



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA (CARDIOLOGIA)



Thais da Silva Barenco Marins

**CANAL BK_{Ca} COMO ALVO TERAPÊUTICO NA HIPERTENSÃO ARTERIAL
PULMONAR: ESTUDO PRÉ-CLÍNICO EM MODELO EXPERIMENTAL**

Rio de Janeiro

2024

Thais da Silva Barenco Marins

CANAL BK_{Ca} COMO ALVO TERAPÊUTICO NA HIPERTENSÃO ARTERIAL
PULMONAR: Estudo pré-clínico em modelo experimental

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Cardiologia) - Instituto do Coração Edson Saad, da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências (Área de concentração: Cardiologia).

Orientador: Prof. Dr. José Hamilton Matheus Nascimento
(Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Coorientador: Prof. Dr. Cristiano Gonçalves Ponte
(Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro)

Rio de Janeiro
2024

CIP - Catalogação na Publicação

M339c Marins, Thais da Silva Barenco
Canal BKCa como alvo terapêutico na hipertensão arterial pulmonar: estudo pré-clínico em modelo experimental / Thais da Silva Barenco Marins. -- Rio de Janeiro, 2024.
116 f.

Orientador: José Hamilton Matheus Nascimento.
Coorientador: Cristiano Gonçalves Ponte.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós Graduação em Medicina (Cardiologia), 2024.

1. Hipertensão arterial pulmonar. 2. Disfunção mitocondrial. 3. Canal BKCa. 4. Substância X. I. Nascimento, José Hamilton Matheus, orient. II. Ponte, Cristiano Gonçalves, coorient. III. Título.

Thais da Silva Barenco Marins

CANAL BK_{Ca} COMO ALVO TERAPÊUTICO NA HIPERTENSÃO ARTERIAL
PULMONAR: Estudo pré-clínico em modelo experimental

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Cardiologia) – Instituto do Coração Edson Saad, da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências (Área de concentração: Cardiologia).

Aprovada em:

Rio de Janeiro, 30 de janeiro de 2024.

Prof. José Hamilton Matheus Nascimento, Doutor, IBCCF/UFRJ – Orientador

Prof. Cristiano Gonçalves Ponte, Doutor, NCBA/IFRJ – Coorientador

Prof^a. Gláucia Maria Moraes de Oliveira, Doutora, ICES/UFRJ

Prof. Roberto Coury Pedrosa, Doutor, ICES/UFRJ

Prof. Paulo de Assis Melo, Doutor, ICB/UFRJ

Prof. Leonardo Maciel de Oliveira Pinto, Doutor, UFRJ – Campus Xerém

Prof. Fernando de Azevedo Cruz Seara, Doutor, IBCCF/UFRJ

DEDICATÓRIA

À minha avó, Noedia, professora exemplar que tanto me auxiliou a trilhar esse caminho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, Autor da minha história, pela Graça de poder concluir mais uma etapa em minha caminhada e à Virgem Maria, pela intercessão e amparo nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais, Alvaro e Fatima; meu irmão, Gabriel e minha avó, Noedia (*in memoriam*). Não há palavras que possam expressar a gratidão pelo apoio, incentivo, dedicação, amor e carinho em todos os momentos.

Ao meu marido Uelton, por todo apoio, auxílio, incentivo, orações e amor em todos os momentos, por toda paciência nos momentos de desespero e estresse, por não me deixar desistir nem desanimar! Não imagino como seria tudo isso sem você ao meu lado! Amo você até o Céu!

Ao meu orientador, professor José Hamilton, por ter aberto às portas do laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca (lá em 2015!), onde finalizei minha iniciação científica e pude seguir pelo mestrado e doutorado. Pelo acolhimento, confiança, paciência e pelos ensinamentos que, não só foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho, mas também para a minha vida acadêmica.

Ao meu coorientador, professor Cristiano Ponte, que me acompanha nessa trajetória acadêmica há 10 anos (desde a Iniciação Científica). Obrigada por mais uma oportunidade, pela confiança, por todo incentivo no meio acadêmico, pelos puxões de orelha, e por todos os ensinamentos, que contribuem muito para a minha vida profissional e pessoal.

Aos professores Ainá, Fernando e Leonardo, por tanto contribuírem com esse trabalho, e aos companheiros de laboratório: Ygor, Gabriel, Diana, Itanna, Duda e Keyla.

A Rafaela e a Pâmella, pelo companheirismo e ajuda de sempre.

Aos meus amigos, que mesmo longe, estão sempre perto! Maressa, Lud e Ruhan, obrigada pelo carinho e pela torcida!

A todos que, de alguma forma, foram essenciais para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

MARINS, Thais da Silva Barenco. Canal BK_{Ca} como alvo terapêutico na hipertensão arterial pulmonar: estudo pré-clínico em modelo experimental. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2023.

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença progressiva e de difícil diagnóstico. Nela, é observada vasoconstrição das artérias e arteríolas pulmonares e remodelamento vascular, que levam ao aumento na resistência vascular pulmonar e nos valores de pressão da artéria pulmonar. As terapias existentes têm eficácia limitada, levando a altos índices de mortalidade; por isso, a busca de novas estratégias terapêuticas mais eficazes se faz necessária. Nesse contexto, o canal de potássio sensível ao cálcio, de alta condutância (canal BK_{Ca}), amplamente expresso na vasculatura pulmonar e na membrana interna de mitocôndrias cardíacas, surge como um novo alvo terapêutico. Assim, o objetivo deste trabalho é investigar os efeitos da ativação deste canal, por um ativador potente e seletivo (substância X), tanto em modelo experimental de HAP induzido por monocrotalina (MCT) em ratos quanto em mitocôndrias isoladas de cardiomiócitos de camundongos. Foi observado que, no modelo de HAP, animais tratados com a substância X tiveram melhora da pressão sistólica do ventrículo direito, da hipertrofia ventricular direita, na duração do intervalo QTc, da reatividade vascular, além de maior percentual de ganho de peso e sobrevida. Já nas mitocôndrias isoladas, a substância X se mostrou eficiente em modular a atividade dos complexos respiratórios, além de prevenir os danos causados por hipóxia/reoxigenação. Assim, este estudo mostrou os efeitos terapêuticos da ativação de canais BK_{Ca} pela substância X, sejam vasculares ou mitocondriais, e a importância desse canal no metabolismo mitocondrial e na patogênese de doenças como a HAP. Apesar do uso potencial desse ativador – e de outros capazes de ativar o canal BK_{Ca} – nenhum deles se encontra disponível para uso clínico, reforçando a importância do estudo sobre este canal como alvo terapêutico.

Palavras-chave: Hipertensão Arterial Pulmonar; Disfunção mitocondrial; Canal BK_{Ca}; Substância X

ABSTRACT

MARINS, Thais da Silva Barenco. BK_{Ca} channel as a therapeutic target in pulmonary arterial hypertension: a preclinical study in experimental model. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2023.

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a progressive disease of difficult diagnosis. It ~~which~~ promotes vasoconstriction of pulmonary arteries and arterioles and vascular remodeling, leading to an increase in pulmonary vascular resistance and pulmonary artery pressure values. Current therapies have limited effectiveness, which is reflected by high mortality rates. Therefore, the search for new, more effective therapeutic strategies is necessary. In this context, the high-conductance calcium-sensitive potassium channel (BK_{Ca} channel), widely expressed in pulmonary vasculature and in cardiac mitochondria, emerges as a new therapeutic target. Thus, the aim of this study is to investigate the effects of this channel's activation, by a potent and selective activator (compound X), both in an experimental model of PAH, induced by monocrotalin in rats; and, in freshly isolated mitochondria from mice hearts. It was observed that, in PAH model, animals treated with compound X had improvements in right ventricular systolic pressure, right ventricular hypertrophy, QTc interval prolongation, vascular reactivity, in addition to a higher weight gain and survival rate. In isolated mitochondria, compound X proved to be efficient in modulating the activity of respiratory complexes, in addition to preventing damage caused by hypoxia/reoxygenation. Thus, this work showed the efficiency of compound X in activating BK_{Ca} channels, both vascular and mitochondrial, and the importance of this channel in mitochondrial metabolism and in the pathogenesis of diseases such as PAH. Despite the potential use of this agonist – and others capable of activating the BK_{Ca} channel – none of them are available for clinical use, reinforcing the importance of studying this channel as a therapeutic target.

Keywords: Pulmonary Arterial Hypertension; Mitochondrial dysfunction; BK_{Ca} Channel; Compound X

LISTA DE ABREVIATURAS

α BK	Ativador de canais BK _{Ca} (substância X)
ACh	Acetilcolina
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BMPR-2	<i>Bone morphogenic type 2 receptor</i>
BK _{Ca}	Canal de potássio de alta condutância sensível ao Ca ²⁺ e a voltagem
BSA	Albumina sérica bovina (BSA),
ChTx	Caribdotoxina
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica
COVID-19	<i>Coronavirus disease</i>
CSA	Ciclosporina A
CTD	Domínio C-terminal (do inglês, <i>C-terminal domain</i>)
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
DHA	Ômega 3 poliinsaturado (DHA)
DHEA	Esteróide Adrenal Deidroepiandrosterona (DHEA)
DHS-I	Dehidrosoiasaponina-I
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTC-HAP	HAP associada a doenças do tecido conjuntivo
EGTA	Ácido etileno-bis(oxietilenonitrilo)tetracético
ET-1	Endotelina-1
ETT	Ecocardiografia Transtorácica
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEVE	Fração de Ejeção Ventricular Esquerda
HAP	Hipertensão Arterial Pulmonar
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês, <i>human immunodeficiency virus</i>)

HP	Hipertensão Pulmonar
IbTx	Iberiotoxina
IK	Canal de K ⁺ de condutância intermediária
IL	Interleucina
iPDE-5	Inibidor da fosfodiesterase 5
HPCT	Hipertensão Arterial Crônica Tromboembólica
MCT	Monocrotalina
MEC	Matriz Extracelular
MOPS	Ácido 4-morfolino propanossulfônico
mPAP	Pressão Arterial Pulmonar Média
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
NO	Óxido Nítrico
ODQ ciclase)	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (inibidor da guanilato
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PAWP	Pressão pré-capilar
PCR	Proteína C Reativa
PGD	Domínio formador do poro (do inglês, <i>pore gate domain</i>)
PGI ₂	Prostaglandinas
PHE	fenilefrina
PSVD	Pressão Sistólica do Ventrículo Direito
PP2A	Fosfatase 2A
PTPM	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
QH ₂	Ubiquinona

QT	Intervalo entre o início do complexo QRS e o final da onda T, representativo da despolarização e repolarização ventricular
RCK 1 e 2	Regiões de regulação da condutância sensíveis ao Ca^{2+} 1 e 2
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>reactive oxygen species</i>)
RVP	Resistência Vascular Pulmonar
RyR	Receptor de rianodina
SERCA	Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático
SCh-HAP	HAP associada a esquistossomose
sGC	Guanilato ciclase solúvel
SK	Canal de K^+ de baixa condutância
SNP	Nitroprussiato de sódio
TMPD	N, N, N, N'-tetrametil-p-fenilenodiamina
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TRPC4	Canal receptor de potencial transitório 4
TXA ₂	Tromboxano A ₂
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VGCCs	Canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem (do inglês, <i>voltage gated calcium channels</i>)
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo
VSD	Domínio do sensor de voltagem (do inglês, <i>voltage sensor domain</i>)
WSPH	Simpósio Internacional de Hipertensão Pulmonar (do inglês, <i>World Symposium of Pulmonary Hypertension.</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

$\Delta\Psi$	Potencial de membrana
AgCl	Cloreto de prata
CO ₂	Dióxido de carbono
Ca ²⁺	Cálcio
G	Constante de aceleração da gravidade
K ⁺	Potássio
KCl	Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄	Dihidrogenofosfato de sódio
Na ₂ HPO ₄	Hidrogenofosfato dissódico
NaN ₃	Azida sódica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Remodelamento vascular observado na HAP	27
Figura 2. Disfunção endotelial na HAP.....	29
Figura 3. Alterações vasculares promovidas pelos mediadores inflamatórios.	30
Figura 4. Disfunção ventricular direita na HAP	34
Figura 5. Principais vias metabólicas envolvidas na patogênese da HAP	38
Figura 6. Principais vias de sinalização alvo na HAP.....	39
Figura 7. Planta do gênero <i>Crotalaria spectabilis</i> , estrutura química da monocrotalina e de seu metabólito ativo, dehidromonocrotalina	41
Figura 8. Esquema ilustrativo do metabolismo da MCT em modelo experimental . .	42
Figura 9. Representação esquemática do canal BKCa.....	43
Figura 10. Esquema representativo do canal BKCa na célula muscular lisa (sobre a regulação da concentração de cálcio intracelular e do tônus miogênico através do controle do potencial de membrana em miócitos vasculares).....	44
Figura 11. Protocolo experimental realizado durante 28 dias.....	54
Figura 12. Ondas e intervalos do eletrocardiograma de roedor (ratos)	55
Figura 13. Sistema horizontal de tensão isométrica	58
Figura 14. Análise da sobrevida de Kaplan-Meyer dos quatro grupos ao longo do protocolo experimental	65
Figura 15. Evolução percentual do peso corporal	66
Figura 16. Intervalo QTc ao longo do protocolo experimental	67
Figura 17. Pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD), no último dia do protocolo experimental.....	68
Figura 18. Parâmetros biométricos.....	69
Figura 19. Efeito vasodilatador da acetilcolina (ACh) ou nitroprussiato de sódio (SNP) sobre o anel do tronco da artéria pulmonar isolado.	71
Figura 20. Efeito vasodilatador da substância X (α BK) sobre o anel do tronco da artéria pulmonar isolado	72
Figura 21. Produção de ATP e ROS mitocondriais	73
Figura 22. Capacidade de retenção de Ca^{2+} e potencial de membrana.....	74
Figura 23. Consumo de O_2 em mitocôndrias isoladas de cardiomiócitos de camundongos.....	75
Figura 24. Produtos mitocondriais e características	76

Figura 25. Consumo de O ₂ em mitocôndrias submetidas a hipóxia/reoxigenação .	78
Figura 26. Produtos e características de mitocôndrias submetidas a hipóxia/reoxigenação	79
Figura 27. Turgescência mitocondrial e potencial transmembrana ($\Delta\Psi$).....	81
Figura 28. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) e retenção de Ca ²⁺ em mitocôndrias isoladas, em presença de concentrações crescentes de Ca ²⁺	83
Figura 29. Resumo gráfico dos experimentos realizados.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação clínica atualizada da HP	21
Tabela 2. Drogas e/ou toxinas associadas ao desenvolvimento da HAP	24
Tabela 3. Exemplos de mutações identificadas como patogênicas/provavelmente patogênicas, associadas ao gene BMPR-2 na HAP	28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1. HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR.....	21
2.1.1. Epidemiologia	22
2.1.2. Fisiopatologia.....	24
2.1.1.1. <i>Remodelamento vascular e disfunção endotelial</i>	25
2.1.1.2. <i>Remodelamento ventricular direito</i>	32
2.1.1.3. <i>Disfunção mitocondrial</i>	35
2.1.3. Tratamento	38
2.1.4. Modelo Experimental para estudo da HAP	40
2.2. O CANAL BK _{CA} COMO ALVO TERAPÊUTICO	42
2.3. ATIVADORES DO CANAL BK _{Ca}	46
3. JUSTIFICATIVA	50
4. OBJETIVOS	51
4.1. OBJETIVO GERAL	51
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
5.1. ANIMAIS	52
5.2. REAGENTES	52
5.3. EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	53
5.3.1. Grupos Experimentais.....	53
5.3.2. Protocolo Experimental.....	53
5.3.3. Avaliação eletrocardiográfica	54
5.3.4. Medida de pressão sanguínea	55
5.3.5. Sobrevida	56

5.3.6. Biometria	56
5.4. EXPERIMENTOS IN VITRO	56
5.4.1. Obtenção do tecido	56
5.4.2. Registro da atividade contrátil da artéria pulmonar	57
5.4.2.1. Sistema horizontal de registro de tensão isométrica	57
5.4.2.2. Construção das curvas de concentração x resposta	59
5.4.3. Análise da função mitocondrial	60
5.4.3.1. Isolamento de mitocôndrias	60
5.4.3.2. Soluções	60
5.4.3.3. Medida de consumo de O₂ mitocondrial	61
5.4.3.4. Medida de consumo de O₂ mitocondrial em condições de normóxia e hipóxia/reoxigenação	61
5.4.3.5. Medida da produção de ATP mitocondrial	62
5.4.3.6. Medida de turgescência mitocondrial e potencial transmembrana	62
5.4.3.7. Medida da produção de ROS mitocondrial	63
5.4.3.8. Medida do extravazamento de elétrons e relação ROS/ATP	63
5.4.3.9. Medida da capacidade de retenção de Ca²⁺	63
5.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
6. RESULTADOS	65
6.1. EFEITOS DO TRATAMENTO COM O ATIVADOR DE CANAL BK _{Ca} NO MODELO DE HAP INDUZIDO POR MCT EM RATOS	65
6.2. EFEITOS <i>IN VITRO</i> DO ATIVADOR DE CANAL BK _{Ca} (SUBSTÂNCIA X) EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS, EM CONDIÇÕES DE HIPÓXIA/REOXIGENAÇÃO	74
6. DISCUSSÃO	85
7. CONCLUSÕES	95
8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	95

REFERÊNCIAS.....97

1. INTRODUÇÃO

A Hipertensão Pulmonar (HP) se caracteriza como uma gama de condições clínicas crônicas e progressivas, que cursam com aumento gradativo da pressão arterial pulmonar, gerando sobrecarga no ventrículo direito (VD) com consequente disfunção cardíaca. Esses fatores são as principais causas de mortalidade e morbidade entre a população afetada, que corresponde a 1% da população mundial; dentre eles, 10% são idosos acima de 65 anos e 50% são pacientes com insuficiência cardíaca prévia (Kim; George, 2019; Mandras; Mehta; Vaidya, 2020).

Essas condições clínicas, como a Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP) possuem poucas características em comum, sendo a principal para se chegar ao diagnóstico a pressão arterial pulmonar média (mPAP) acima de 20 mmHg (valores atualizados pelo 6º Simpósio Internacional em Hipertensão Pulmonar, 2019) (Hoepfer et al., 2017; Humbert et al., 2019).

Sintomas característicos da HAP são fadiga, cansaço, dispneia e angina, todos inespecíficos, dificultando o diagnóstico, que é feito – principalmente – por Ecocardiografia Transtorácica (ETT). A identificação precoce da doença é o que garante melhores chances de sobrevivência e evolução clínica, já que quanto mais cedo o diagnóstico, menor a severidade da doença e melhor a resposta ao tratamento (Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas, 2014; Humbert et al., 2019; Attanasio et al., 2020; Mandras; Mehta; Vaidya, 2020).

O desenvolvimento e melhor disponibilidade das formas terapêuticas para o tratamento da HAP foram capazes de aumentar a sobrevida dos pacientes em 3 vezes, dando a eles maior qualidade de vida. Apesar disso, os tratamentos existentes ainda são limitados, com a doença apresentando altas taxa de morbidade e mortalidade – o que reflete na necessidade de novas estratégias terapêuticas mais eficazes (Roderburg et al., 2021). Nesse contexto, a ativação dos canais de potássio de alta condutância sensíveis ao cálcio e a voltagem (canal BK_{Ca}) surgem como um potencial alvo para o tratamento da doença, já que se encontram amplamente expressos na vasculatura, sendo importantes moduladores do tônus miogênico (Tanaka et al., 2004). Assim, ativadores desse canal – a exemplo da substância X, que será utilizada neste trabalho – que sejam capazes de melhorar e/ou prevenir as alterações promovidas pela HAP ganham destaque.

Experimentalmente, muitos são os modelos animais de HAP (Boucherat et al., 2022). Dentre aqueles que são considerados clássicos (hipóxia crônica, Sugen5416 + hipóxia, monocrotalina, monocrotalina + pneumonectomia), o modelo de monocrotalina (MCT) é amplamente utilizado, dada sua reprodutibilidade, facilidade técnica e obtenção de características compatíveis com a HAP humana severa (Hill et al., 2017).

Assim, partindo de trabalhos anteriores deste grupo de pesquisa relacionados a substância X, HAP e ativação dos canais BK_{Ca} (Barenco-Marins et al., 2023; Ferraz et al., 2020.; Ponte et al., 2012) e utilizando metodologias bem estabelecidas pelo grupo, este trabalho visa aprofundar o entendimento sobre esta relação, utilizando o modelo experimental de MCT. Também, considerando que o canal BK_{Ca} é encontrado na mitocôndria (Mito BK_{Ca}), e que a disfunção mitocondrial tem se mostrado importante fator no desenvolvimento da HAP, a ativação do canal foi avaliada frente a condições de normóxia e hipóxia/reoxigenação, em mitocôndrias isoladas de cardiomiócitos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

Em 1951, Dresdale e colaboradores descreveram uma condição clínica associada a alterações cardiopulmonares, onde os pacientes cursavam com aumento da pressão arterial pulmonar e hipertrofia do ventrículo direito (Dresdale et al., 1951). A ela, deram o nome de “Hipertensão Pulmonar Primária”, atualmente definida como Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP).

A HAP é o grupo 1 na classificação da HP. Essa classificação, baseada nas diferentes condições clínicas com características distintas apresentadas pela HP, é constantemente atualizada pelos Simpósios Internacionais de Hipertensão Pulmonar (WSPH), que reúnem especialistas de diferentes áreas, a fim de conciliar e apresentar os conhecimentos e definições estipuladas até tal momento. Iniciados em 1973, o 1º WSPH ocorreu em Genebra, após uma epidemia de HP na Europa causada pelo anorexígeno Aminorex; a partir do 2º (1998, Evian) e 3º WSPH (2003, Veneza), a HP ganhou uma classificação mais completa, dividida em 5 grupos, baseada em dados clínicos, epidemiológicos, anatofisiopatológicos e de resposta ao tratamento vigente (Jardim; Waetge, 2018; “Ministério Da Saúde Secretaria De Atenção À Saúde Portaria N O 35, De 16 De Janeiro De 2014 (*),” [S.D.]).

A classificação (Tabela 1) e conceitos hemodinâmicos e fisiopatológicos atuais foram determinados pelo 6º WSPH (2019, Nice), que reuniu 13 forças-tarefa com 124 especialistas de todo o mundo (Galiè et al., 2019).

