening* buscou-se então avaliar o efeito do análogo RAC – 5b nos canais de potássio, para isso foi utilizado 3 bloqueadores de canais de potássio, foram eles 4-AP (bloqueador de canais de potássio dependentes de voltagem), TEA (bloqueador de canais de potássio não seletivo) e Glibenclamida (bloqueador de canais de potássio dependentes de ATP).

Após a administração do bloqueador 4-AP foi observada uma redução significativa do relaxamento induzido pelo análogo (E<sub>MAX</sub> de 49,52  $\pm$  6,62% e uma CE<sub>50</sub> de 11,71 $\mu$ g/mL). Os canais de potássio Kv são um tipo específico de canal de íons que desempenham um papel crucial na regulação do potencial de membrana das células musculares lisas vasculares, influenciando assim a contração ou relaxamento dessas células e, conseqüentemente, o diâmetro dos vasos sanguíneos. Portanto, a inibição desses canais reduziria o efeito vasodilatador do análogo, indicando que a ativação dos canais de potássio Kv é um dos mecanismos pelos quais o análogo exerce seu efeito vasorelaxante (WULFF; ZHOROV, 2008).

Com relação ao TEA, foi observado um efeito semelhante (E<sub>MAX</sub> de 26,01  $\pm$  0,66% e uma EC<sub>50</sub> 2,19x10<sup>-5</sup>  $\mu$ mol/L), uma redução significativa no relaxamento induzido pelo análogo. O resultado observado sugere que o TEA ao causar uma despolarização na membrana

inibiu o efluxo de  $K^+$  (NELSON et al., 1995; WILSON et al., 1988), pelo TEA se tratar de um bloqueador não seletivo, provavelmente ele esteja atuando em canais de K do tipo de grande condutância ativados por cálcio e voltagem (BK), esses canais possuem uma condutância unitária e significativamente maior que outros membros dos canais de Kv. Nas células musculares lisas vasculares, os canais BK são coexpressos com a subunidade  $\beta 1$ , que modifica suas propriedades, incluindo a sensibilidade à voltagem e ao  $Ca^{2+}$ . O bloqueio seletivo dessa subunidade  $\beta 1$  por TEA, por exemplo, pode alterar significativamente essas propriedades, aumentando a sensibilidade do canal às mudanças na voltagem e no  $Ca^{2+}$ . Sem a subunidade  $\beta 1$ , os canais BK podem não abrir tão facilmente em resposta ao aumento de  $Ca^{2+}$  ou às mudanças de voltagem, o que pode levar a uma maior tendência à despolarização e, conseqüentemente, a um aumento no tônus vascular (ECHEVERRÍA *et al.*, 2024).

Na presença de GLIB, também foi observada uma diminuição da  $E_{MAX}$  ( $E_{MAX}$  de  $88,79 \pm 6,68\%$  e  $EC_{50}$  de  $5,502 \mu g/mL$ ) embora menos pronunciada. Os canais de potássio dependentes de ATP ( $K_{ATP}$ ) são compostos por quatro subunidades formadoras de poros da família do canal de potássio retificador interno (Kir) (duas isoformas: Kir6.1 e Kir6.2) e quatro subunidades reguladoras de receptor de sulfonilureia (SUR) (três isoformas: SUR1, SUR2A e SUR2B). As diferentes composições de subunidades Kir6.x e SUR resultam em canais distintos com morfologias, funcionalidades e expressões teciduais únicas (KOKOTI *et al.*, 2024). O bloqueio desses canais resulta na impossibilidade do efluxo de potássio da célula e a não hiperpolarização da membrana, desencadeando uma resposta de contração ao tecido. Diante do uso de Glibenclamida, o esperado seria que vasorrelaxamento induzido pelo análogo fosse menor que o observado no experimento, tal resultado mostra que embora menos pronunciada em comparação com os outros bloqueadores, o análogo atuar por esta via, embora esta não seja a principal.

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo investigou de maneira pioneira o efeito vasorrelaxante de quatro análogos da propafenona em aortas isoladas de ratos Wistar, destacando a relevância na busca por novas terapias frente ao aumento de mortalidade devido a doenças cardiovasculares, especialmente a hipertensão. Utilizando uma curva logarítmica cumulativa dos compostos, os análogos foram testados em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, revelando que os análogos provocaram uma redução parcial ou total na vasoconstrição. O análogo rac-5b mostrou-se promissor devido aos seus parâmetros EMAX e CE50. O efeito do análogo foi comparado com a propafenona, não havendo diferença significativa, e foi ainda avaliado com diferentes agentes contráteis como KCl. A pesquisa demonstrou que o rac-5b exerce efeito vasodilatador, possivelmente bloqueando canais de Na<sup>+</sup>, promovendo a abertura de canais de K<sup>+</sup> e diminuindo a entrada de Ca<sup>2+</sup>, resultando em menor tensão muscular. Além disso, a investigação com bloqueadores de canais de potássio indicou que a ativação dos canais Kv, BK e KATP é crucial para o efeito vasorrelaxante do análogo. A interação com canais de cálcio tipo L, observada na presença de nifedipina, sugere uma dependência parcial, reforçando a complexidade do mecanismo de ação dos análogos. Esses resultados sublinham a importância do redirecionamento de fármacos e a potencialidade dos análogos da propafenona como agentes terapêuticos anti-hipertensivos.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo realizado trouxe contribuições significativas para a compreensão do efeito vasorrelaxante dos análogos da propafenona em aortas isoladas de ratos Wistar. Com a prevalência crescente de doenças cardiovasculares, como a hipertensão, é fundamental buscar novas terapias e medicamentos que possam mitigar ou ajudar a tratar essa condição.

Foi verificado a influência de agentes contráteis, como a PHE e KCl utilizados para pré-contrair os vasos, a fim de estudar o efeito dos análogos. A fenilefrina atua como um agonista dos receptores  $\alpha 1$ -adrenérgicos, desencadeando uma série de eventos que levam à contração muscular. Os resultados mostraram que os análogos promoveram uma redução parcial ou total da vasoconstrição induzida pela fenilefrina, destacando-se especialmente os análogos a e b. Além disso, o KCl embora induza, assim como a fenilefrina, contração muscular, seus mecanismos farmacológicos são diferentes. Observou-se uma diminuição significativa do relaxamento induzido pelos análogos quando os vasos foram pré-contraídos com KCl, sugerindo um possível bloqueio dos canais de potássio responsáveis pelo vasorrelaxamento.

Os resultados mostraram que a administração do bloqueador 4-AP reduziu significativamente o relaxamento induzido pelo análogo, indicando que a ativação dos canais de potássio  $K_v$  é um dos mecanismos pelos quais o análogo exerce seu efeito vasorrelaxante. Além disso, a administração de TEA e Glibenclamida também resultou em uma diminuição do efeito vasorrelaxante do análogo, sugerindo que os canais de potássio não seletivos e os canais de potássio dependentes de ATP também estão envolvidos nesse processo. Finalmente, observou-se uma redução significativa do vasorrelaxamento induzido pelo análogo na presença de nifedipina e cálcio, sugerindo uma interação entre os canais de potássio e os canais de cálcio do tipo L.

Esses resultados fornecem *insights* importantes sobre os mecanismos pelos quais os análogos da propafenona exercem seu efeito vasorrelaxante, o que pode ter implicações significativas no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da hipertensão e outras doenças cardiovasculares. No entanto, são necessárias mais pesquisas para entender completamente esses mecanismos e explorar seu potencial terapêutico, tendo como alvos receptores  $\beta$  e a comparação do análogo com a propafenona.