Tabela 1. **Classificação clínica atualizada da HP**

1. Hipertensão Arterial Pulmonar

- 1.1. Idiopática
- 1.2. Hereditária
- 1.3. Induzida por drogas ou toxinas
- 1.4. Associada à:
 - i Doenças do tecido conectivo
 - ii Infecção por HIV
 - iii Hipertensão Portal
 - iv Doença cardíaca congênita
 - v Esquistossomose
- 1.5. Responsiva de longo-prazo a bloqueadores de canais de cálcio
- 1.6. Com características evidentes de doenças venosas/capilares
- 1.7. Persistente do recém-nascido

2. Hipertensão Pulmonar causada por doenças do coração esquerdo

- 2.1. Associada a insuficiência cardíaca com preservação da FEVE
-

-
- 2.2. Associada a insuficiência cardíaca com redução da fração de FEVE
 - 2.3. Doença cardíaca valvular
 - 2.4. Condições cardiovasculares congênitas/adquiridas que levam a HP pós-capilar

3. Hipertensão Pulmonar associada a doenças pulmonares e/ou hipóxia

- 3.1. Doença obstrutiva pulmonar
- 3.2. Doença restritiva pulmonar
- 3.3. Outras doenças pulmonares com padrão misto de restrição/obstrução
- 3.4. Hipóxia sem doença pulmonar
- 3.5. Doenças pulmonares desenvolvidas

4. Hipertensão Pulmonar associada a obstruções da artéria pulmonar

- 4.1. HP crônica tromboembólica
- 4.2. Outras obstruções arteriais pulmonares

5. Hipertensão Pulmonar sem mecanismos definidos e/ou multifatoriais

- 5.1. Desordens hematológicas
- 5.2. Desordens sistêmicas ou metabólicas
- 5.3. Outros
- 5.4. Doenças cardíacas congênitas complexas

HP: hipertensão pulmonar; FEVE: fração de ejeção ventricular esquerda

A HAP se caracteriza, principalmente, pelo remodelamento dos pequenos vasos pré-capilares. Pode ocorrer associada a diversas condições (tabela 1), porém, sua principal manifestação é na forma idiopática. É uma doença rara, crônica e severa, definida por valores de mPAP maiores que 20 mmHg, de pressão dos capilares pulmonares menor ou igual a 15 mmHg e resistência vascular pulmonar maior ou igual a 3 unidades Woods (W). Progrida com vasoconstrição, aumento da resistência vascular pulmonar (RVP), hipertrofia do ventrículo direito (VD) e consequente falência ventricular direita e morte do paciente (Chen et al., 2022; Cheron et al., 2021; Simonneau et al., 2019b).

2.1.1. Epidemiologia

Em doenças raras, os estudos epidemiológicos são de grande importância para que as características e padrões sobre tal condição se mantenham sempre atualizados. Porém, na HAP, esses dados são difíceis de serem obtidos, uma vez que o diagnóstico da doença é complexo. Apesar disso, dados recentes de países desenvolvidos apontam uma incidência de, aproximadamente, 6 casos/milhão de indivíduos, enquanto a prevalência varia entre 48-55 casos/milhão de adultos. Para a HAP hereditária, é observada uma predominância em indivíduos jovens,

especialmente mulheres (2:1), enquanto para a HAP idiopática – que representa mais de 50% de todos os casos – o diagnóstico é feito com maior frequência em pacientes acima dos 65 anos, independente do sexo, geralmente já acometidos por doença cardiovascular prévia (Cullivan, Higgins, et al., 2022; Humbert et al., 2022).

Depois da idiopática, a HAP associada a doenças do tecido conjuntivo (DTC-HAP) é a que acomete maior percentual de indivíduos, que evoluem para uma piora significativa de seu quadro geral em apenas um ano. Aproximadamente, 75% dos pacientes com DTC-HAP a tem relacionada a esclerodermia, uma doença crônica, multissistêmica, caracterizada por deposição excessiva de colágeno entre os órgãos, inflamação, fibrose, autoimunidade e vasculopatia generalizada. No percentual restante, encontram-se os pacientes com DTC-HAP associada ao lúpus eritematoso, a doença mista do tecido conjuntivo e a artrite reumatoide (Cansu & Korkmaz, 2023; McGoon & Miller, 2012; Naranjo & Hassoun, 2021).

Outro fator que contribui grandemente para o desenvolvimento da HAP são as doenças infecciosas, a exemplo da esquistossomose. A hipertensão arterial pulmonar associada à esquistossomose (SchHAP) acomete principalmente regiões em desenvolvimento, como África, leste do Mediterrâneo e América do Sul. Estima-se que mais de 200 milhões de indivíduos são afetados pelas diferentes espécies de *Schistosoma* ao redor do mundo, e desses, 0,5 a 5% desenvolvem a HAP. Como a esquistossomose é uma doença tropical negligenciada, cujos índices de testagem e reportagem às autoridades de saúde são precários, acredita-se que a incidência e prevalência da SchHAP sejam subnotificadas, apresentando valores maiores que os oficiais (Sibomana et al., 2020; Sinkala et al., 2022).

Uma atualização importante trazida pelo 6º WSPH se relaciona a HAP induzida por drogas ou toxinas onde, na tentativa de simplificar a caracterização da doença e acelerar seu diagnóstico, dois subgrupos foram organizados: drogas/toxinas com associação definitiva ao desenvolvimento da HAP (dados comprovados por estudos epidemiológicos de caso-controlado e multicêntricos) e drogas/toxinas com possíveis associações ao desenvolvimento da HAP (múltiplos relatos de casos ou casos relacionados a substâncias com mecanismo de ação semelhante àquelas já conhecidas) (Tabela 2). Apesar de ser uma complicação rara, essa atualização ganha importância visto que as drogas e toxinas são responsáveis pelo desenvolvimento da

HAP em até 1% dos indivíduos que as utilizam (Garg et al., 2017; Simonneau et al., 2019b).

Tabela 2. Drogas e/ou toxinas associadas ao desenvolvimento da HAP

Associação definitiva	Possível associação
Aminorex	Cocaína
Benfluorex	Fenilpropanolamina
Desatinibe	L-triptofano
Dexfenfluramina	Erva-de-São-João
Fenfluramina	Anfetaminas
Metanfetaminas	Interferon- α e - β
Óleo de canola tóxico	Antineoplásicos
	Bosutinibe
	Agentes antivirais de ação direta contra o vírus da hepatite C
	Leflunomida
	Indirrubina

No Brasil, há uma grande lacuna em relação a epidemiologia da HAP. Segundo informações da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, no ano de 2022, aproximadamente 100.000 brasileiros apresentavam a doença. Dos 26 estados brasileiros, apenas 13 (mais o Distrito Federal) possuem centros de referência para o acompanhamento da doença e suporte aos pacientes. Esse quadro, associado ao difícil diagnóstico, dificultam a obtenção de dados nacionais que caracterizem a população doente, além da elaboração de protocolos de tratamento levando em consideração as particularidades do nosso povo (Lapa et al, 2016).

Por último, ao falarmos sobre a epidemiologia da HAP, não podemos ignorar um evento recente: a pandemia de COVID-19. Pesquisadores observaram que amostras de pulmão e artéria pulmonar de alguns pacientes que vieram a óbito por conta da COVID-19 apresentaram espessamento de parede, microtrombose pulmonar, danos vasculares e ao DNA, além de inflamação e disfunção mitocondrial; todas essas, características semelhantes às observadas na HAP. Porém, apesar desses achados, não há ainda estudos clínicos/epidemiológicos de grande escala que possam confirmar essa associação (Suzuki et al., 2021; D. Wang et al., 2023).

2.1.2. Fisiopatologia

Mesmo com avanços nos estudos acerca da fisiopatologia da HAP, ainda não se sabe quais mecanismos são fundamentais para desencadear a doença. Dentre os

principais, temos o remodelamento vascular e a disfunção endotelial, o remodelamento ventricular, os mediadores inflamatórios, as alterações na função mitocondrial e a disfunção em canais iônicos (Huertas et al., 2017).

2.1.1.1. Remodelamento vascular e disfunção endotelial

Em sua anatomia, os vasos pulmonares se distribuem em circuitos conectados em paralelo, que contribuem para suas baixas resistências, pressão e alto fluxo sanguíneo. Na HAP, diferentes alterações – principalmente histológicas – ocorrem de acordo com o tipo e a função de cada um desses vasos, o que faz com que alguns autores a considerem uma “pan-vasculopatia”. São afetados, principalmente, as artérias distais do pulmão, as arteríolas pré-capilares e os capilares em si (Shah et al., 2022; Tobal et al., 2021; Townsley, 2012).

Nas artérias musculares distais, o remodelamento vascular ocorre em suas três camadas – íntima, média e adventícia – tendo a hipertrofia como principal característica (Figura 1); também há expansão da matriz extracelular (MEC), levando a fibrose vascular (Thenappan, Chan, et al., 2018). A camada adventícia, normalmente, é composta por um tecido conectivo que reveste as artérias pulmonares. Nele, está contido o arcabouço para a MEC, formado por fibroblastos, vasos linfáticos, sangue, além de células do sistema imune; essa composição torna a camada adventícia a mais complexa entre as três, sendo considerada um “centro processador”, capaz de estabelecer comunicação entre outras células adventícias e células de tecidos vizinhos (Stenmark et al., 2013; Tobal et al., 2021). Na HAP, acredita-se que os principais responsáveis pelo remodelamento dessa camada sejam os fibroblastos adventícios. Responsáveis pela homeostase da MEC, quando em situações de estresse celular, como a hipóxia ou lesões de estiramento, esses fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, que alteram as propriedades da parede vascular, levando, por exemplo, a alterações na expressão de proteínas da matriz, como elastina, colágeno e fibronectina. Essas alterações podem causar um espessamento dessa camada, que se torna até quatro vezes maior que um vaso sadio. Apesar desse remodelamento não afetar de forma direta a RVP, ele tem papel importante na inflamação vascular e suas consequências (Tobal et al., 2021; Tuder, 2017; A. Wang et al., 2021).

Ainda nas artérias distais, a camada média é predominantemente composta por células musculares lisas, que contém proteínas reguladas por cálcio, capazes de controlar o tônus vascular. Em condições que propiciem essas células a funcionar de forma inadequada, mudanças no mecanismo contrátil são comuns, podendo levar a vasoconstricções persistentes – características na HAP. Também, as alterações impostas pela HAP induzem as células musculares lisas a produzirem maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias e aumentarem o depósito de proteínas estruturais, levando a um intenso remodelamento dessa camada, que pode aumentar sua espessura em até 20% (Stenmark et al., 2018; A. Wang & Valdez-Jasso, 2021).

Já a camada íntima é composta unicamente por células endoteliais, assim como os capilares. Na HAP, essa camada pode atingir até três vezes o seu tamanho normal em espessura, aumentando de forma bastante significativa a RVP. Esse espessamento pode ocorrer de diferentes formas, como por excesso na produção de colágeno, aumento da expressão de células semelhantes a fibroblastos ou por uma proliferação exacerbada das próprias células endoteliais; essa última é a principal responsável pelo aparecimento das lesões do tipo plexiforme, características de HAP avançada (Pietra et al., 2004; Tobal et al., 2021; Tudor, 2017). Estudos também mostram que outro fator responsável por esse quadro é a sensibilidade aos estímulos inflamatórios, que levam a proliferação e migração de fenótipos celulares resistentes a apoptose, assim como infiltrados inflamatórios perivasculares, contendo macrófagos, linfócitos B e T, mastócitos e células dendríticas, contribuindo ainda mais para o remodelamento observado (Huertas et al., 2014; Rabinovitch et al., 2014; Savai et al., 2012; Tara Elizabeth Scott et al., 2018).

As lesões plexiformes observadas na HAP são um importante marcador de severidade e progressão da doença, além de contribuir para a sua patogênese. Essas lesões se localizam nas artérias pulmonares pré e intra acinares, em locais que podem variar, mas geralmente em uma ramificação arterial. Morfologicamente, são caracterizadas por uma proliferação focal de “canais” na camada endotelial, revestidos de células musculares lisas, miofibroblastos e tecido conjuntivo, com fibrina e plaquetas em seu interior; ainda, as células endoteliais presentes na lesão plexiforme são capazes de expressar altos níveis de fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) e seu receptor VEGFR-2 (receptor de fator de crescimento endotelial vascular 2). Isso mostra que essas lesões podem ter sua origem devido a um processo

“desorganizado” de angiogênese (Ohta-Ogo et al., 2012; Pietra et al., 2004; Ranchoux et al., 2018).

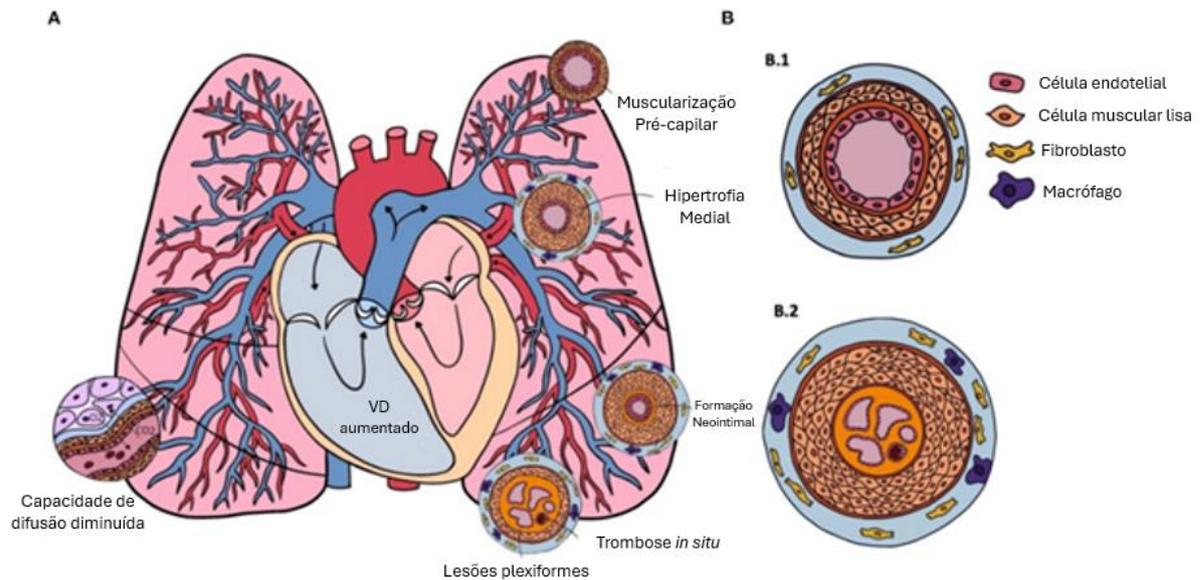


Figura 1. Remodelamento vascular observado na HAP. Em (A), esquema do sistema cardiopulmonar na HAP e as diferentes formas de remodelamento vascular. Em (B), representativo de secções transversais de artérias normotensas (B.1) e no estágio final da HAP (B.2). Do interior para o exterior: múltiplos canais formados por capilares, característicos das lesões plexiformes, com trombose *in situ*, espessamento da camada íntima, proliferação de células musculares lisas arteriais pulmonares na camada média e infiltrado de fibroblastos e macrófagos na camada adventícia. Adaptado de Tobal et al, 2021

As células do endotélio funcionam como uma barreira semi-permeável no interior dos vasos, exercendo funções cruciais para a homeostase da vasculatura pulmonar, como regulação das trocas gasosas e do tráfego leucocitário, modulação do crescimento e diferenciação celular, da resposta às lesões e do tônus vascular. Dessa forma, a disfunção do endotelial se torna um dos fatores mais importantes na patogênese da HAP (Hudson & Farkas, 2021; Shah et al., 2022).

Por muito tempo, o termo ‘disfunção endotelial’ se referia apenas ao aumento da produção de substâncias vasoconstritoras, como a endotelina-1 (ET-1), tromboxano A₂ (TXA₂), serotonina e angiotensina II em detrimento da produção de substâncias vasodilatadoras, como o óxido nítrico (NO) e as prostaciclina (PGI₂). Porém, nos últimos anos, esse conceito se tornou mais amplo e abrangente, passando a incluir outras alterações importantes relacionadas a função do endotélio, como o crescimento de células musculares lisas e hipertrofia da camada média,

anormalidades metabólicas, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), redução da capacidade anticoagulante, aumento da expressão de moléculas de adesão e liberação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Cober et al., 2022; Kurakula et al., 2021).

Na HAP, diversos são os fatores que contribuem para a disfunção endotelial (Figura 2). Porém, não se sabe ainda, ao certo, a cronologia em que essas mudanças ocorrem, se são a causa ou a consequência (Evans et al., 2021). Dentre esses fatores, podemos incluir alterações epigenéticas, como a do gene *BMPR-2* (do inglês, *bone morphogenic type 2 receptor*). Esse gene é responsável pela modulação do crescimento celular, apoptose e inflamação; nos vasos pulmonares, além de atuar como um fator antiproliferativo para as células musculares lisas, é o responsável pela sobrevivência das células endoteliais. Localiza-se no *locus* do cromossomo 2q33, e estudos mostram que mutações associadas a perda de função no gene *BMPR-2* aparecem em até 80% dos casos de HAP hereditária e 20% dos casos de HAP idiopática (tabela 3); também foi observado que a deficiência nesse gene pode levar a perda do controle de danos do DNA e a diminuição na expressão de β -cateninas, necessárias a estrutura das células endoteliais (Frump et al., 2018; Kurakula et al., 2021; Orriols et al., 2017; Pousada et al., 2017).

Tabela 3. Exemplos de mutações identificadas como patogênicas/provavelmente patogênicas, associadas ao gene *BMPR-2* na HAP

Localização	Nucleotídeo trocado	Aminoácido trocado	Categoria da mutação
Exon 4	c.439C>T	p.Arg147Ter	<i>Nonsense</i>
Exon 6	c.710G>A	p.Arg237His	<i>Missense</i>
Exon 11	c.1472G>A	p.Arg491Gln	<i>Missense</i>
Exon 12	c.2695C>T	p.Arg899Ter	<i>Nonsense</i>

A trombose e a hipercoagulação sanguínea também são outras duas características da HAP que influenciam na disfunção endotelial. Alguns fatores de coagulação, como a trombina e o fator tecidual, tem seus níveis de expressão aumentados, estimulando a ativação da cascata de coagulação (característica de lesão no endotélio). A ativação dessa cascata, ao passo que contribui para a disfunção endotelial, leva a formação de coágulos de fibrina – que estreitam e obstruem o lúmen

vascular – podendo também levar ao remodelamento vascular, contribuindo para a formação das lesões plexiformes (Johnson et al., 2006; White et al., 2007).

Ainda, as células endoteliais também apresentam um fenótipo metabólico diferenciado, quando na HAP, muito similar ao de células cancerígenas. Essa mudança no metabolismo leva ao aumento da expressão de algumas enzimas, como a piruvato desidrogenase mitocondrial, diminuindo o potencial apoptótico das células do endotélio e contribuindo para a sua disfunção (Boucherat et al., 2017).

Outro fator que contribui para a disfunção endotelial é o processo inflamatório. O aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , é capaz de diminuir a expressão do gene BMPR-2, causando os danos nas células endoteliais já mencionados acima. Além disso, também há aumento na produção de outras citocinas, como IL-6 e IL-8, onde a última é responsável por estimular a produção de ET-1 (Hurst et al., 2017; Veyssier-Belot & Cacoub, 1999).

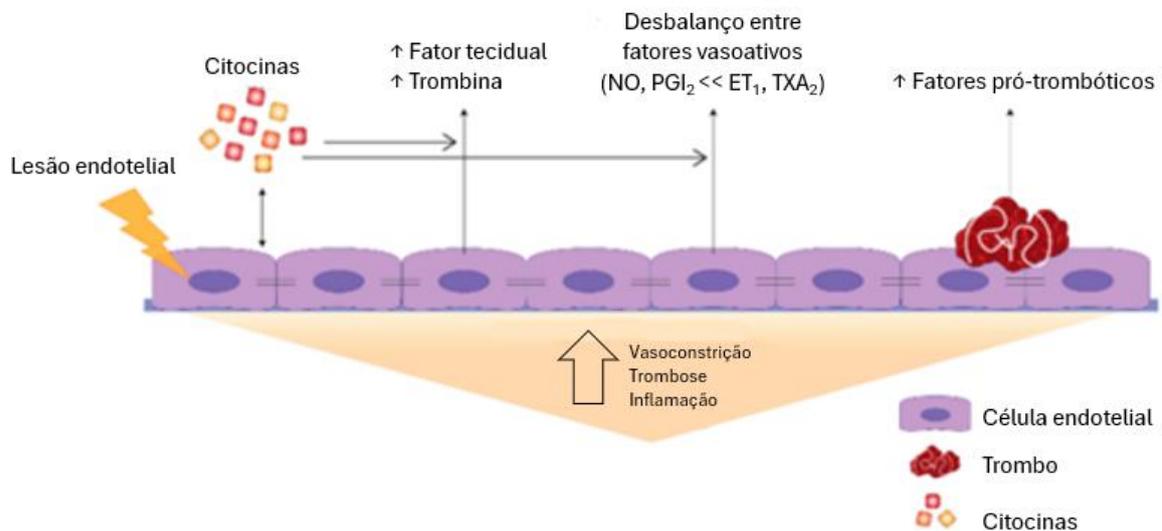


Figura 2. Disfunção endotelial na HAP. Principais características da disfunção endotelial, associadas ao desbalanço entre vasoconstritores e vasodilatadores, perfil inflamatório e pró-trombótico. Adaptado de Kurakula et al, 2021.

Junto com a disfunção endotelial, a inflamação tem recebido especial atenção pelos pesquisadores, já que ela aparece em todas as formas de HAP levando, principalmente, ao remodelamento vascular e as alterações hemodinâmicas (tanto em humanos quanto em modelos experimentais). Em pulmões de pacientes com HAP

submetidos à biópsia, nos locais próximos aos vasos pulmonares já remodelados pela doença, várias linhagens de células inflamatórias são detectadas, como citocinas, quimiocinas, mastócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, linfócitos B e T e autoanticorpos (Figura 3) (Hu et al., 2020; Rabinovitch et al., 2014).

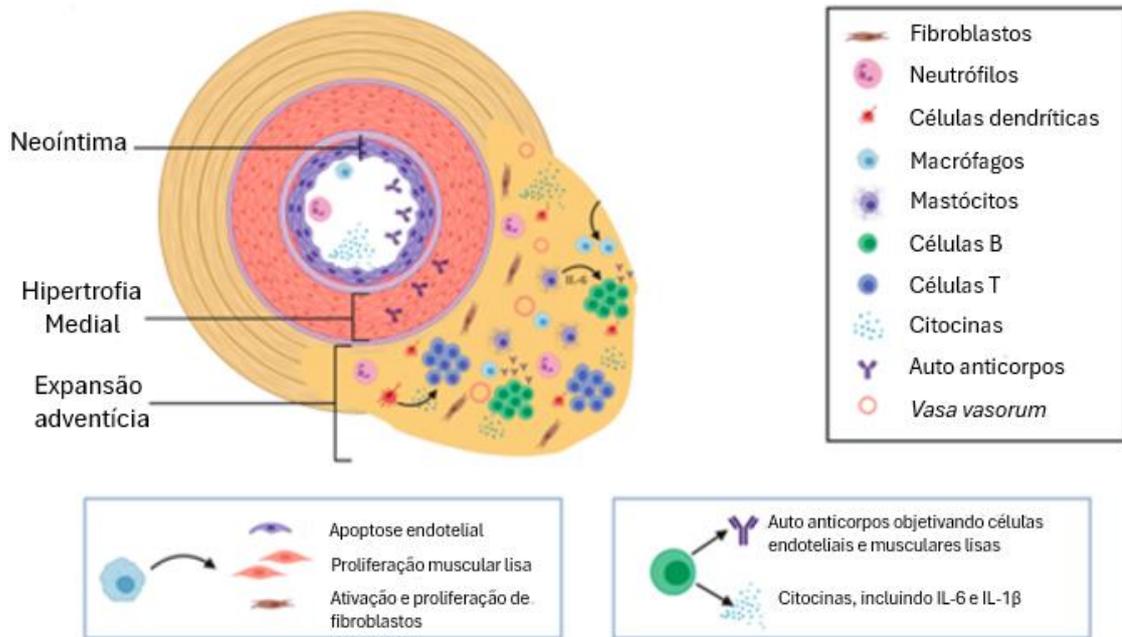


Figura 3. Alterações vasculares promovidas pelos mediadores inflamatórios. As lesões vasculares encontradas na HAP surgem em um micro-ambiente com inflamação excessiva. Em cada camada alterada, encontramos mediadores que são recrutados pelas citocinas e quimiocinas secretadas, principalmente, pelos fibroblastos adventícios. Adaptado de Hu et al, 2020.

O processo inflamatório se correlaciona fortemente com o sistema imune na HAP pelo fato de muitas de suas formas se associarem, no mesmo grupo (grupo 1), através de distúrbios autoimunes. Como exemplo, temos a infecção por HIV, o lúpus eritematoso e a esclerose sistêmica. (Rabinovitch et al., 2014; Savai et al., 2012).

Quanto as citocinas inflamatórias, além da IL-6 e IL-8 já mencionadas, também são encontrados nos pacientes elevados níveis de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α e proteína C reativa (PCR), responsáveis por potencializar a contratilidade e a proliferação das células vasculares; já as quimiocinas, que regulam o recrutamento e tráfego leucocitário, também tem seus níveis aumentados, em especial CCL2, CCL5 e CXCL1 (Thenappan, Ormiston, et al., 2018). Em pacientes, os níveis de IL-1 β , IL-6, TNF- α e PCR são os principais marcadores de lesão tecidual, indicando a

severidade/progressão da HAP, assim como de predição à resposta terapêutica (Price et al., 2012) .

Outra característica importante é que, na artéria pulmonar, as células endoteliais, junto com o potencial de membrana das células musculares lisas, são os responsáveis pelo tônus da vasculatura. Esse potencial de membrana, assim como a homeostase intracelular, é regulado por estruturas permeáveis e seletivas na membrana da célula: os canais iônicos. A maioria das disfunções observadas na HAP podem ser originadas por meio de alterações na fisiologia e na expressão desses canais (Lambert et al., 2018; Ranchoux et al., 2018).

Nas células da circulação pulmonar, uma das famílias de canais mais importantes é a dos canais de Ca^{2+} . Esse íon exerce um importante controle sobre o tônus, e o aumento de sua concentração no interior das células musculares lisas estimula a vasoconstrição e a proliferação celular. Os canais envolvidos nesses mecanismos são os de Ca^{2+} tipo L e Ca^{2+} tipo T ativados por voltagem (VGCCs), respectivamente (Santos-Gomes et al., 2022). Na HAP, os canais de Ca^{2+} tipo T tem sua função alterada pela atividade da fosfatase 2A (PP2A), que promove a ativação de ERK1 e p38, ativando a AKT1, modulando o ciclo celular e garantindo a proliferação células e resistência a apoptose no músculo liso (Sankhe et al., 2017). Ainda, estudos com modelo experimental animal de HP induzida por hipóxia crônica, revelaram um aumento na expressão dos canais de Ca^{2+} tipo L, corroborando com o aumento da vasoconstrição característica; da mesma forma, o bloqueio dos canais de Ca^{2+} tipo T levou a uma atenuação do remodelamento observado (Wan et al., 2013).

Outro canal importante na fisiopatologia da HAP é o canal receptor de potencial transitório, especialmente da subfamília 4 (TRPC4). Em células endoteliais disfuncionais de artéria pulmonar, sua ativação aumenta a frequência dos transientes de Ca^{2+} , estimulando maior expressão de genes que codificam para fatores que induzem proliferação e migração celular, como a ET-1, VEGF e tromboxano (Liu et al., 2012). O *knockout* desse mesmo canal em ratos com HAP induzida por Sugen5416 + hipóxia conferiu maior taxa de sobrevivência dos animais com HAP severa, diminuindo o número e a densidade das lesões vasculares, além da manutenção do débito cardíaco (Francis et al., 2016).

Uma grande família de canais que também se associa fortemente a HAP é a dos canais de K^+ sensíveis à voltagem (K_v), responsáveis por manter o potencial de repouso das células, regulando a viabilidade celular e o tônus vascular. Vários são os tipos de K_v expressos na vasculatura pulmonar, porém, para a fisiopatologia da HAP, um dos mais importantes é o $K_v1.5$, codificado pelo gene *KCNA 5*, que tem sua expressão diminuída. Com isso, a redução das correntes de K^+ nas células musculares lisas das arteríolas pulmonares – vasos onde o canal é mais expresso –, despolariza o potencial de membrana, favorecendo a abertura de canais de Ca^{2+} tipo L, dependentes de voltagem. O influxo de Ca^{2+} nas células musculares lisas estimula a liberação de mais Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, elevando a concentração desse íon no meio intracelular e induzindo a vasoconstrição por meio da interação Ca^{2+} /calmodulina (Redel-Traub et al., 2022; Ribeuz et al., 2020).

Outro canal de K^+ com significativa importância na HAP é o TASK1, codificado pelo gene *KCNK3*. Mutações nesse gene aumentam a predisposição ao desenvolvimento da doença, por promover modificações no potencial de repouso da célula (Boucherat et al., 2015). Além dos canais de K^+ já citados, podemos encontrar na vasculatura pulmonar os canais de K^+ ativados por Ca^{2+} e voltagem, de baixa condutância (SK), condutância intermediária (IK) e alta condutância (BK). A ativação desses canais hiperpolariza a membrana celular, promovendo a síntese de NO as células endoteliais e desativando canais de Ca^{2+} tipo L nas células musculares lisas, o que leva à vasodilatação e redução da resistência vascular. Por isso, são importantes moduladores do tônus vascular. Na HAP, a ativação desses canais, especialmente o BK, leva a importantes melhorias funcionais, como a redução da pressão arterial pulmonar e do remodelamento vascular. (Lambert et al., 2018; Ranchoux et al., 2018).

2.1.1.2. Remodelamento ventricular direito

Em um indivíduo saudável, o ventrículo direito (VD) é uma estrutura com formato semicircular, semelhante a uma “meia-lua”, que apresenta parede mais fina quando comparado ao ventrículo esquerdo (VE) (Sanz et al., 2019). Na HAP, por conta do remodelamento vascular ocorrido, há elevação da RVP, gerando aumento da pós-carga. Como resposta, é desencadeado um mecanismo compensatório, onde os

miócitos cardíacos do VD expandem seu tamanho – por hipertrofia – com o objetivo de aumentar a contratilidade e sustentar a função cardíaca de forma normal. Ou seja, esse primeiro processo de hipertrofia é necessário para compensar o aumento da RVP, caso contrário, o fluxo de sangue diminuiria. (Schermyly et al., 2011; Vonk Noordegraaf et al., 2022).

Essa adaptação a qual o VD é submetido envolve um complexo mecanismo de remodelamento ventricular (Figura 4), dependente de vários fatores, como a perfusão coronariana, o metabolismo cardíaco, a inflamação, a ativação do sistema neuro-hormonal, alterações genéticas, além do grau de acometimento da vasculatura pulmonar pela HAP (Vonk-Noordegraaf et al., 2013).

Com base nas características morfológicas, o remodelamento do VD pode ser classificado em adaptativo ou mal adaptativo. O primeiro é caracterizado por uma hipertrofia concêntrica, ou seja, um padrão onde o VD consegue manter a sua forma, o débito cardíaco e preservar as funções sistólica e diastólica, já que há um mínimo estágio de fibrose. Conforme a HAP progride e o miócitos do VD são submetidos a maior estresse, esse remodelamento evolui para o mal adaptativo, caracterizado por fibrose excessiva – levando a uma hipertrofia excêntrica – débito cardíaco diminuído, rigidez diastólica, além de danos no acoplamento excitação-contração dos miócitos. Esse quadro leva a disfunção e insuficiência ventricular direita, a principal causa de óbito na HAP (Badagliacca et al., 2015; Prisco et al., 2020; Vonk-Noordegraaf et al., 2013) .

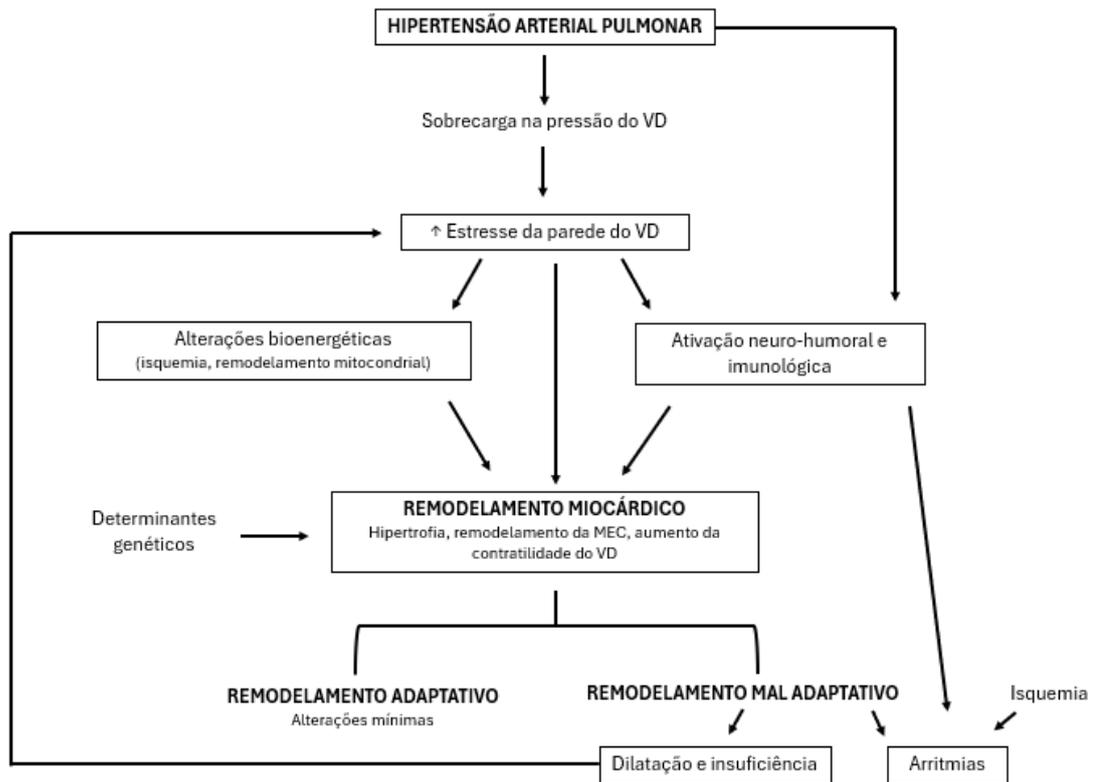


Figura 4. Disfunção ventricular direita na HAP. O remodelamento do VD causado pela HAP ocorre por meio de fatores como o aumento do estresse de parede, inflamação e ativação do sistema neuro-hormonal. O remodelamento adaptativo é caracterizado por mínimas alterações ventriculares, enquanto a sua progressão para mal adaptativo contribui para a insuficiência da estrutura. Modificado de Vonk-Noordegraaf, et al, 2013

Apesar disso, o mecanismo pelo qual o remodelamento ventricular direito passa de adaptativo para mal adaptativo ainda não foi bem esclarecido, podendo ter como principais causas os fatores genéticos e neuro-hormonais. O primeiro, parece se relacionar com o BMPR-2; já o segundo, se relaciona a maior estimulação simpática e do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Van Der Bruggen et al., 2017).

A insuficiência ventricular direita provocada pelo remodelamento mal adaptativo também se associa a isquemia do VD. A partir dela, é normal que ocorra redução na pressão de perfusão da artéria coronária direita, diminuindo o fluxo coronariano. Mesmo com mecanismos que trabalhem para compensar a diminuição nos níveis de oxigênio (como redução da contratilidade e possível “remodelação metabólica”, com aumento de enzimas glicolíticas anaeróbicas. Apesar de menos eficiente, essa via é capaz de poupar oxigênio), o aumento progressivo da pós-carga reduz o gradiente de perfusão sistólico, diminuindo a perfusão da coronária direita (Ryan et al., 2015; Thenappan, Ormiston, et al., 2018). SANZ et al, 2019.

Nos modelos experimentais, o remodelamento ventricular direito também é bem observado. No modelo de HAP induzido por MCT em ratos, a causa dos óbitos dos animais doentes é a falência do VD. Nesses casos, o remodelamento ventricular se associa a redução da capacidade funcional e, algumas vezes, a congestão pulmonar (Antigny et al., 2020).

2.1.1.3. Disfunção mitocondrial

Em todas as células eucarióticas, a mitocôndria é uma organela intracelular composta por duas membranas: uma interna e outra externa, que encapsulam o espaço intermembranar e os compartimentos da matriz. Essa organela está intimamente relacionada com o metabolismo energético das células, atuando como uma grande “casa de força” celular (Nunnari & Suomalainen, 2012). Além de ser responsável pela produção de ATP, via fosforilação oxidativa, a mitocôndria também é responsável pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), como um subproduto da respiração celular. Ambos se correlacionam por meio da cadeia transportadora de elétrons (CTE) (Nolfi-Donagan et al., 2020).

A CTE é composta por quatro complexos proteicos integrados: complexo I (NADH:ubiquinona-oxidorreductase), complexo II (succinato desidrogenase), complexo III (citocromo c oxidorreductase) e complexo IV (citocromo c oxidase); além dos complexos, também há dois carreadores de elétrons: ubiquinona (coenzima Q) e citocromo c solúvel. Toda cadeia se localiza na membrana interna da mitocôndria, próxima a matriz mitocondrial; mais especificamente, próxima ao local onde ocorre o Ciclo de Krebs. Isso, porque para iniciar a produção de ATP, a CTE depende de substratos que são originados nesse ciclo, como NADH e succinato, por exemplo (Guan et al., 2022; Vercellino & Sazanov, 2022)

O NADH doa elétrons ao complexo I, enquanto o succinato, ao complexo II. Os elétrons doados a ambos complexos são transferidos para a ubiquinona, que é reduzida a ubiquinol (QH₂); o QH₂, então, é oxidado pelo complexo III, permitindo que esses elétrons sejam transportados, pelo citocromo c, ao complexo IV. Nele, o oxigênio é o aceptor final dos elétrons, sendo reduzido a água. Para cada elétron transferido ao citocromo c, assim como para cada molécula de oxigênio reduzida a água, prótons são bombeados da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar;

esse movimento de prótons é denominado força próton-motriz, caracterizado pela concentração de prótons (pH) mais seu gradiente eletroquímico, resultando no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$). Esse potencial se dissipa, com o gradiente de prótons explorado pela ATP sintase (também chamada de complexo V), convertendo ADP em ATP e gerando a principal moeda energética da célula (Mitchell, 1961; Nolfi-Donagan et al., 2020; Vercellino & Sazanov, 2022) .

Além do ATP, a CTE também fornece um grande auxílio na produção de ROS, com estudos mostrando os complexos I e III como principais fontes geradoras de superóxido e peróxido de hidrogênio. Ambas possuem importantes papéis na regulação de processos relacionados a sinalização celular, como a ativação da guanilato ciclase (sGC) e formação de cGMP. Apesar disso, em altas concentrações, a produção de ROS leva ao estresse oxidativo, que pode gerar diversos efeitos deletérios à célula (Brand, 2016; Dröge, 2002; Mazat et al., 2020).

A mitocôndria também exerce outros importantes papéis no metabolismo celular, regulando, por exemplo, a apoptose e a homeostase de Ca^{+2} . A captação desse íon pela mitocôndria ocorre por um uniportador de cálcio, impulsionado pelo $\Delta\Psi$, favorável a moléculas carregadas positivamente. Apesar de possuir alta capacidade de armazenamento ao Ca^{+2} , a regulação de importantes mecanismos metabólicos mitocondriais, como a síntese de ATP, só ocorre em pequenas concentrações do íon; em altas concentrações, o Ca^{+2} é capaz de romper com a integridade da célula, resultando em diversas condições patológicas (Garbincius & Elrod, 2022; Walkon et al., 2022).

O aumento na captação do Ca^{+2} pode estimular a abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (PTPM), não-seletivo, dependente de Ca^{+2} e de alta condutância. Essa abertura aumenta a permeabilidade da membrana interna da mitocôndria, permitindo a passagem de água, íons e outras moléculas até 1,5 kDa para a matriz mitocondrial. Essa entrada promove a expansão do volume da mitocôndria, e como a superfície de sua membrana interna é maior que a externa, isso pode acarretar no rompimento dessa última, liberando fatores pró-apoptóticos para o citoplasma da célula. Além disso, também ocorre diminuição do transporte de elétrons pela CTE, com redução da fosforilação oxidativa (Carraro & Bernardi, 2023; Kowaltowski et al., 2019).

Além disso, na mitocôndria também são encontrados diferentes canais iônicos, como os permeáveis ao cálcio, ao cloreto e ao potássio. Dentre esses últimos, encontramos também os canais BK_{Ca}. Os canais BK_{Ca} mitocondriais (mitoBK_{Ca}) cardíacos foram identificados na membrana interna da mitocôndria, mas não no sarcolema, com características biofísicas e farmacológicas semelhantes às dos canais vasculares. (Frankenreiter et al., 2017; Soltysinska et al., 2014; Szteyn & Singh, 2020). Quando aberto, o canal mitoBK_{Ca} gera o influxo de K⁺ para a matriz mitocondrial, causando despolarização e, portanto, diminuição do potencial transmembrana, que diminui o Ca²⁺ mitocondrial, reduzindo a formação de ROS em condições de hipóxia/reoxigenação (Soltysinska et al., 2014).

Dos mecanismos que levam à disfunção mitocondrial, muitos podem estar envolvidos na patogênese da HAP, inclusive por se interconectarem entre si, como alterações no potencial de membrana mitocondrial, disfunção da cadeia transportadora de elétrons, aumento na produção de ROS, danos ao DNA mitocondrial, entre outros (Figura 5) (Rafikova et al., 2018). Essas alterações metabólicas são capazes de modificar as respostas inflamatória e imune além do remodelamento tecidual. Nos vasos pulmonares, as mitocôndrias são uma grande fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS), atuando também como sensores de O₂ quando em situação de hipóxia. Por esses motivos, as mitocôndrias tem se tornado um importante alvo de pesquisas relacionadas à HAP (Riou et al., 2023; Zhang et al., 2022).

Na HAP, com os danos mitocondriais gerados que incapacitam uma produção adequada de ATP pela cadeia transportadora de elétrons – principalmente na artéria pulmonar e VD – essas células reprogramam seu metabolismo energético para a via glicolítica, de forma muito similar àquela descrita por Otto Warburg (1956) para o desenvolvimento do câncer. O efeito Warburg (ou glicólise aeróbica) como é chamado, caracteriza o fenômeno em que as células convertem a glicose em ácido láctico, mesmo na presença de oxigênio, diferente de células metabolicamente normais. Essa reprogramação, ativada por uma hiper expressão do fator indutor de hipóxia (HIF-1 α), é capaz de poupar oxigênio, além de promover a hiperpolarização da membrana mitocondrial, garantindo a proliferação e resistência a apoptose nas células afetadas, contribuindo para os remodelamentos vascular e ventricular direito. (Boucherat et al., 2017; Dasgupta et al., 2020; Schermuly et al., 2011).