## REFERÊNCIAS

BAKER, Jillian G.; HILL, Stephen J.; SUMMERS, Roger J. **Evolution of  $\beta$ -blockers: From anti-anginal drugs to ligand-directed signalling.** *Trends in Pharmacological Sciences*, abr. 2011

BONFIM, Samile et al. **Hospitalizations for Cardiovascular Diseases Sensitive to Primary Health Care in Paraná State, Brazil: A Bayesian Spatiotemporal Model.** *Annals of Family Medicine*, v. 22, n. 2, p. 140–148, 1 mar. 2024.

CONTRERAS, Ruben G. et al. **Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: More than an Electrogenic Pump.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 11, p. 6122, 1 jun. 2024. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/25/11/6122>>.

DILDORA DILMURODOVNA, Togaydullayeva. **ОБРАЗОВАНИЕ НАУКА И ИННОВАЦИОННЫЕ ИДЕИ В МИРЕ** <http://www.newjournal.org/> Выпуск журнала №-41

DONOSO, M. Verónica; AEDO, Felipe; HUIDOBRO-TORO, J. Pablo. **The role of adenosine A2A and A3 receptors on the differential modulation of norepinephrine and neuropeptide Y release from peripheral sympathetic nerve terminals.** *Journal of Neurochemistry*, v. 96, n. 6, p. 1680–1695, mar. 2006.

ECHEVERRÍA, Felipe et al. **Large conductance voltage-and calcium-activated K<sup>+</sup> (BK) channel in health and disease.** *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media SA. , 2024

FEELISCH, Martin et al. **Long-lasting blood pressure lowering effects of nitrite are NO-independent and mediated by hydrogen peroxide, persulfides, and oxidation of protein kinase G1 $\alpha$  redox signalling.** *Cardiovascular Research*. Oxford University Press. , 1 jan. 2020

FLOOD, David et al. **Integrating hypertension and diabetes management in primary health care settings: HEARTS as a tool.** *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, v. 46, 2022.

FÖRSTERMANN, Ulrich; SESSA, William C. **Nitric oxide synthases: Regulation and function.** *European Heart Journal*., abr. 2012

**Global report on hypertension The race against a silent killer.**

GODOY-MARÍN, Héctor et al. **Adenosine a2a receptors are upregulated in peripheral blood mononuclear cells from atrial fibrillation patients.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 7, 1 abr. 2021.

GOSWAMI, Sumanta Kumar et al. **Management of inflammation in cardiovascular diseases.** *Pharmacological Research*, v. 173, 1 nov. 2021.

IVKOVIĆ, B. et al. **The novel phenylpropiophenone derivates induced relaxation of isolated rat aorta.** *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, v. 62, n. 7, p. 345–350, jul. 2012.

KARLINER, Joel S. **Lysophospholipids and the cardiovascular system**. Disponível em: <www.bba-direct.com>.

KIRSCH, Glenn E. **Na<sup>+</sup> Channels: Structure, Function, and Classification.**, 1994.

KOKOTI, Lili et al. **Non-vascular ATP-sensitive potassium channel activation does not trigger migraine attacks: A randomized clinical trial**. *Cephalalgia : an international journal of headache*, v. 44, n. 5, 1 maio 2024.

MARTINEZ, Ramon et al. **The slowdown in the reduction rate of premature mortality from cardiovascular diseases puts the Americas at risk of achieving SDG 3.4: A population trend analysis of 37 countries from 1990 to 2017**. *Journal of Clinical Hypertension*, v. 22, n. 8, p. 1296–1309, 1 ago. 2020a.

MARTINEZ, Ramon et al. **The slowdown in the reduction rate of premature mortality from cardiovascular diseases puts the Americas at risk of achieving SDG 3.4: A population trend analysis of 37 countries from 1990 to 2017**. *Journal of Clinical Hypertension*, v. 22, n. 8, p. 1296–1309, 1 ago. 2020b.

MLADĚNKA, Přemysl et al. **Comprehensive review of cardiovascular toxicity of drugs and related agents**. *Medicinal Research Reviews.*: John Wiley and Sons Inc., 1 jul. 2018

NELSON, Mark T; QUAYLE, John M. **Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle**. *The American Journal of Physiology*, 1995.