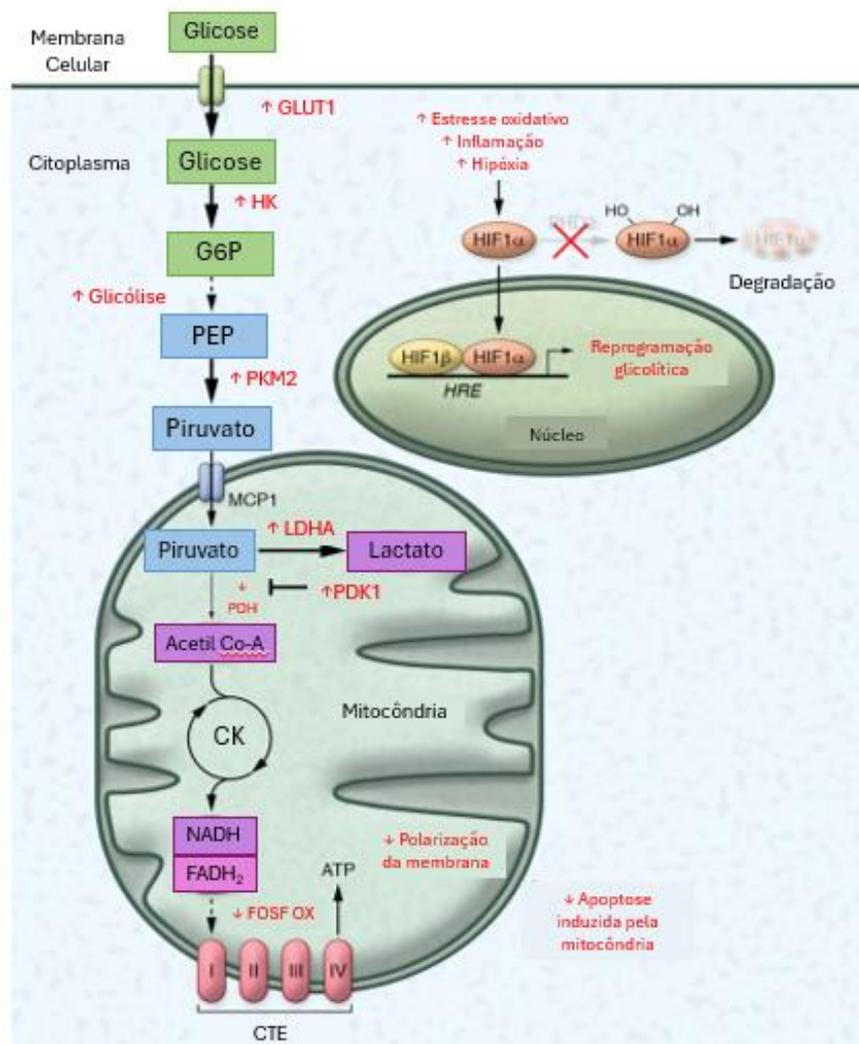


Figura 5. Principais vias metabólicas envolvidas na patogênese da HAP. As mitocôndrias das células da vasculatura pulmonar e ventrículo direito apresentam diminuição na fosforilação oxidativa e aumento na glicólise (efeito Walburg). Seguida de diminuição na capacidade respiratória, o aumento na expressão e estabilização do HIF1 α medeia uma reprogramação glicolítica compensatória, que inclui aumento na expressão do transportador de glicose 1 (GLUT1); hexoquinase (HK), que promove a conversão da glicose em glicose-6-fosfato (G6P); e a lactato desidrogenase (LDHA), responsável por converter o piruvato em ácido láctico. Ao mesmo tempo, há aumento na atividade da piruvato quinase M2 (PKM2), diminuindo a produção de piruvato pela fosfoenolpiruvato (PEP), e redução na atividade da piruvato desidrogenase (PDH), gerada pelas quinases piruvato desidrogenase (PDK1). O efeito Walburg promove sobrevivência celular e proliferação, com simultânea hiperpolarização do potencial de membrana mitocondrial, levando a redução de sua capacidade apoptótica. Essas mudanças levam ao remodelamento e ao aumento da resistência vascular pulmonar. CTE = cadeia transportadora de elétrons; HRE = elemento responsivo a hipóxia. Adaptado de Culley & Chan, 2018.

2.1.3. Tratamento

Até 2004, apenas duas classes de medicamentos eram utilizadas no tratamento da HAP: os derivados da prostaciclina e antagonistas para o receptor de ET-1, associados a bloqueadores de canais de Ca²⁺. Atualmente, existem cinco classes de

medicamentos, que atuam em três principais vias, que são as da prostaciclina, da ET-1 e do NO/cGMP (Figura 6). Apesar de ainda serem poucos os medicamentos aprovados pela FDA, eles aumentam a taxa de sobrevivência dos pacientes em pelo menos 5 anos, evoluindo de 34% (1991) para mais de 60% (2015) (Ruopp & Cockrill, 2022; Vazquez & Klinger, 2020).

Os análogos das prostaciclina e agonistas para seu receptor (epoprostenol e selexipag, respectivamente) atuam inibindo a proliferação de células endoteliais, a agregação plaquetária e estimulam a vasodilatação (Humbert et al., 2004); os antagonistas dos receptores de ET-1 (bosentana, ambrisentana) bloqueiam a via, permitindo também a vasodilatação (Humbert et al., 2004); já os inibidores da fosfodiesterase-5 (iPDE5), como a sildenafil e tadalafila, diminuem o metabolismo do cGMP, potencializando a ação do NO. Nessa via, também podem ser utilizados estimuladores da guanilato ciclase solúvel (sGC), como o riociguate, promovendo o mesmo mecanismo final de ação: vasodilatação (Vazquez & Klinger, 2020).

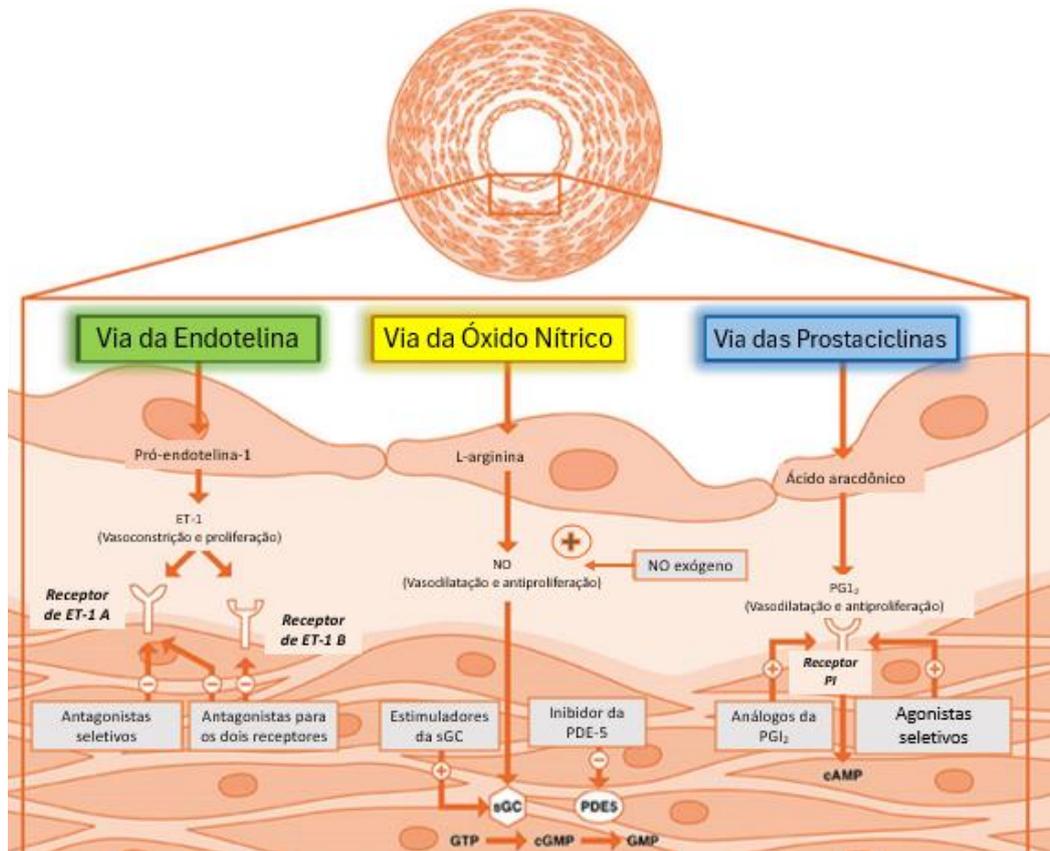


Figura 6. Principais vias de sinalização alvo na HAP. Antagonistas de receptores de ET-1 inibem esta via, que está exacerbada na HAP, reduzindo o tônus vascular e a proliferação celular. O NO, que está menos biodisponível na HAP, estimula a guanilato ciclase solúvel (sGC) a sintetizar cGMP, que promove vasodilatação e seus efeitos antiproliferativos. Os níveis de cGMP também aumentam com a inibição da fosfodiesterase-5 (PDE-5), enzima que o degrada, ou estimulando a sGC. As prostaciclina

estimulam a produção de cAMP, que promove vasodilatação e efeitos antiproliferativos. Esta via pode ser estimulada usando análogos de prostaciclina. Adaptado de Vazquez & Klinger, 2020.

Além da terapia medicamentosa, outra alternativa de tratamento é o transplante de pulmão. Apesar de efetivo, a dificuldade em obter doadores, assim como a probabilidade de rejeição do órgão, tornam-na uma opção extremamente limitada.

Mesmo com o aumento na sobrevivência dos pacientes, a taxa de mortalidade associada à HAP ainda é elevada, o que abre uma lacuna sobre as opções medicamentosas atuais, que atuam apenas no relaxamento dos vasos. Assim, a modulação dos canais de K⁺, responsáveis pelo remodelamento vascular, se torna um importante alvo terapêutico a ser estudado (Lambert et al., 2018; Redel-Traub et al., 2022).

2.1.4. Modelo Experimental para estudo da HAP

Em estudos sobre HAP com modelos animais (ratos), o agente indutor frequentemente utilizado – há mais de meio século – é a monocrotalina (MCT). Isso se dá por seu baixo custo (comparado a outros modelos), alta reprodutibilidade e facilidade técnica (Stenmark et al., 2009).

A MCT é um alcalóide pirrolizidínico, encontrado especialmente em sementes da espécie *Crotalaria spectabilis* (Figura 9). Sua metabolização ocorre no fígado, por reação dependente do citocromo P-450; só então a MCT é convertida em seu metabólito tóxico: a monocrotalina pirrol (MCTP), também chamada de dehidromonocrotalina. O mecanismo de ação toxicológico da MCTP ainda não foi totalmente esclarecido, mas há indícios de que interfira na síntese de DNA e atue inibindo a NADH oxidase do complexo I da cadeia respiratória dos hepatócitos (Gomez-Arroyo et al., 2012; Mingatto et al., 2007).

Em relação ao tecido pulmonar, embora o tempo de meia vida da MCTP seja bem curto (aproximadamente 4 segundos), acredita-se que a toxicidade se dê por seu acúmulo dentro das hemácias, facilitando o transporte para a circulação pulmonar, causando os danos em nível vascular (Wilson et al., 1992).

Essas alterações se iniciam a partir da injeção de uma única dose da MCT (em geral, 60 mg/kg), levando a elevação da mPAP, hipertrofia e disfunção ventricular direita, com o óbito do animal em 4-6 semanas (Figura 10). A MCT é capaz de induzir disfunção endotelial, edema intersticial, vasoconstrição, infiltrados inflamatórios

perivasculares e secreção de citocinas, seguidos por progressiva hipertrofia da camada média e fibrose adventícia. Além dessas alterações, também é observado, assim como em humanos com HAP, mudanças no metabolismo da via glicolítica, redução na expressão de BMPR2 e aumento na produção de fatores de crescimento (Boucherat et al., 2022; N. S. Hill et al., 2017; Rafikova et al., 2016).

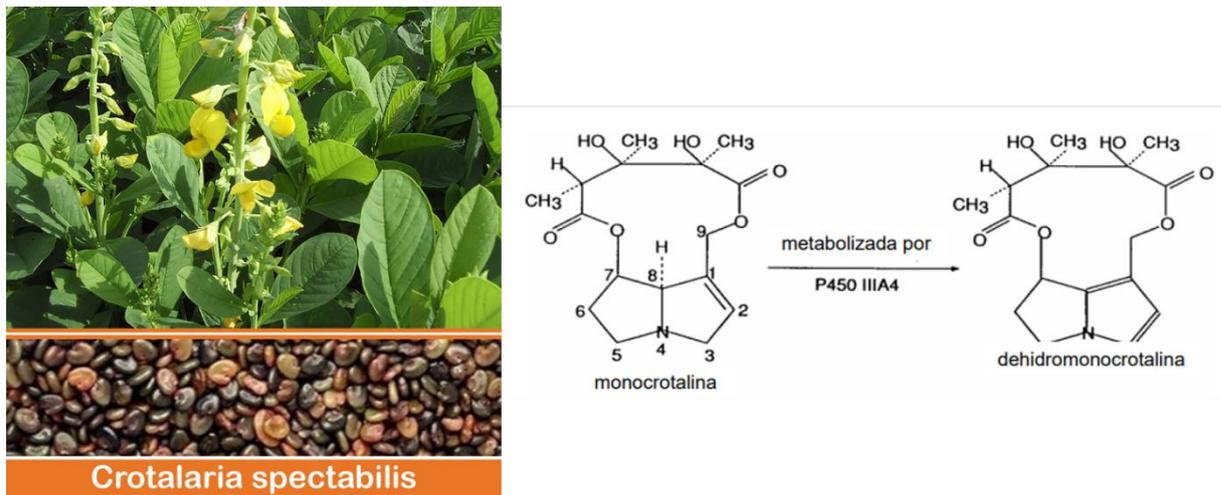


Figura 7. Planta do gênero *Crotalaria spectabilis*, estrutura química da monocrotalina e de seu metabólito ativo, dehidromonocrotalina.

Mesmo com a capacidade de induzir a HAP de modo severo, o modelo de MCT não reproduz as lesões plexiformes características da doença em humanos. Para tal, é necessária a associação de outras técnicas ao modelo, como exposição a hipóxia crônica ou pneumonectomia esquerda (Boucherat et al., 2022).

Ainda assim, o modelo de HAP induzido por MCT continua sendo uma importante ferramenta de estudo sobre a doença, especialmente no que tange ao remodelamento vascular e ventricular direita, e sua patogênese.

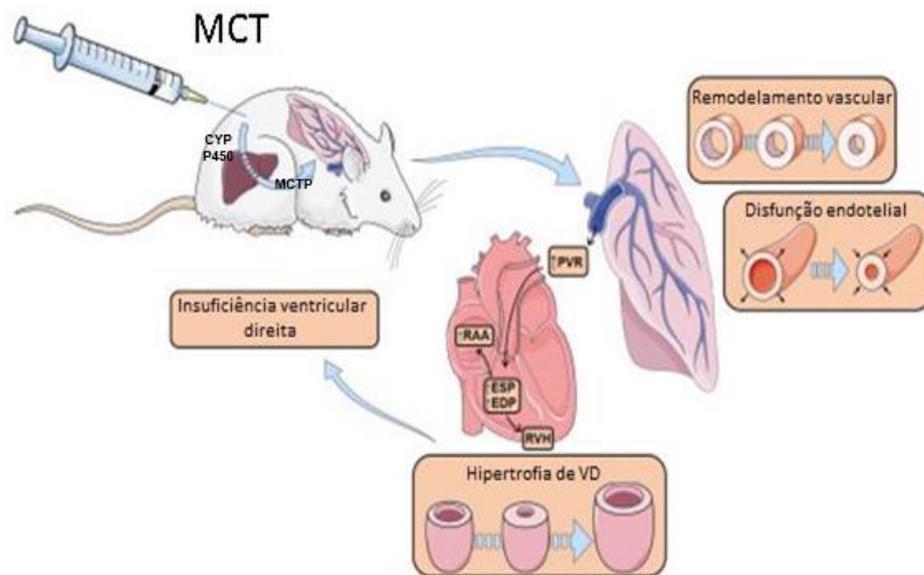


Figura 8. Esquema ilustrativo do metabolismo da MCT em modelo experimental. Ao ser injetado no rato, a MCT é metabolizada no fígado, pela ação do citocromo P450 (CYP 450), e transformada no seu metabólito ativo, MTCP, que produz injúria endotelial vascular pulmonar, contribuindo para o quadro de vasculite, seguido por desenvolvimento progressivo da HAP, com conseqüente hipertrofia e insuficiência do VD. PVR= resistência vascular pulmonar; RAA= Área atrial direita; ESP= pressão sistólica final do VD; EDP= pressão diastólica final do VD; RVH= hipertrofia do VD.

2.2. O CANAL BK_{Ca} COMO ALVO TERAPÊUTICO

O canal BK_{Ca} , também chamado Maxi-K, Slo1 ou $K_{Ca1.1}$, integra a família dos canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} e a voltagem, com alta condutância. Em humanos, ele é codificado pelo gene *KCNMA1*, que origina as subunidades α do canal. Estruturalmente, o canal BK_{Ca} se apresenta como um homotetrâmero, composto por quatro subunidades α , mais duas subunidades regulatórias, β e γ . Cada subunidade α possui sete segmentos transmembrana (S0-S6), que se dividem em dois domínios principais: o sensível à voltagem (VSD) e o C-terminal intracelular (CTD). No primeiro, está o segmento S4 que, carregado positivamente, atua como sensor de voltagem; o segundo domínio é composto pelos segmentos S7-S10, que contém duas regiões de regulação de condutância, sensíveis ao Ca^{2+} (RCK1 e RCK2). Além deles, ainda há uma porção N-terminal extracelular e um outro domínio, formador do poro (PGD), composto pelos segmentos S5 e S6, responsável pela seletividade do canal ao K^+ (Figura 7) (Butler et al., 1993; Meera et al., 1997).

Das subunidades regulatórias, a β_1 é caracteristicamente expressa nas células musculares lisas vasculares, modulando as propriedades biofísicas e farmacológicas dos canais BK_{Ca} dessas regiões. Por exemplo, elas são capazes de aumentar a

sensibilidade do canal ao Ca^{2+} em concentrações micromolares, a controlar o potencial de membrana e a contratilidade das células musculares lisas arteriais, além de modularem os níveis de pressão (Leo et al., 2014). A subunidade γ_1 possui características funcionais semelhantes a β_1 , contribuindo também na regulação da sensibilidade ao Ca^{2+} e a voltagem (Evanson et al., 2014).

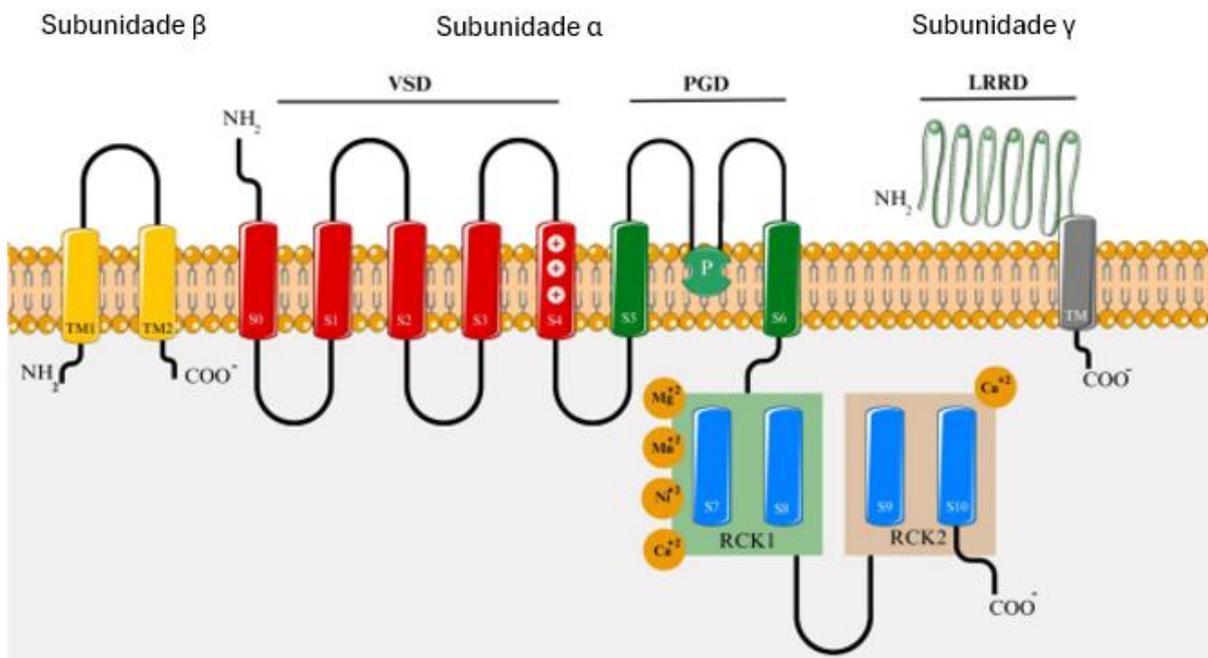


Figura 9. Representação esquemática do canal BKCa. Cada subunidade α é formada por sete segmentos transmembrana (S0-S6), com a porção S4 sendo o sensor de voltagem (VSD) e as porções S5 e S6 responsáveis pela formação do poro seletivo ao K^+ (PGD). Duas regiões de regulação da condutância, onde o Ca^{2+} se liga, se localizam na extremidade intracelular (RCK1 e RCK2). A subunidade β é composta por dois segmentos transmembrana (TM1 e TM2), com ambas regiões N- e C-terminais intracelulares. A subunidade γ é composta por um segmento transmembrana (TM), com um domínio rico em leucina (LRRD) na porção extracelular (Marins et al., 2023).

Sendo um dos canais mais expressos nas células musculares lisas vasculares, alterações no BK_{Ca} podem promover importantes modificações no tônus miogênico. O canal tem sua localização próxima aos receptores de rianodina (RyR), ou seja, quando ocorrem as ondas de liberação de Ca^{2+} , esse íon estimula a abertura de canais BK_{Ca} , gerando efluxo de K^+ e hiperpolarização das membranas dessas células. Isso leva a desativação dos canais de Ca^{2+} tipo L, diminuindo a concentração do Ca^{2+} sarcoplasmático, promovendo a vasodilatação (Figura 10). Esse mecanismo de atuação do canal é confirmado na presença de iberiotoxina (IbTx), um bloqueador seletivo para o canal BK_{Ca} , pois a vasodilatação induzida pelo ativador de canal BK_{Ca}

não é observada, acontecendo o oposto, vasoconstrição vascular (Galvez et al., 1990; Tanaka et al., 2004).

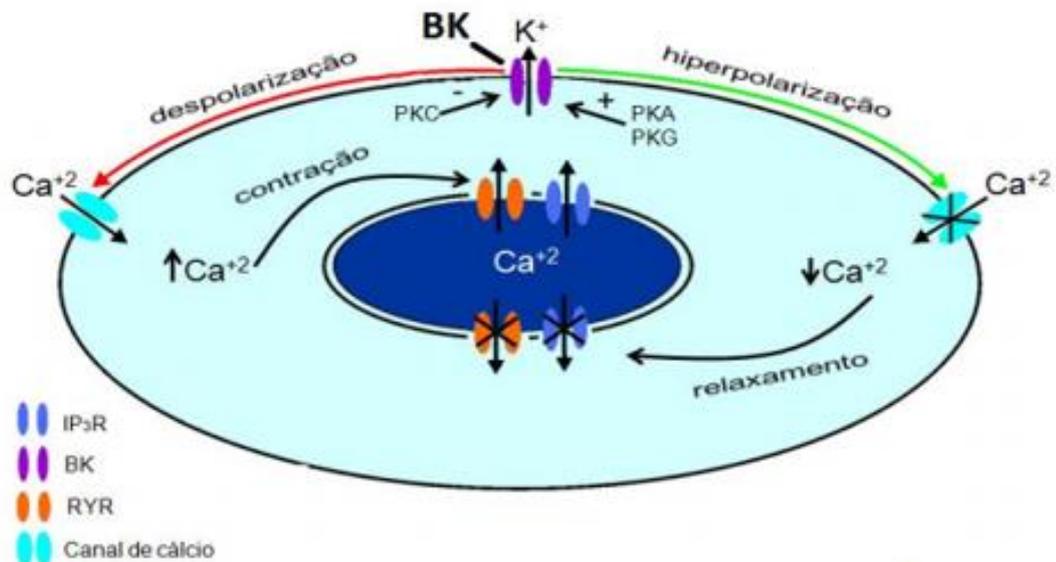


Figura 10. Esquema representativo do canal BKCa na célula muscular lisa (sobre a regulação da concentração de cálcio intracelular e do tônus miogênico através do controle do potencial de membrana em miócitos vasculares). A ativação do canal BK promove a hiperpolarização da membrana (seta verde) e leva o fechamento dos canais de cálcio sensíveis a voltagem, favorecendo o relaxamento do músculo liso. De forma contrária o bloqueio do canal BKCa induz a despolarização (seta vermelha) abrindo os canais de cálcio, contribuindo para a contração muscular, uma vez que o cálcio regula a atividade de miofibrilas responsáveis pela geração de força. Modificada de Jaggar et al., 2000.

Por estar intimamente ligado à regulação vasomotora, não surpreende a associação do canal BKCa vascular com doenças de cunho hipertensivo, como a HAP. Muitos fatores característicos da progressão da HAP podem diminuir a sensibilidade do canal ao Ca^{2+} , assim como também podem diminuir a sua probabilidade de abertura, ou reduzir a sua expressão celular. Na HAP, em células da vasculatura pulmonar, onde o canal BKCa está disfuncional, é observado aumento do tônus vascular e da RVP. Além disso, essa disfunção contribui para que a resposta vascular a vasodilatadores liberados pelo endotélio, como o NO, também seja reduzida, potencializando a vasoconstrição (Bonnet et al., 2003; Peinado et al., 2008).

Já na mitocôndria, o mitoBKCa foi originalmente descrito nos mitoplastos de células de glioma humano (Siemen et al., 1999), sendo posteriormente identificado em outros tecidos, como miócitos ventriculares e células endoteliais humanas. O mitoBKCa cardíaco tem sua subunidade principal, α , codificada pelo mesmo gene do canal BKCa presente na membrana plasmática (KCNMA1), o que confere a ele a

mesma capacidade de ser responsivo ao Ca^{+2} e a voltagem (com pequenas diferenças, como a probabilidade de abertura, que nos canais plasmáticos, é um pouco menor). Além disso, também possui uma subunidade regulatória $\beta 1$, enquanto a presença de uma subunidade γ ainda não é bem conhecida (Balderas et al., 2015).

Farmacologicamente, o mitoBK_{Ca} também possui propriedades semelhantes aos canais BK_{Ca} vasculares. Ambos podem ser bloqueados por iberiotoxina (IbTx), caribdotoxina (ChTx) e paxilina (todos específicos para o canal), assim como sua abertura pode ser estimulada pelo NS1619, uma das benzimidazolonas mais comumente estudadas, e frequentemente utilizada como agonista para o canal (Li & Gao, 2016; Nardi & Olesen, 2008).

A subunidade $\beta 1$ do mitoBK_{Ca} interage diretamente com a citocromo c oxidase, revelando a associação do canal com um componente da CTE e sua importância na regulação das funções mitocondriais (OHYA et al, 2005; LI; GAO, 2016). Além dessa localização, estudos já mostraram que em canais mitoBK_{Ca} ventriculares de camundongos *knockout* para a subunidade α , a fosforilação oxidativa se mostrava atenuada, tanto em situações de normóxia, como de hipóxia/reoxigenação. Também, a ausência do canal aumentou significativamente a produção de ROS em mitocôndrias de cardiomiócitos (Soltysinska et al., 2014). Outra característica do mitoBK_{Ca} é a sua capacidade em regular a captação de Ca^{+2} pelas mitocôndrias, dificultando o mecanismo de apoptose; isso sugere seu envolvimento em modular a abertura do PTPM (Szteyn & Singh, 2020).

Assim, nos canais BK_{Ca}, fatores que possam aumentar a atividade ou estimular a abertura do canal BK_{Ca}, tornam-no uma opção interessante para o tratamento de patologias, como a HAP. Em modelos experimentais da doença, moduladores como o esteroide adrenal deidroepiandrosterona (DHEA), o ômega 3 poliinsaturado (DHA) e o NS1619 já foram utilizados como possível tratamento. Todos se mostraram eficientes em reduzir o remodelamento vascular, assim como a mPAP (Bentzen et al., 2014; Dumas De La Roque et al., 2013; Revermann et al., 2014; Ying Zhong et al., 2018). Importante ressaltar que a NS1619, além de minimizar os danos causados pela HAP (em modelo experimental) também promoveu cardioproteção às mitocôndrias cardíacas isoladas expostas e isquemia/reperfusão (Xu et al., 2002).

Por isso a importância de estudos em busca de outros ativadores de canal BK_{Ca} que, além de apresentarem seletividade e potência, possuam o mínimo possível de efeitos adversos.

2.3. ATIVADORES DO CANAL BK_{Ca}

O canal BK_{Ca} apresenta importante função na modulação do tônus vascular, assim como o mitoBK_{Ca} atua regulando as concentrações de ROS, NO e Ca⁺², principais responsáveis pela manutenção da função endotelial (Szewczyk et al., 2015). Embora o canal seja alvo de muitos estudos, o que reforça seu protagonismo frente a diversas condições patológicas, poucas substâncias chegaram a ensaios clínicos, a exemplo da NS8, BMS204352, BMS223131 e TA1702. Todas tiveram seus respectivos estudos descontinuados, visto a baixa eficácia e efeitos adversos (Nardi & Olesen, 2008).

Essas limitações se devem, em grande parte, a pequena quantidade de estudos de alto rendimento. Aliado a isso, há a ampla expressão do canal em diferentes tecidos, excitáveis e não excitáveis, o que abre portas para efeitos adversos indesejados, além da falta de seletividade e/ou potência. Dos muitos ativadores já testados, especialmente em modelos experimentais de HAP, alguns se destacam, como o 17β-estradiol, DHEA, DHA (endógenos), DHS-I (natural) e as benzimidazolonas desenvolvidas pela NeuroSearch Biotechnology Company, como a NS1619 (sintética) (Barenco-Marins et al., 2023).

O 17β-estradiol é um esteroide, sendo o principal hormônio sexual feminino. Estudos sugerem sua capacidade em modular as subunidades α e β do canal BK_{Ca}, aumentando sua probabilidade de abertura e acelerando a cinética de corrente (Valverde et al., 1999). Também, a interação entre a molécula e a subunidade β ativou um mecanismo cardioprotetor em mulheres, especialmente àquelas em idade pós-menopausa (Ohya et al., 2005). Ainda, na HAP induzida por MCT, o 17β-estradiol foi capaz de melhorar a disfunção ventricular direita, dificultando a transição entre hipertrofia adaptativa e mal adaptativa. Porém, nesse contexto, a função do canal BK_{Ca} ainda não foi descrita (Frump et al., 2018; Tofovic et al., 2005).

Em relação ao DHEA, sua maior sensibilidade está em ativar canais BK_{Ca} cujas subunidades regulatórias sejam a β2 ou β4 (King et al., 2006). Em células da

musculatura lisa vascular, o canal também foi ativado pelo DHEA, porém, em concentrações 5 vezes maiores (Farrukh et al., 1998). Apesar disso, em modelos experimentais de HP, o DHEA reduziu a mPAP e a proliferação celular, melhorando o remodelamento vascular (Dumas De La Roque et al., 2013; Farrukh et al., 1998). O DHEA também já foi utilizado em um estudo piloto com pacientes portadores de HP, onde se observou melhora da mPAP, da resistência vascular pulmonar e de testes de esforço (caminhada de 6 minutos) após 3 meses de tratamento, sem alterar pressões sistólica e diastólica sistêmicas. Apesar desses dados levarem o DHEA à fase 1 de um ensaio clínico controlado, a administração de esteroides pode desencadear efeitos androgênicos/estrogênicos adversos e, por isso, precisa ser feita com cautela (Dumas de La Roque et al., 2012; Walsh et al., 2021).

O DHA também se mostrou capaz de ativar o canal BK_{Ca} , aumentando sua probabilidade de abertura em células da musculatura lisa vascular (Hoshi et al., 2013). De forma interessante, em pacientes com HP, o baixo de nível de DHA circulante pode ser um marcador para o grau de severidade da doença; apesar disso, o mecanismo como isso ocorre ainda não está bem estabelecido (Huai et al., 2021). Mesmo melhorando diversos parâmetros relacionados a HP em diferentes modelos experimentais, o DHA apresenta características conflitantes, como o fato de depender de fatores derivados do endotélio para ativar o canal BK_{Ca} . (Chen et al., 2018; Nagaraj et al., 2016).

Já o DHS-I (dehidrosoiasaponina-I) é um terpeno de origem natural, derivado da espécie *Desmodium adscendens*. Essa substância é capaz de se ligar a subunidade $\beta 1$ do canal BK_{Ca} , aumentando sua probabilidade de abertura e modulando sua sensibilidade ao Ca^{+2} e a voltagem. Apesar dessas características, seu efeito somente ocorre quando aplicado diretamente na superfície interna da membrana das células musculares (Giangiacomo et al., 1998).

Por fim, as benzimidazonas, especialmente as da família NS (NeuroSearch) são as substâncias sintéticas com maior número de estudos relacionados a ativação do canal BK_{Ca} . Dentre elas, se destaca a NS1619 (1-(2'-hydroxy-5'-trifluoromethylphenyl)-5-trifluoromethyl-2(3H)benzimidazolone) (Neurosearch, 1993). Na HAP induzida por MCT, a NS1619 melhorou de forma significativa as disfunções causadas pelo modelo, além de promover efeito antiproliferativo em células da vasculatura pulmonar (McCullough et al., 2014). Ainda, no mito BK_{Ca} cardíaco, a NS1619 proporcionou cardioproteção às mitocôndrias isoladas expostas a

isquemia/reperfusão (Xu et al., 2002). A NS1619 se liga a subunidade α do canal BK_{Ca} , alterando seu limiar de ativação para valores mais negativos, aumentando assim, o tempo e a frequência de abertura do canal em potenciais mais despolarizados; porém esse mecanismo, que faz a NS1619 promover vasodilatação, é atribuído ao bloqueio dos canais de Ca^{2+} tipo L, com consequente redução na concentração do Ca^{2+} presente no retículo sarcoplasmático e inibição da SERCA (Edwards et al., 1994; Olesen et al., 1994).

Em 2012, por meio de um *screening* de alta capacidade com mais de 1,6 milhões de moléculas, Ponte e colaboradores caracterizaram química-, farmacológica- e eletrofisiologicamente um grupo de ativadores do canal BK_{Ca} pertencentes à classe das tetrahydroquinolinas. A substância **X**, como foi identificada, é uma mistura racêmica, composta por seus dois enantiômeros, denominados **Y** [(3aR,4S,9bS)-4-(naphthalen-1-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinoline-8-carboxylic acid] e **Z** [(3aS,4R,9bR)-4-(naphthalen-1-yl)-3a,4,5,9btetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinoline-8-carboxylic acid] (Ponte et al., 2012). Apesar de outras tetrahydroquinolinas com capacidade para ativar canais BK_{Ca} já terem sido identificadas, características como mecanismos de ação, assim como seletividade e possíveis efeitos adversos ainda são pouco conhecidos (Gore et al., 2010).

O estudo *in vitro* utilizando células CHO e sondas fluorescentes para potencial de membrana, experimentos de *whole cell* e diferentes preparações de músculo liso (anéis de aorta e tiras do detrusor da bexiga) mostraram que os dois enantiômeros possuem potências diferentes, sendo o **Z** até trinta vezes mais potente que o **Y** (o efeito do **Y** pode ser considerado um “contaminante”, já que para visualizá-lo, são necessárias concentrações bem elevadas da mistura, o que não ocorre com o **Z**) (Ponte et al., 2012).

Além disso, o estudo também demonstrou que, na ausência da subunidade $\beta 1$, a tetrahydroquinolina aumentou a atividade do canal, tornando-o interessante frente a patologias associadas a mutação/deleção da subunidade (como asma e hipertensão). Também, a substância altera a sensibilidade do canal à voltagem, permitindo sua abertura em potenciais mais negativos, onde outros ativadores (seletivos e potentes) não conseguiriam. No mais, a substância não modula outros canais de K^+ , como o K_{ATP} , assim como não bloqueia canais de Ca^{2+} tipo L, atuando somente sobre os canais BK_{Ca} (Ponte et al., 2012).

Dessa forma, a substância X, e especialmente o enantiômero Z, se tornam potenciais fármacos de interesse para estudos envolvendo o tratamento de patologias que cursam com constrição vascular sustentada e remodelamento tecidual, como é o caso da HAP.

3. JUSTIFICATIVA

Mesmo com a melhora clínica observada nos pacientes com HAP nos últimos anos, as terapias atuais, além do alto custo, ainda são ineficientes. Isso se reflete nas altas taxas de morbidade e mortalidade associadas à doença. Por isso, é essencial a busca por novas estratégias terapêuticas, que busquem refinar o tratamento, principalmente, através da melhora do remodelamento vascular e de outros parâmetros, como a disfunção mitocondrial, que levam a insuficiência ventricular direita. Nesse contexto, a modulação do canal BK_{Ca} por ativadores potentes e seletivos surge como uma potencial estratégia terapêutica para a HAP.

Em trabalho prévio do nosso grupo, Ferraz e colaboradores (2020) mostraram que o tratamento com a substância X, por 14 dias, em ratos com HAP induzida por monocrotalina, foi eficiente em reduzir a mortalidade dos animais (100% de sobrevivência) e a pressão arterial pulmonar, bem como, melhorar a tolerância ao esforço e a resposta a estímulos vasodilatadores, entre outros parâmetros.

Assim, considerando que a substância X é uma mistura racêmica cujo efeito é majoritariamente dado pelo enantiômero Z (o efeito do Y só tem relevância em concentrações muito elevadas), esse trabalho se justifica pela necessidade de aprofundar o entendimento sobre a potencialidade desses ativadores de canais BK_{Ca} em modelo experimental que mimetizem os efeitos da HAP, a fim de caracterizar os canais BK_{Ca} cardíacos mitocondriais e da vasculatura pulmonar como alvos terapêuticos para esta doença.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial dos canais BK_{Ca} como alvo terapêutico na HAP, utilizando um potente e seletivo ativador de canais de potássio de alta condutância sensíveis ao cálcio (BK_{Ca}), tanto em modelo de HAP induzido por MCT quanto em mitocôndrias de cardiomiócitos isoladas.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar os efeitos do tratamento crônico com o ativador de canais BK_{Ca} (substância X) em ratos com HAP induzida por monocrotalina sobre:
 - a) Parâmetros biométricos;
 - b) Remodelamento ventricular direito e vascular pulmonar;
 - c) Remodelamento elétrico do ventrículo direito;
 - d) Hemodinâmica vascular pulmonar;
 - e) Reatividade e disfunção endotelial de artérias pulmonares;
 - f) Função mitocondrial;

- 2) Avaliar, *in vitro*, os efeitos do ativador de canal BK_{Ca} (substância X) sobre os parâmetros de função mitocondrial de corações de camundongos, em condições de normóxia e hipóxia/reoxigenação.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. ANIMAIS

Nos experimentos utilizando o modelo experimental de HAP induzida por MCT, foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, com massa corporal entre 200 e 300 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em biotério NB-2, em mini isoladores de polisulfona (termoplástico) forrados com maravalha, com ciclo claro-escuro de 12h/12h, temperatura controlada (23 °C-24 °C), além de ração e água à vontade. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética com Uso de Animais em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde (CEUA/CCS/UFRJ), sob os números 068/19 e 013/23.

Nos experimentos agudos com mitocôndrias isoladas foram utilizados camundongos C57BL/6 (*Mus musculus*) machos, com 4 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em biotério NB-2, em mini isoladores de polisulfona (termoplástico) forrados com maravalha, com ciclo claro-escuro de 12h/12h, temperatura controlada(23°C-24°C), além da ração e água à vontade. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética com Uso de Animais em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde (CEUA/CCS/UFRJ), sob o número 119/21.

5.2. REAGENTES

Bicarbonato de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de potássio, cloreto de sódio, fosfato de potássio, fosfato de sódio monoidratado, glicose, HEPES, hidróxido de sódio, Acetilcolina (ACh), Ácido 4-morfolino propanossulfônico (MOPS), ácido etileno-bis(oxietilenonitrilo)tetracético (EGTA), adenosina 5'-trifosfato (ATP), albumina sérica bovina (BSA), ascorbato, azida sódica, *Amplex™ Red Reagent*, *Calcium Green™-5N*, ciclosporina A (CSA), Carbonilcianeto 4-(trifluorometoxi)fenil-hidrazona (FCCP), monocrotalina (MCT), fenilefrina (PHE), glutamato, iberiotoxina (IbTx), malato, rotenona, succinato, nitroprussiato de sódio (SNP), sacarose e TRIS. Todos os reagentes foram adquiridos da MERCK/Sigma-Aldrich.

5.3. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

5.3.1. Grupos Experimentais

Neste estudo, 59 animais foram distribuídos randomicamente em 4 grupos experimentais:

- Ratos normotensos que receberam apenas solução salina (CTRL): n = 19
- Ratos hipertensos, com HAP induzida por monocrotalina (MCT): n = 21
- Ratos hipertensos, com HAP induzida por monocrotalina + tratamento com ativador do canal BK_{Ca} (MCT+αBK): n = 14
- Ratos normotensos que receberam tratamento com ativador do canal BK_{Ca} (CTRL+αBK): n = 5

5.3.2. Protocolo Experimental

Para o modelo experimental de HAP induzida por MCT, foram utilizados ratos Wistar machos, com peso inicial de 200-230 g. A hipertensão foi induzida através de uma dose única de monocrotalina (60 mg/kg), via intraperitoneal. Para a administração, a monocrotalina foi dissolvida em solução de HCL 1N, seguido de ajuste do pH para 7,4 com NaOH 1N, e diluição em solução salina de KH modificada.

Duas semanas após a administração da MCT, os animais dos grupos MCT+αBK e CTRL+αBK foram tratados com o ativador de canal BK_{Ca} (substância X) na dose de 28 mg/kg/dia, durante 14 dias consecutivos. A substância X foi dissolvida em DMSO, e depois diluída em solução salina (soro fisiológico), numa proporção de 1:4 (20% DMSO + 80% soro fisiológico).

Os animais dos grupos CTRL e MCT receberam a mistura de DMSO e soro fisiológico, na mesma proporção acima, como veículo. Em todos os grupos, a administração da substância X ou veículo foi feita via oral, por gavagem.

Durante o período experimental, os animais foram pesados semanalmente e o eletrocardiograma registrado a cada duas semanas. Após os 28 dias, foram analisadas a taxa de sobrevivência, parâmetros hemodinâmicos, índices biométricos e demais análises *in vitro* (Figura 11).

PROTOCOLO EXPERIMENTAL



EFEITOS DO TRATAMENTO COM O ATIVADOR DE CANAL BK_{Ca} NO MODELO DE HAP INDUZIDO POR MCT EM RATOS

Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, com massa corporal entre 200 e 300 g, provenientes do Biotério Central de Ratos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEUA/CCS/UFRJ 068/19 e 013/23).

Os animais foram distribuídos randomicamente em 4 grupos experimentais:

Ratos normotensos que receberam apenas solução salina (CTRL): n = 19

Ratos hipertensos, com HAP induzida por monocrotalina (MCT): n = 21

Ratos hipertensos, com HAP induzida por monocrotalina + tratamento com ativador do canal BK_{Ca} (MCT+ α BK): n = 14

Ratos normotensos que receberam tratamento com ativador do canal BK_{Ca} (CTRL+ α BK): n = 5

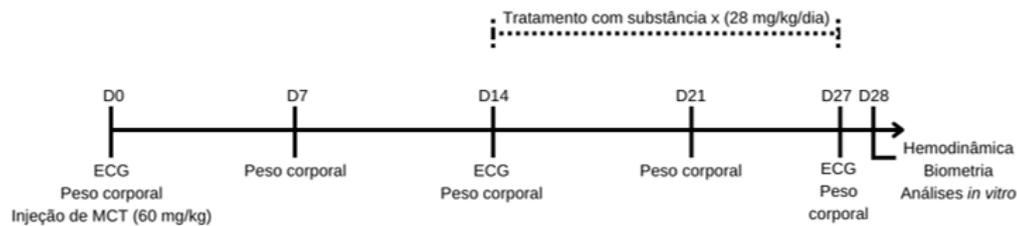


Figura 11. Protocolo experimental realizado durante 28 dias.

5.3.3. Avaliação eletrocardiográfica

O eletrocardiograma (ECG) *in vivo* foi registrado, uma vez a cada duas semanas, nos animais acordados, utilizando eletrodos subcutâneos previamente implantados na região torácica e membros posteriores, numa derivação análoga à DII do plano frontal.

Os eletrodos foram conectados a um amplificador diferencial (Model 1700, AM Systems, USA), onde os sinais eram amplificados e filtrados com frequência de corte passa-alta em 10 Hz e passa-baixa em 0,5 kHz, e digitalizados à frequência de amostragem de 1 kHz (intervalo 1000 μ s) pela interface analógica-digital DIGIDATA 1440A e programa Axoscope 10.

Para a obtenção do registro, o eletrodo positivo foi posicionado no membro posterior esquerdo, o eletrodo negativo no lado direito do tórax e o aterramento no membro posterior direito. Os registros foram armazenados digitalmente para posterior processamento e análise utilizando o programa AxoScope 10. O registro do ECG se iniciava após o período de ambientação do animal, necessário para minimizar os artefatos de movimento, e estabilização do sinal gerado. Os registros analisados tinham duração de 10 minutos (em ausência de ruídos).

Na análise do ECG, foram medidos a duração dos intervalos RR e QT (Figura 12). Dado que em muitas espécies a duração do intervalo QT é inversamente relacionada à média da frequência cardíaca, faz-se uso de equações para a correção do intervalo QT pela frequência cardíaca.