SCANNELL, Jack W. et al. **Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency**. *Nature Reviews Drug Discovery.*, mar. 2012

SHAKIBFAR, Saeed et al. **Drug Repurposing in Crohn's Disease Using Danish Real-World Data**. *Pragmatic and Observational Research*, v. Volume 15, p. 17–29, fev. 2024.

SHIMOKAWA, Hiroaki; SUNAMURA, Shinichiro; SATOH, Kimio. **RhoA/Rho-Kinase in the Cardiovascular System**. *Circulation Research: Lippincott Williams and Wilkins.*, 22 jan. 2016

SINGH, Mahendra Kumar; DEY, Subhasis. **A critical review of multiphase modelling of blood flow in human cardiovascular system**. *Journal of the Indian Institute of Science*, v. 104, n. 1, p. 1-29, 2024. DOI: 10.1007/s41745-024-00430-y.

VANHOUTTE, P. M. et al. **Endothelial dysfunction and vascular disease**. *Acta Physiologica: Blackwell Publishing Ltd.*, 1 jan. 2017

VIZZA, Carmine Dario et al. **Venous endothelin-1 (ET-1) and brain natriuretic peptide (BNP) plasma levels during 6-month bosentan treatment for pulmonary arterial hypertension**. *Regulatory Peptides*, v. 151, n. 1–3, p. 48–53, 29 nov. 2008.

WANG, Tao; LI, Yilin; ZHENG, Xiaoqiang. **Association of socioeconomic status with cardiovascular disease and cardiovascular risk factors: a systematic review and meta-analysis**. *Journal of Public Health (Germany)*, v. 32, n. 3, p. 385–399, 1 mar. 2024.

WILSON, Campbell et al. **Comparative effects of K<sup>+</sup> channel blockade on the vasorelaxant activity of cromakalim, pinacidil and nicorandil.** European Journal of Pharmacology., 1988.

WULFF, Heike; ZHOROV, Boris S. **K<sup>+</sup> channel modulators for the treatment of neurological disorders and autoimmune diseases.** Chemical Reviews., maio 2008

## 9. ANEXO





UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE  
MEDICAMENTOS - NPDM  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação pré-clínica de novos análogos racêmicos da propafenona nas atividades antiarrítmica e vaso dilatadora em ratos wistar” registrada com o protocolo 27060722-0, sob a responsabilidade **ROBERTA JEANE BEZERRA JORGE** e **NATÁLIA CAVALCANTE BARBOSA LIMA** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião de 16 / 03 / 2023.

We hereby certify that the project entitled “**Preclinical evaluation of new racemic analogs of propafenone in antiarrhythm and vasodilator activities in wistar rats**” identified by the protocol number 27060722-0, and conducted by responsabilidade **ROBERTA JEANE BEZERRA JORGE** and **NATÁLIA CAVALCANTE BARBOSA LIMA** which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo *Chordata*, sub-vertebrate *Vertebrata* (except humans), for the purpose of scientific research - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in the meeting of 16 / 03 / 2023.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01/09/2022 Fim: 15/12/2024
Espécie	Rato heterogênico
Linhagem	Wistar
Nº de animais autorizados	318
Peso	Entre 250 e 300 gramas
Idade	45- 60 dias
Sexo	Macho
Origem (fornecedor)	Biotério do NPDM
Local do experimento	Biotério do NPDM

gov.br  
Documento assinado digitalmente  
LAIS LACERDA BRASILEIRA DE OLIVEIRA  
Data: 27/05/2023 17:45:17 -0300  
Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

Fortaleza, 23 de março de 2023

Coordenação da Comissão de Ética e Uso de Animais  
Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos  
Universidade Federal do Ceará

Rua Coronel Nunes de Melo, 1000, Rodolfo Teófilo - Fortaleza/CE - CEP 60430-275 - Tel: 55 (85) 3366-8338  
Horário de atendimento: Segunda a Sexta, das 9h às 12h e das 13h30 às 18h. E-mail: ceua-npdm@ufc.br