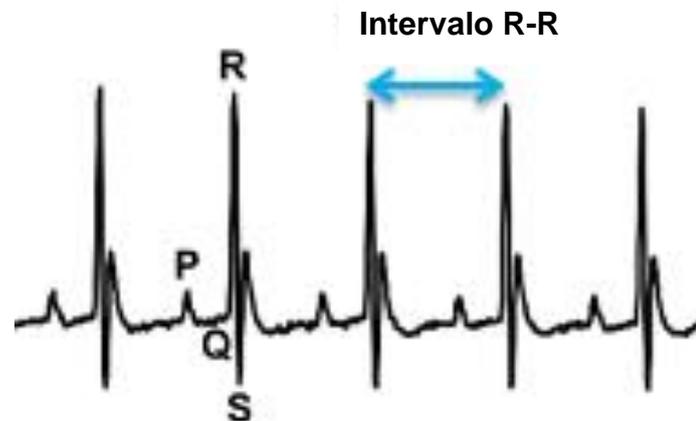


Figura 12. Ondas e intervalos do eletrocardiograma de roedor (ratos).

Neste estudo, a duração do intervalo QT corrigido (QTc) foi calculado pela equação de Bazett, onde os valores são dados em segundos, como mostra a equação abaixo: (MILL, 2012)

$$QTc = \frac{QT}{\sqrt{RR}}$$

5.3.4. Medida de pressão sanguínea

Para a medição dos parâmetros de pressão, os ratos foram anestesiados em atmosfera de oxigênio e isoflurano a 5% e mantidos a 3%. Em seguida, uma cânula de poliéster (p50) foi introduzida na veia jugular direita (dissecada cirurgicamente), até atingir a câmara ventricular direita. A cânula estava conectada a um transdutor de pressão ligado a um monitor fisiológico para obter o registro da pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD). Esta medição é feita desta forma porque a cateterização da artéria pulmonar para medida de pressão é um procedimento de difícil realização. Os registros foram adquiridos continuamente e os sinais analógicos foram digitalizados a

1000 Hz e armazenados no computador para posterior análise e determinação dos valores de pressão.

O monitoramento, armazenamento e análise dos sinais foram feitos utilizando o programa LabChart 7 Pro (AD Instruments Pty Ltd, Austrália).

5.3.5. Sobrevida

Todos os animais foram acompanhados durante o protocolo experimental e os óbitos foram registrados de acordo com o dia.

A curva de sobrevida dos animais foi obtida pelo método de Kaplan-Meier, utilizando o programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

5.3.6. Biometria

Os animais foram pesados em balança digital (Marte, A500), antes do início do protocolo experimental, e semanalmente, até a eutanásia. Após a eutanásia (decapitação por guilhotina) sob anestesia (isoflurano 1%), coração, pulmão e fígado foram removidos e pesados para a determinação do peso absoluto. Os pesos desses órgãos foram normalizados pelo comprimento da tíbia (medida com um paquímetro) para obtenção do peso relativo de cada órgão, sendo utilizados como índices de hipertrofia cardíaca, congestão pulmonar e congestão venosa, respectivamente. Após o coração ser removido e pesado, os átrios foram removidos e o coração foi separado em ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE) + septo interventricular. Em seguida, foram pesados separadamente para determinação da relação $VD/(VE+SEPTO)$, denominada de índice de Fulton, ou índice de hipertrofia do ventrículo direito.

5.4. EXPERIMENTOS IN VITRO

5.4.1. Obtenção do tecido

Após a eutanásia dos animais, como mencionado no item 5.3.5, e realizada a avaliação biométrica, fragmentos de VD, VE, pulmão e fígado foram cuidadosamente alocados em criotubos e armazenados a -80°C para análises moleculares

posteriores. Também, com o auxílio de pinças e tesouras cirúrgicas, foi removido o tronco da artéria pulmonar, transferindo-o para uma placa de Petri contendo a solução KH. A artéria era limpa e seccionada em anéis de 2 mm de comprimento para montagem no miógrafo.

5.4.2. Registro da atividade contrátil da artéria pulmonar

5.4.2.1. Sistema horizontal de registro de tensão isométrica

Para o registro da atividade da musculatura lisa pulmonar foi utilizado o miógrafo 620M (DMT, Dinamarca). Os transdutores de força estavam acoplados ao amplificador Octal Bridge Amplifier Fe228 (AD Instruments Pty Ltd, Austrália). As saídas do amplificador se conectavam a uma interface A/D (PowerLab 8/35, AD Instruments Pty Ltd, Austrália), que digitalizava os sinais, sob comando de um programa de aquisição e análise de sinais (LabChart 8, AD Instruments Pty Ltd, Austrália) instalado em um computador.

A calibração do sistema de força era feita semanalmente, utilizando um padrão de peso (1 g) disponibilizado pelo próprio fabricante do equipamento. Todos os protocolos foram testados para o controle com o volume máximo de DMSO utilizado para diluir a substância X em sua maior concentração (30 μ M) e não foram registradas diferenças significativas em relação ao controle sem solvente.

O miógrafo DMT utilizado, primeiramente desenvolvido por Mulvany e Halpern (1976) e com modificações posteriormente descritas por Mulvany (1988), permite o registro de tensão de vasos de até 60 μ m de diâmetro. Neste trabalho, foram utilizados anéis do tronco da artéria pulmonar, banhada em solução de Krebs-Henseleit (KH) modificada, contendo (em mM): 120 NaCl, 5 KCl, 1,2 NaH₂PO₄, 11 glicose, 1,1 MgCl₂, 15 NaHCO₃, 10 HEPES. Após o preparo, a solução tinha o pH ajustado para 7,4 utilizando NaOH, e adicionava-se 2,5 mM de CaCl₂. A solução foi, então, incubada a 37 °C e aerada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) durante todo o experimento.

O sistema DMT possui cubas com capacidade máxima para 10 mL de solução (nos experimentos foram utilizados 5 mL, para evitar extravasamento), e permite a regulação da temperatura, aeração com a mistura carbogênica e a troca de solução com auxílio de uma bomba de vácuo (Figura 13A). Além disso, possui duas

montagens removíveis para a fixação dos anéis, possibilitando a troca de configuração do miógrafo de acordo com o tecido a ser utilizado. Para a artéria pulmonar, a configuração utilizada era composta por duas hastes – uma móvel e outra fixa – que ficam submersas na solução experimental (Figura 13B), sendo possível tensionar o vaso com o auxílio de um micromanipulador, ligado a haste móvel, de forma alinhada e em escala micrométrica.

Para o tronco da artéria pulmonar, que é um modelo bem estabelecido no estudo da reatividade vascular para HAP, após a fixação do tecido na cuba experimental, uma tensão de 1 g de força é aplicada, sendo a mesma ajustada para 1 g toda vez que se percebe a queda da linha de base.

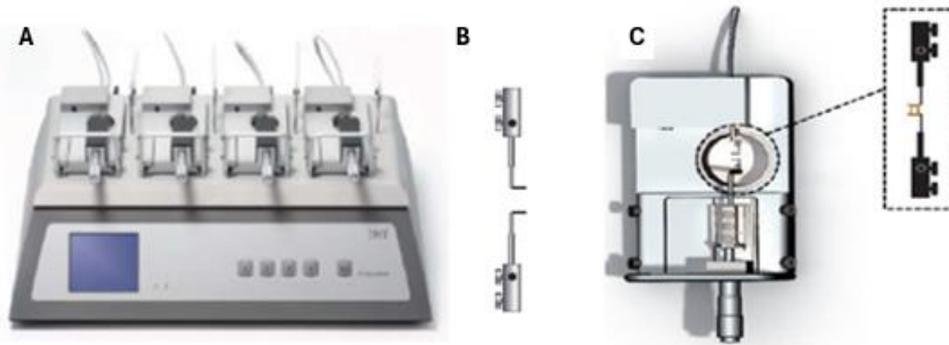


Figura 13. Sistema horizontal de tensão isométrica. Em **A**, Miógrafo de Mulvany, com 4 cubas, controle de temperatura à 37 °C, aeração e troca de solução por bomba à vácuo; em **B**, hastes removíveis para a montagem de vasos de maior calibre, como artéria pulmonar; em **C**, forma como os anéis dos vasos ficam fixados entre as hastes e são submersos na solução das cubas, tensionados por um micromanipulador.

Durante a primeira hora do experimento, para melhor acomodação do sistema contrátil do músculo liso e para avaliar a integridade do endotélio, é realizado um teste, com base em curvas de aumento de tensão, estimuladas com 1 μM de PHE (3 concentrações, com troca de solução a cada 5 minutos) e eficiência do endotélio, estimulada com 10 μM de ACh (1 concentração, 5 minutos após a aplicação da terceira dose de PHE). Após o protocolo para acomodação do sistema contrátil e o teste do endotélio, nos grupos CTRLs, apenas os anéis que relaxaram mais de 70% em resposta à ACh foram considerados com o endotélio intacto.

5.4.2.2. Construção das curvas de concentração x resposta

Para avaliar a atividade muscular da artéria pulmonar, três protocolos diferentes foram executados: **1)** a fenilefrina (PHE), uma substância simpaticomimética sintética com ação direta em receptores α_1 -adrenérgicos, foi aplicada na concentração de 1 μM para induzir contração. Alcançado o platô de resposta contrátil, concentrações crescentes (1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μM , 3 μM , 10 μM e 30 μM) de acetilcolina (ACh), foram aplicadas de forma consecutiva, com intervalos de aplicação de acordo com o tempo de estabilização do tecido para cada concentração. A ACh é um agente vasodilatador, considerado depende de endotélio. A ativação dos seus receptores (M2) promove a liberação de um fator relaxante derivado do endotélio – o NO – que se difunde rapidamente às células musculares lisas da vasculatura, ativando a sGC e estimulando a produção de cGMP, promovendo vasodilatação (Buchwalow et al., 2008; Furchgott & Zawadzki, 1980); **2)** após a pré-contração com PHE (1 μM) o relaxamento foi estimulado com concentrações crescentes (0,01 nM, 0,03 nM, 0,1 nM, 0,3 nM, 1 nM, 3 nM, 30 nM, 100 nM e 300 nM) de nitroprussiato de sódio (SNP), um agente vasodilatador de ação rápida, capaz de doar de óxido nítrico diretamente as células vasculares (Cobb & Thornton, 2018); **3)** após a pré-contração com 1 μM de PHE, o relaxamento foi induzido com concentrações crescentes (10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μM , 3 μM , 10 μM e 30 μM) da substância X, o ativador de canais BK_{Ca} . Entre um protocolo e outro, os vasos eram “lavados” (troca de solução) de 3 a 5 vezes, para remoção total das substâncias aplicadas. Um novo protocolo somente se iniciava quando, após a lavagem, o vaso retornava e estabilizava em sua linha de base inicial padrão.

Os resultados da atividade muscular lisa foram analisados utilizando o programa LabChart 8 (AD Instruments Pty Ltd, Austrália). A linha de base era considerada como “0%” e o platô gerado pelo vasoconstritor utilizado como “100%”, ou tensão máxima. A resposta vasodilatadora foi calculada como percentual da tensão máxima. O cálculo de IC_{50} foi feito utilizando o programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

5.4.3. Análise da função mitocondrial

5.4.3.1. Isolamento de mitocôndrias

O isolamento das mitocôndrias cardíacas foi feito por centrifugação diferencial, como descrito por Maciel e colaboradores (Maciel et al., 2020). Os corações isolados de rato ou camundongo foram rapidamente removidos e colocados em solução de isolamento gelada. Em seguida, foram bem picados com uma tesoura e homogeneizado com um homogeneizador de tecidos (Ultra-Turrax) usando dois ciclos de 10 s a uma taxa de rotação do eixo de 6.500 RPM. No homogenato foi acrescentada proteinase tipo XXIV (8 UI/mg de peso de tecido) utilizando um pilão de Teflon. Depois, o homogenato foi centrifugado a 700 G durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 14.000 G por 10 minutos. O pellet resultante foi ressuspensionado em solução de isolamento sem BSA e centrifugado a 10.000 G por 5 minutos a 4 °C. Este procedimento foi repetido e o sedimento ressuspensionado em solução de isolamento.

A concentração de proteínas no pellet isolado foi determinada usando um ensaio de proteína (método Lowry, Biorad, Hercules, CA, EUA) em comparação com um padrão BSA (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Esta metodologia foi usada para isolar a fração total de mitocôndrias do tecido cardíaco.

5.4.3.2. Soluções

Todas as soluções de uso no isolamento e ensaios com mitocôndrias foram preparadas na hora do experimento e filtradas em filtro Millipore de 1,2 µm.

- a) Solução de isolamento (em mM): 250 sacarose; 10 HEPES; 1 EGTA. Após o preparo, a solução teve o pH ajustado para 7,4 e armazenamento a 4 °C.
- b) Solução de isolamento + BSA: 250 mg BSA em 50 mL da solução de isolamento anterior.
- c) Solução eletrolítica (em g): 2.655 Na₂HPO₄, 1.3 KH₂PO₄, 0.52 KCl, 0,05 g NaN₃ e AgCl (alguns cristais, até saturar a solução) em 50 mL de água ultrapura. Armazenamento à 4 °C.
- d) Solução de Respiração (em mM): 125 KCl, 10 MOPS, 5 MgCl₂, 5 KH₂PO₄, 0,02 EGTA. pH 7,4 ajustado com Tris 0,5 M. Armazenada a 4°C.
- e) Solução de Respiração + glutamato/malato (em mM): a solução anterior adicionada com glutamato (5 mM) e malato (5 mM) como substrato para o complexo I.

- f) Solução de Respiração + succinato (em mM): a solução anterior adicionada com succinato (5 mM) como substrato para o complexo II.
- g) Solução para retenção de Ca^{2+} (em mM): 125 KCl; 10 MOPS; 5 MgCl_2 ; 5 KH_2PO_4 ; 5 glutamato e 5 malato. O pH da solução foi ajustado para 7,4 utilizando Tris 0,5 M, e posteriormente armazenada a 4 °C.
- h) Solução para recaptação de Ca^{2+} (em mM): 125 KCl, 10 MOPS, 2 MgCl_2 , 5 KH_2PO_4 , 5 glutamato (5 mM), 5 malato e 0,4 ADP.

5.4.3.3. Medida de consumo de O_2 mitocondrial

A respiração mitocondrial foi medida utilizando um eletrodo do tipo Clark (Strathkelvin, Glasgow, UK), em solução de respiração a 37 °C, com agitação magnética. Para a medida da respiração do complexo I, as mitocôndrias (100 μg) foram adicionadas em 1 mL da solução; após dois minutos, 1 mM de ADP foi adicionado, e a respiração do complexo I induzida por ADP foi medida por dois minutos. A respiração do complexo II induzida por ADP foi realizada na presença de rotenona (1 μM).

Posteriormente, as mitocôndrias também foram usadas para medir a respiração do complexo IV. A captação máxima de O_2 desacoplado na câmara de respiração ou na solução de respiração contendo as mitocôndrias foi feita para medir a produção de ATP ou a concentração de ROS mitocondriais, respectivamente. A respiração do complexo IV foi estimulada pela adição de N, N, N, N'-tetrametil-p-fenilenodiamina (TMPD, 300 μM) mais ascorbato (3 μM), que doa elétrons à citocromo oxidase, através da redução do citocromo C. O consumo máximo de O_2 desacoplado foi medido na presença de 30 nM de cianeto de carbonila-p-trifluorometoxifenil-hidrazona (FCCP).

5.4.3.4. Medida de consumo de O_2 mitocondrial em condições de normóxia e hipóxia/reoxigenação

A solução de respiração (sem glutamato, malato ou succinato) foi borbulhada com gás N_2 purificado até que a concentração de O_2 fosse inferior a 15 nM/ml^{-1} , para simular condições de hipóxia. As mitocôndrias (200 μg) foram adicionadas à 0,5 mL da solução hipóxica. Após oito minutos de hipóxia, a solução de respiração saturada com O_2 (0,5 mL) foi adicionada para reoxigenação, por dois minutos. O consumo de

O₂ foi medido após hipóxia/reoxigenação ou durante o período controle em normóxia (10 minutos). Foram administrados os substratos para o complexo I ou rotenona, e os substratos para o complexo II. Finalmente, as mitocôndrias foram usadas tanto para medir a respiração do complexo IV e a captação máxima de O₂ desacoplado, quanto para medir a concentração de ROS mitocondrial e produção de ATP.

- **Controle:** As mitocôndrias foram adicionadas a 0,5 mL de solução tampão oxigenada. Após oito minutos, foi adicionada solução de incubação saturada com O₂ (0,5 mL) durante dois minutos (tempo controle: dez minutos), seguido pelo protocolo de consumo de O₂ mitocondrial.
- **Substância X:** As mitocôndrias foram adicionadas a 0,5 mL da solução hipóxica suplementada com 1 µM de substância X. Após oito minutos em hipóxia, a solução de incubação saturada com O₂ (0,5 mL), suplementada com 1 µM de substância X, foi adicionada para a reoxigenação por dois minutos, seguido pelo protocolo de consumo de O₂ mitocondrial.

5.4.3.5. Medida da produção de ATP mitocondrial

A produção mitocondrial de ATP, após cada medição respiratória, foi imediatamente determinada pelo método *ATP assay mix* (diluição de 1:5) e comparada com padrões de ATP, usando uma placa branca de 96 poços e um espectrofluorômetro (SpectraMax® M3, Molecular Devices, EUA) no comprimento de onda de 560 nm.

5.4.3.6. Medida de turgescência mitocondrial e potencial transmembrana

A turgescência (*swelling*) mitocondrial e o potencial transmembrana foram avaliados de acordo com estudos anteriores (Maciel et al., 2020), utilizando um espectrofluorômetro (SpectraMax® M3, Molecular Devices, EUA). Mitocôndrias em suspensão (100 µg/mL) foram adicionadas ao meio de respiração na ausência dos substratos respiratórios, a 37 °C, sob agitação constante. A turgescência mitocondrial foi estimulada com Ca²⁺ (1 µM). Para determinação do potencial transmembrana da mitocôndria ($\Delta\psi_m$) foi utilizado o sensor TMRM (éster metílico de tetrametilrodamina, 400 nM).

5.4.3.7. Medida da produção de ROS mitocondrial

O kit *Amplex Red Hydrogen Peroxide Assay* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) foi utilizado para determinar a concentração extramitocondrial de ROS, por meio da produção de resorufina altamente fluorescente. A concentração extramitocondrial de ROS foi determinada em comparação com os padrões de H₂O₂ usando uma placa preta de 96 poços e um espectrofluorômetro (SpectraMax® M3, Molecular Devices, EUA) em comprimentos de onda de emissão de 540 nm e extinção de 580 nm (Maciel et al., 2020).

5.4.3.8. Medida do extravazamento de elétrons e relação ROS/ATP

Para calcular o extravazamento de elétrons, a taxa de H₂O₂ formado foi dividida pela taxa de consumo de O₂ mitocondrial. A razão ATP/ROS foi determinada para mostrar a formação de ROS associada ao consumo de O₂.

5.4.3.9. Medida da capacidade de retenção de Ca²⁺

A capacidade de retenção de cálcio (CRC) foi determinada de acordo com estudos anteriores (Maciel et al., 2020), usando mitocôndrias suspensas (400 µg) em 1 mL da solução para retenção de Ca²⁺, a 37°C. *Calcium green-5N* (0,5 µM/L, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) foi utilizado para medir a concentração extramitocondrial de Ca²⁺ em um espectrofotômetro (Cary Eclipse, Varian, Mulgrave, Victoria, Austrália) nos comprimentos de onda de emissão de 500 nm e extinção de 530 nm.

5.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, Estados Unidos). Por conta da comparação de médias de várias populações (grupos experimentais), os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). A distribuição dos dados foi considerada normal pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparação entre grupos foi utilizado one-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls. Para comparação entre grupos, em diferentes intervalos de tempo, foi utilizado two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. As curvas de sobrevivência foram analisadas por Kaplan-Meyer. Na análise da função mitocondrial os dados

foram comparados por one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6. RESULTADOS

6.1. EFEITOS DO TRATAMENTO COM O ATIVADOR DE CANAL BK_{Ca} NO MODELO DE HAP INDUZIDO POR MCT EM RATOS

Em relação à sobrevivência dos animais, os ratos hipertensos não tratados (grupo MCT) tiveram 80% de sobrevivência ao final do protocolo de 28 dias (Figura 14). Já aqueles que receberam o ativador de canal BK_{Ca} (substância X), por duas semanas a partir do 14º dia seguinte à injeção de MCT (grupo MCT+ α BK) ou salina (grupo CTRL+ α BK), apresentaram 100% de sobrevivência, assim como os animais do grupo CTRL.

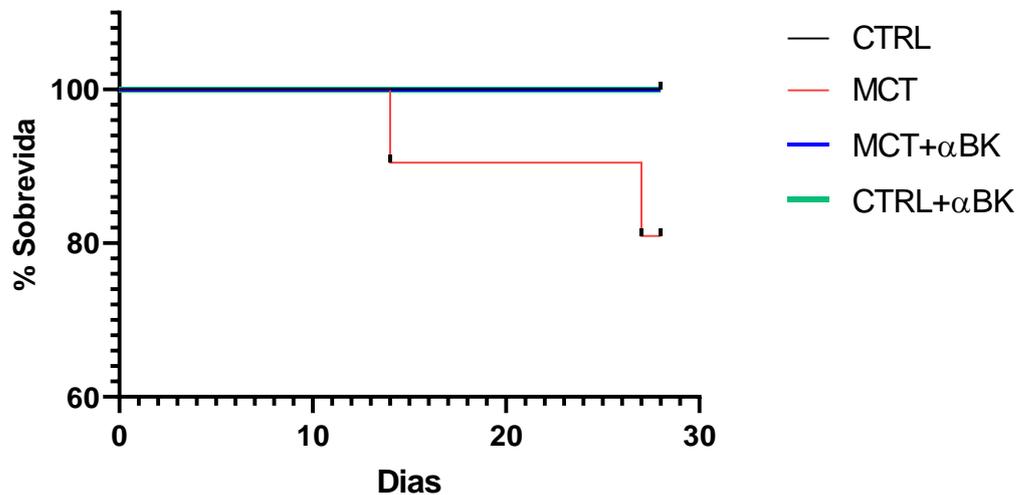


Figura 14. Análise da sobrevivência de Kaplan-Meier dos quatro grupos ao longo do protocolo experimental. O tratamento consistiu na administração de dose oral diária de 28 mg/kg da substância X (ativador de canal BK_{Ca}), o qual foi iniciado a partir do 14º dia após a injeção da monocrotalina. Grupos CTRL (n = 19); MCT (n = 21), MCT+ α BK (n = 14), e CTRL+ α BK (n = 5).

A Figura 15 mostra a evolução percentual de peso corporal ganho ao longo do protocolo experimental. Os quatro grupos apresentaram valores similares de ganho de peso corporal até a segunda semana do protocolo experimental. A partir daí, se iniciou uma redução progressiva no ganho de peso dos animais do grupo MCT, quando comparados ao grupo CTRL. Os animais dos grupos MCT+ α BK e CTRL+ α BK, ao contrário do grupo MCT, mostraram ganho de peso corporal semelhante ao grupo CTRL, ao final do período experimental (28 dias).

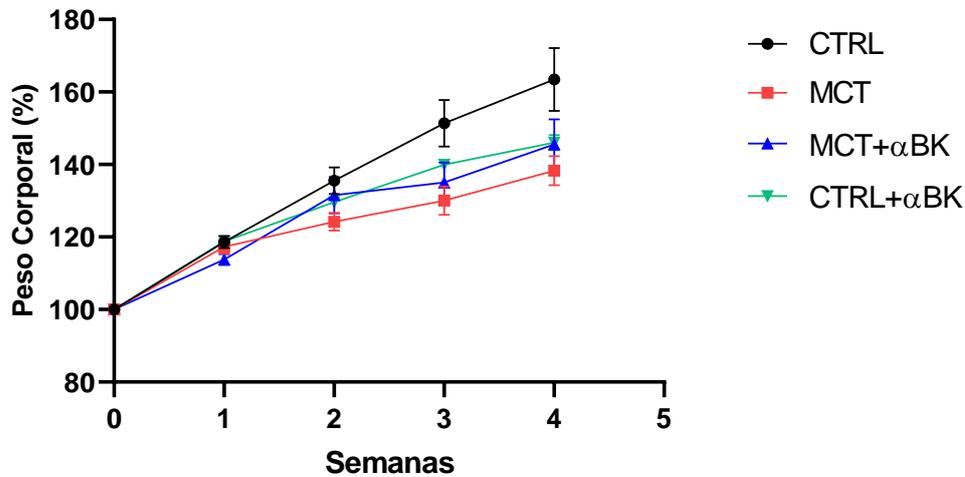


Figura 15 Evolução percentual do peso corporal. Peso corporal medido ao final do protocolo experimental. Valores expressos como média \pm EPM. CTRL (n =18); MCT (n = 21), MCT+αBK (n =16), CTRL+ αBK (n = 5).

Em relação a avaliação eletrocardiográfica, os ECGs registrados antes da administração da monocrotalina (Semana 0), apresentaram intervalos QTc sem diferença significativa entre os grupos. Na semana 2, os grupos CTRL e CTRL+αBK continuaram estatisticamente iguais, enquanto os grupos MCT e MCT+αBK apresentaram valores de QTc maiores que os do grupo CTRL ($p = 0.0335$ e 0.0157 , respectivamente); porém, apesar de visivelmente maiores, não há diferença estatística entre esses dois grupos e o grupo CTRL+αBK. No entanto, na quarta semana, o grupo MCT apresentou QTc significativamente maior que os dos grupos CTRL e CTRL+αBK ($p < 0.001$ e $= 0.045$, respectivamente), enquanto o grupo MCT+αBK não apresentou diferença estatística em relação aos grupos CTRL e CTRL+ αBK (Figura 16).

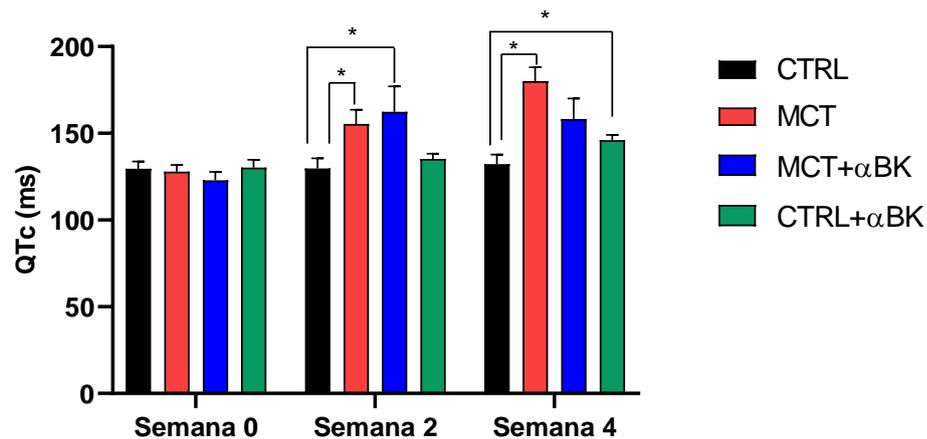


Figura 16. Intervalo QTc ao longo do protocolo experimental. Comparação dentro de cada entre os grupos entre dos intervalos QT na semana 0, semana 2 e semana 4. Os intervalos QT foram corrigidos pela equação de Bazett ($QTc = QT/RR^{1/2}$). Valores apresentados como média \pm EPM. Semana 0: CTRL (n = 17); MCT (n = 21), MCT+αBK (n = 11), CTRL+ αBK (n = 5); Semana 2: CTRL (n = 13); MCT (n = 16), MCT+αBK (n = 9), CTRL+ αBK (n = 3); Semana 4: CTRL (n = 12); MCT (n = 15), MCT+αBK (n = 7), CTRL+ αBK (n = 5). *p < 0,05

Um dos parâmetros comumente utilizado para a determinação do desenvolvimento de HAP é a medida de pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD), mostrada na figura 17. A avaliação feita no último dia do protocolo experimental mostrou que os animais do grupo MCT apresentaram um aumento significativo da PSVD, quando comparados aos animais dos demais grupos. Já os animais do grupo MCT-αBK tiveram essa pressão reduzida para valores semelhantes ao dos animais do grupo CTRL. O grupo CTRL-αBK permaneceu com a PSVD próxima aos grupos CTRL e MCT-αBK.

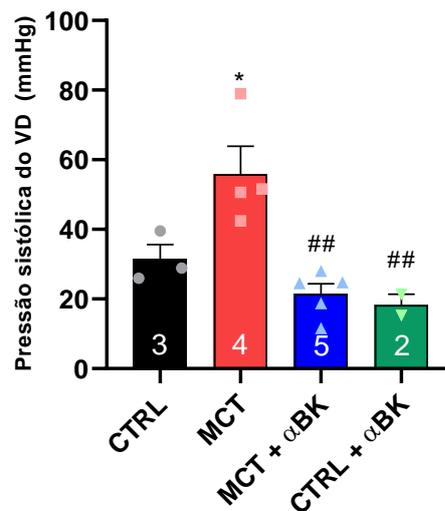


Figura 17. Pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD), no último dia do protocolo experimental. Valores apresentados como média ± EPM. * p < 0,05 vs CTRL; ## p < 0,01 vs MCT.

Ao final do período experimental (28^o dia) foram avaliados os seguintes parâmetros biométricos: o índice de hipertrofia do ventrículo direito, calculado pela relação de pesos VD/(VE+SEPTO), e os pesos relativos (normalizados pelo comprimento da tíbia, em cm) do coração, fígado e pulmões. Em relação ao índice de hipertrofia do ventrículo direito (Figura 18A), o grupo MCT apresentou valor significativamente maior, quando comparado aos demais grupos. Já os grupos CTRL, MCT-αBK e CTRL-αBK, não apresentaram diferenças significativas entre si. Em relação ao peso relativo do coração (Figura 18B), não foi observada diferença significativa entre os grupos. Quanto ao peso relativo do fígado (Figura 18C), os grupos CTRL, MCT e MCT-αBK não apresentaram diferença significativa entre si, enquanto o grupo CTRL-αBK mostrou média estatisticamente maior que a do CTRL e do MCT. No peso relativo dos pulmões, o grupo MCT-αBK foi o único a apresentar média significativamente maior que as dos demais grupos (Figura 18D).

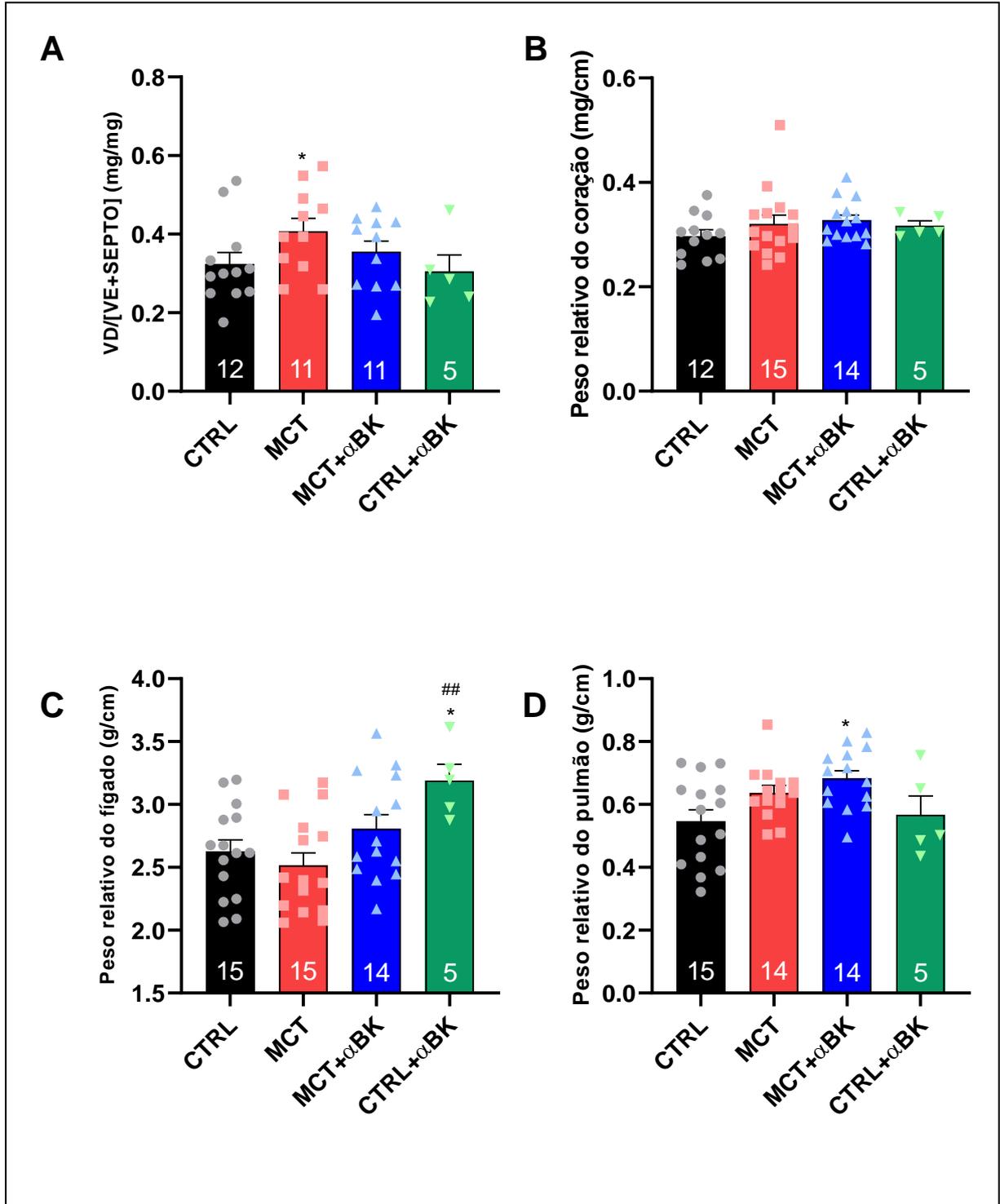


Figura 18. Parâmetros biométricos. **A**, peso relativo do VD, normalizado pelo peso do VE mais septo ventricular; **B**, peso relativo do coração; **C**, peso relativo do pulmão; **D**, peso relativo do fígado. Os valores de peso relativo do coração, pulmão e fígado foram obtidos a partir da relação entre peso do órgão (g) e comprimento da tíbia (cm). Valores, apresentados como média \pm EPM. n de animais na base de cada coluna. **p < 0,01 vs CTRL; ***p < 0,001 vs CTRL; #p < 0,05 vs MCT; ##p < 0,01 vs MCT.

A figura 19 mostra a reatividade vascular de anéis do tronco da artéria pulmonar dos quatro grupos experimentais. Na Figura 19A, observa-se que após precontração com 1 μM de PHE, as curvas de ACh em concentrações crescentes (1 nM – 30 μM) não apresentaram diferenças significativas quando comparadas entre os grupos. O IC_{50} foi 5,18 μM no grupo CTRL; 3,15 μM no grupo MCT; 2,41 μM no grupo MCT- αBK ; e 2,14 μM no grupo CTRL- αBK . Mesmo não sendo estatisticamente diferentes, os grupos que melhor responderam à ACh foram os dois que receberam o tratamento com a substância X, por apresentarem menores IC_{50} .

Protocolo semelhante ao da ACh foi realizado utilizando o SNP. Após a contração inicial com 1 μM de PHE, concentrações crescentes de SNP (0,01 nM – 300 nM) foram utilizadas. Os vasos de todos os grupos também responderam ao SNP de forma semelhante, sem diferenças significativas. Os valores de IC_{50} foram 27,6 nM para o grupo CTRL, 6,91 nM para o MCT, 28 nM para o MCT- αBK e 72,9 nM para o CTRL- αBK . Mesmo não tendo diferença estatística, observa-se que o grupo MCT apresentou menor IC_{50} , sugerindo melhor resposta vasodilatadora ao SNP (figura 19B).

Um terceiro protocolo utilizando os anéis de artéria pulmonar também foi feito. Nele, após o estímulo contrátil com 1 μM de PHE, concentrações crescentes da substância X (10 nM – 30 μM) foram utilizadas como agente vasodilatador, na ausência (Figura 20A) ou presença (Figura 20B) de ODQ, um inibidor permeável, potente e seletivo da guanilato ciclase sensível ao NO. Na primeira, os vasos de todos os grupos relaxaram de forma bastante semelhante, independente de terem recebido ou não o tratamento com ativador de canal BK_{Ca} . Isso é mostrado pelo IC_{50} , que foi de 11,8 μM para o grupo CTRL, 14,2 μM para o grupo MCT, 15,7 μM para o grupo MCT- αBK e 9,8 μM para o grupo CTRL- αBK .

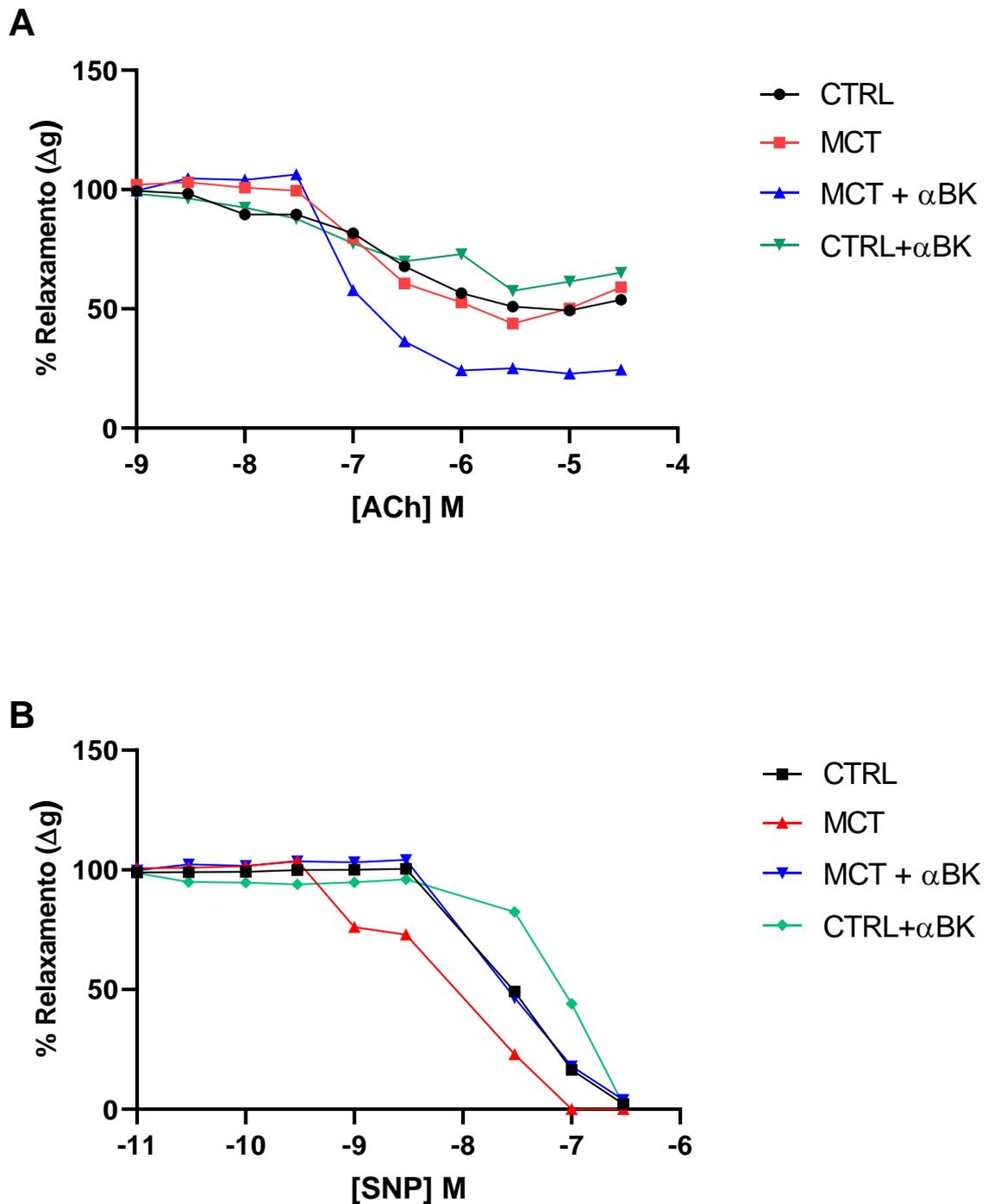


Figura 19. Efeito vasodilatador da acetilcolina (ACh) ou nitroprussiato de sódio (SNP) sobre o anel do tronco da artéria pulmonar isolado. Em **A**, curva de concentração x resposta de anéis de artéria pulmonar pré-contraídos com PHE e posteriormente relaxados com concentrações crescentes de ACh. Em **B**, curva concentração x resposta de anéis de artéria pulmonar pré-contraídos com PHE e posteriormente relaxados com concentrações crescentes de SNP. Valores apresentados como percentual da tensão máxima em função da concentração. $n = 3$.

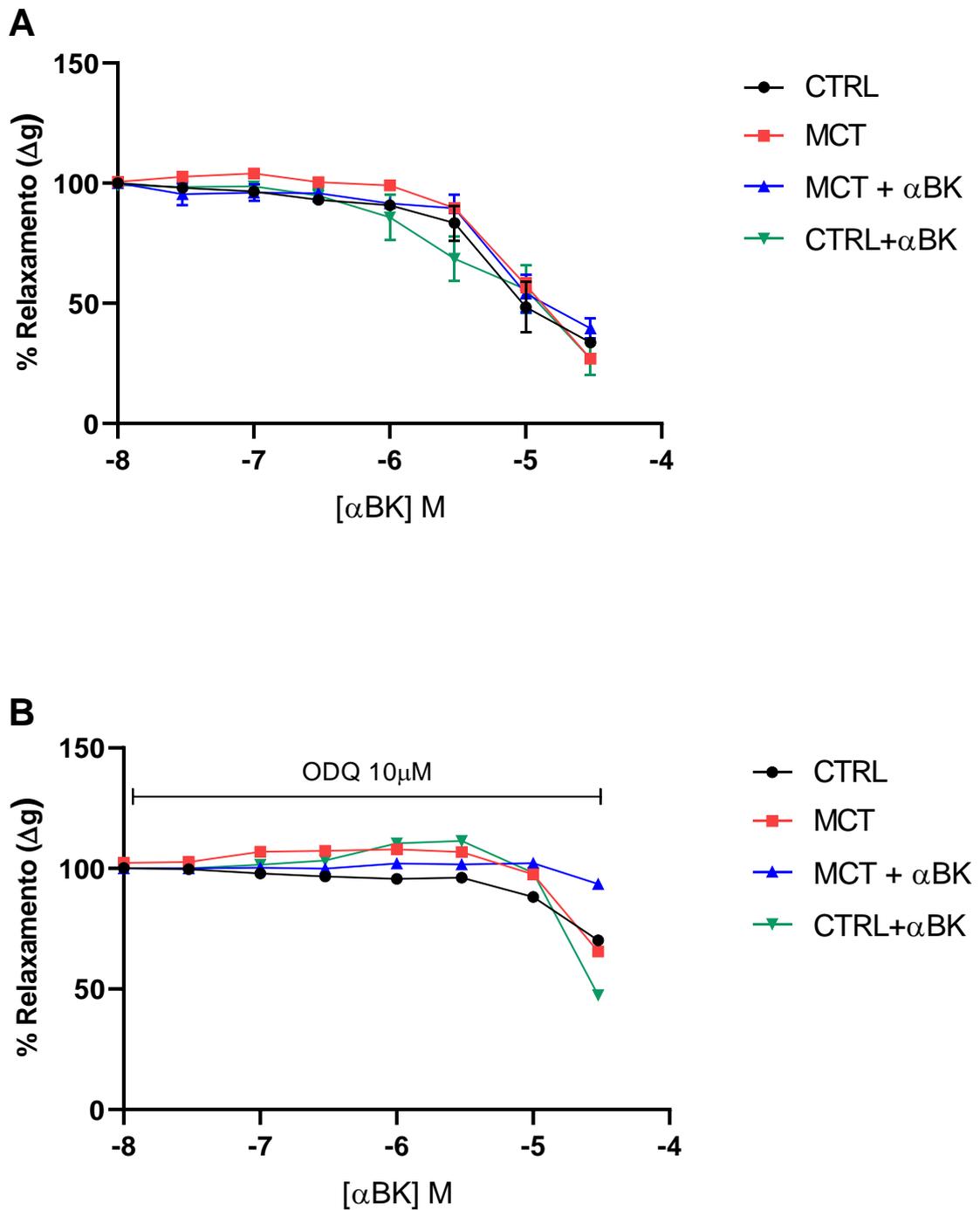


Figura 20. Efeito vasodilatador da substância X (α BK) sobre o anel do tronco da artéria pulmonar isolado. Em **A**, curva de concentração x resposta de anéis de artéria pulmonar pré-contraídos com PHE e posteriormente relaxados com concentrações crescentes da substância X. Em **B**, curva concentração x resposta de anéis de artéria pulmonar pré-contraídos com PHE e posteriormente relaxados com concentrações crescentes da substância X, na presença de ODQ. Valores apresentados como percentual da tensão máxima em função da concentração. $n = 3$.

Na presença de ODQ, o efeito da substância X foi drasticamente reduzido em todos os grupos experimentais. O IC₅₀ para o grupo CTRL foi de 70.9 μ M; para o MCT, 79.3 μ M; 60 μ M para o MCT- α BK e 48 μ M para o grupo CTRL- α BK. Dessa forma, o ODQ reduziu o efeito vasodilatador da substância X em, aproximadamente, cinco vezes.

Na avaliação dos efeitos do tratamento com o ativador de canal BK_{Ca} sobre a função mitocondrial de corações de ratos com HAP, a figura 21 mostra a produção de ATP e ROS em mitocôndrias isoladas. Na figura 21A observa-se que não houve diferença significativa na produção de ATP pelas mitocôndrias dos quatro grupos experimentais. Quanto à produção de ROS mitocondrial, a figura 21B mostra que o grupo MCT e os grupos tratados com a substância X tiveram aumento da produção de ROS, comparados ao grupo CTRL. A produção de ROS nos grupos CTRL+ α BK e MCT+ α BK não apresentou diferença significativa em relação ao grupo MCT, embora se observa que há uma tendência de menor produção de ROS nos grupos tratados com a substância X.

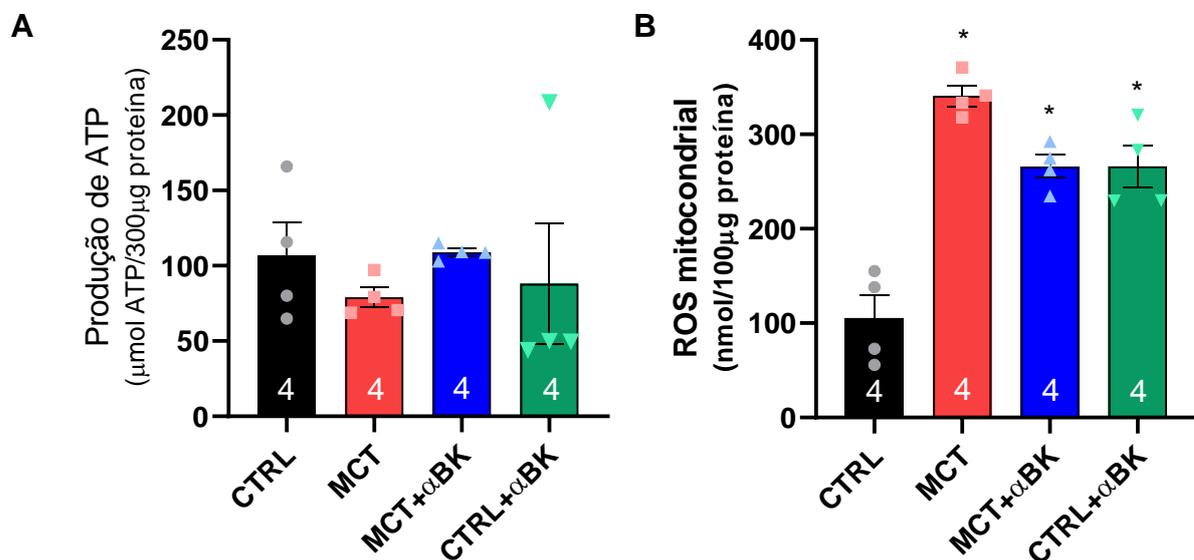


Figura 21. Produção de ATP e ROS mitocondriais. Em A, produção de ATP; em B, produção de ROS. Valores apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs CTRL.

Em relação à capacidade de retenção de Ca²⁺, a figura 22A mostra que o efeito ativador da substância X não alterou a dinâmica do Ca²⁺ mitocondrial, tanto na presença, quanto na ausência da ciclosporina A (CSA), um inibidor da formação do

poro de transição mitocondrial. Já o $\Delta\Psi$ mitocondrial (figura 22B), não apresentou diferença entre os grupos e seus respectivos controles positivos (em presença de CSA). A menor fluorescência do TMRM no grupo CTRL, observada nos dois picos, indica despolarização da membrana mitocondrial interna, que não foi observada com a mesma intensidade nos demais grupos.

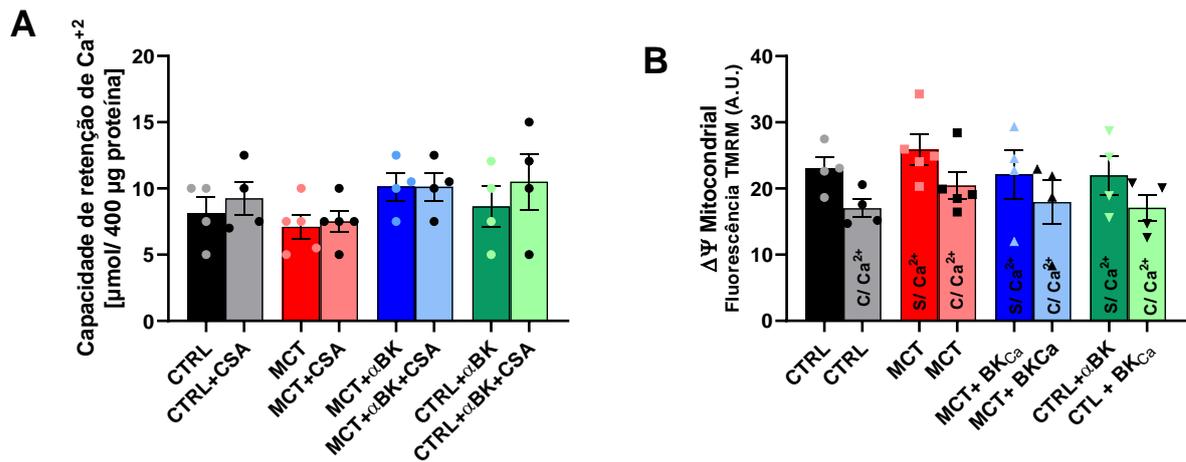


Figura 22. Capacidade de retenção de Ca²⁺ e potencial de membrana. Em A, capacidade de retenção de Ca²⁺; em B, maior pico do potencial de membrana. Valores apresentados como média ± EPM. CTRL (n=4); MCT (n=4), MCT+αBK (n=4), CTRL+ αBK (n=4) * p < 0,05 vs CTRL.

6.2. EFEITOS *IN VITRO* DO ATIVADOR DE CANAL BK_{Ca} (SUBSTÂNCIA X) EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS, EM CONDIÇÕES DE HIPÓXIA/REOXIGENAÇÃO

A figura 23 mostra o efeito da substância X sobre a respiração mitocondrial, na ausência de Ca²⁺. O consumo de O₂ mitocondrial no estado I do complexo I (estado basal, onde não há adição de substratos ou ADP ao meio com as mitocôndrias. Nesse estado, o consumo de O₂ é quase nulo) não apresentou diferença significativa entre os grupos CTRL e αBK, como mostrado na figura 23A. Já nos estados II (adição de substratos energéticos, com formação do $\Delta\Psi$ e consumo de O₂) e III (adição de ADP, estimulando alto consumo de O₂) do complexo I, o consumo de O₂ mitocondrial foi menor no grupo αBK, quando comparado ao grupo CTRL (Figuras 23B e 23C, respectivamente).

Na figura 23D, observa-se que no estado II do complexo II, o consumo de O₂ mitocondrial também foi menor no grupo αBK. Entretanto, no estado III do complexo II não foi observado diferença significativa entre os dois grupos (Figura 23E). A ausência de diferenças significativas entre os grupos também foi observada no

complexo IV, comparando o consumo máximo de O₂ em mitocôndrias desacopladas (Figura 23F).

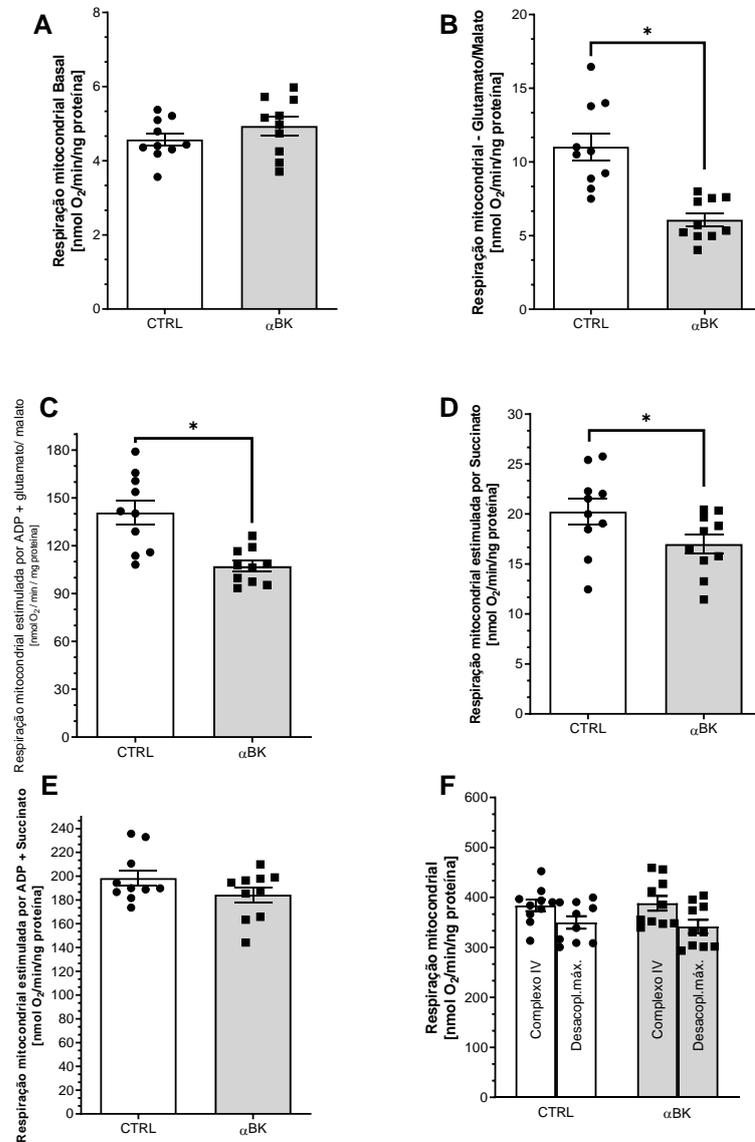


Figura 23. Consumo de O₂ em mitocôndrias isoladas de cardiomiócitos de camundongos. Em **A**, respiração basal (estado I do complexo I); em **B**, estimulação por glutamato/malato (estado II do complexo I); em **C**, estimulação por ADP (estado III do complexo I – estado fosforilativo); em **D**, respiração do complexo II estimulada por succinato (estado I do complexo II); em **E**, respiração estimulada por ADP (estado III do complexo II – estado fosforilativo); em **F**, respiração do complexo IV estimulado por TMPD e ascorbato, e desacoplamento máximo de oxigênio induzido por FCCP. Valores foram apresentados como média ± EPM. * p < 0,05 vs CTRL. n = 10.

Em relação à produção de ATP mitocondrial, a figura 24A mostra que a produção foi menor no grupo αBK comparado ao CTRL. Por outro lado, a produção de ROS foi mais elevada no grupo αBK (Figura 24B) em relação ao grupo CTRL. A

razão ROS/ATP foi menor, quando comparados ao grupo CTRL (figura 24C), enquanto o extravasamento (*leakage*) de prótons mitocondriais foi maior no grupo α BK (figura 24D). Junto com o resultado da figura 23, esses dados indicam que a ativação dos canais BK_{Ca} pode levar a uma diminuição da função mitocondrial.

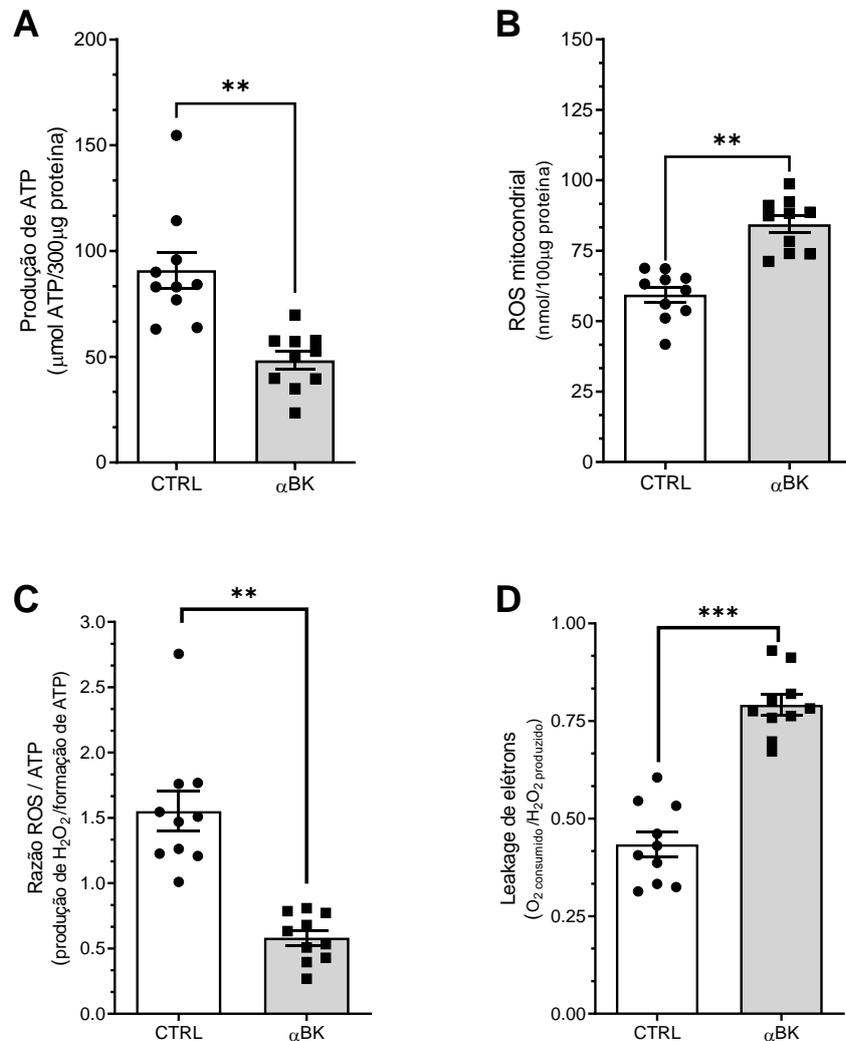


Figura 24. Produtos mitocondriais e características. Em **A**, produção de ATP; em **B**, produção de ROS; em **C**, razão ROS/ATP; em **D**, extravasamento de elétrons. Valores foram apresentados como média \pm EPM. ** p < 0,01 vs CTRL; *** p < 0,001 vs CTRL. n = 10.

Em relação ao efeito da substância X sobre mitocôndrias isoladas na presença de 5 nM de Ca^{2+} , em condições de normóxia ou hipóxia/reoxigenação, o consumo de O_2 no estado I do complexo I não diferiu significativamente entre os grupos (Figura 25A). No estado II do complexo I, os grupos CTRL e α BK não apresentaram diferenças entre si, porém, a hipóxia/reoxigenação reduziu significativamente o consumo de O_2 .

Esse efeito foi prevenido nas mitocôndrias previamente incubadas com a substância X antes da hipóxia/reoxigenação (Figura 25B). A figura 25C mostra que o consumo de O₂ pelo complexo I em seu estado III (fosforilativo) foi menor no grupo α BK, quando comparado ao CTRL. A redução do consumo de O₂ após hipóxia/reoxigenação foi atenuada nas mitocôndrias pré-incubadas com a substância X (Figura 25C).

No caso do complexo II, em seu estado II, o consumo de O₂ pelas mitocôndrias foi similar nos grupos α BK, hipóxia/reoxigenação e hipóxia/reoxigenação+ α BK, mas significativamente menor quando comparados ao CTRL (Figura 25D). Já no estado III, não foi observada diferenças entre os grupos (Figura 25E). O consumo de O₂ no estado IV também não apresentou diferenças significativas entre os grupos (Figura 25F).

Em relação à produção mitocondrial de ATP, o grupo CTRL apresentou produção significativamente maior em relação ao grupo α BK. A hipóxia/reoxigenação minimizou essa produção, enquanto a pré-incubação com a substância X, antes da hipóxia/reoxigenação, foi capaz de reduzir esse efeito (Figura 26A). A produção de ROS foi menor no grupo CTRL, em comparação ao grupo α BK. A hipóxia/reoxigenação estimulou o aumento na produção de ROS, enquanto a pré-incubação das mitocôndrias com a substância X, antes da hipóxia/reoxigenação, preveniu esse aumento (Figura 26B). A razão ATP/ROS foi menor no grupo α BK, quando comparada ao grupo CTRL. A hipóxia/reoxigenação reduziu significativamente a razão ATP/ROS, que foi prevenida quando as mitocôndrias foram pré-incubadas com a substância X (Figura 26C).

A figura 26D mostra que o extravasamento de prótons aumenta em mitocôndrias incubadas com a substância X em condições de normóxia. O extravasamento de prótons após hipóxia/reoxigenação apresentou um forte aumento, que foi prevenido em mitocôndrias pré-incubadas com a substância X antes da hipóxia-reoxigenação. Junto com a figura 25, esses dados sugerem que a ativação do canal BK_{Ca} mitocondrial pela substância X foi capaz de prevenir/atenuar os efeitos promovidos pela hipóxia/reoxigenação.

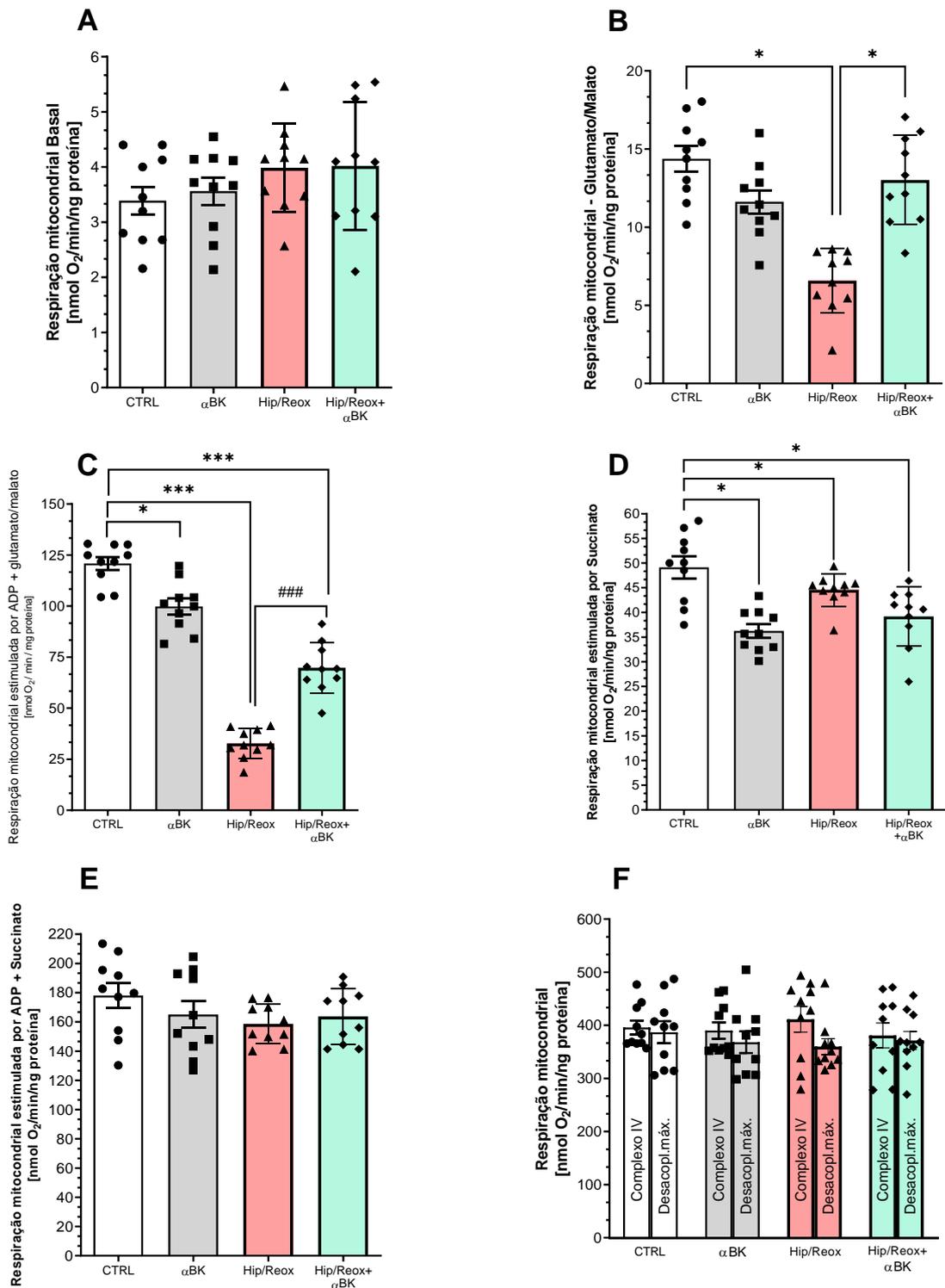


Figura 25. Consumo de O₂ em mitocôndrias submetidas a hipóxia/reoxigenação. Em A, respiração basal (estado I do complexo I); em B, estimulação por glutamato/malato (estado II do complexo I); em C, estimulação por ADP (estado III do complexo I – estado fosforilativo); em D, respiração do complexo II estimulada por succinato (estado I do complexo II); em E, respiração estimulada por ADP (estado III do complexo II – estado fosforilativo); em F, respiração do complexo IV estimulado por TMPD e ascorbato, e desacoplamento máximo de oxigênio induzido por FCCP. Valores

apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs CTRL; *** $p < 0,001$ vs CTRL; ### $p < 0,001$ Hip/Reox. $n = 10$.

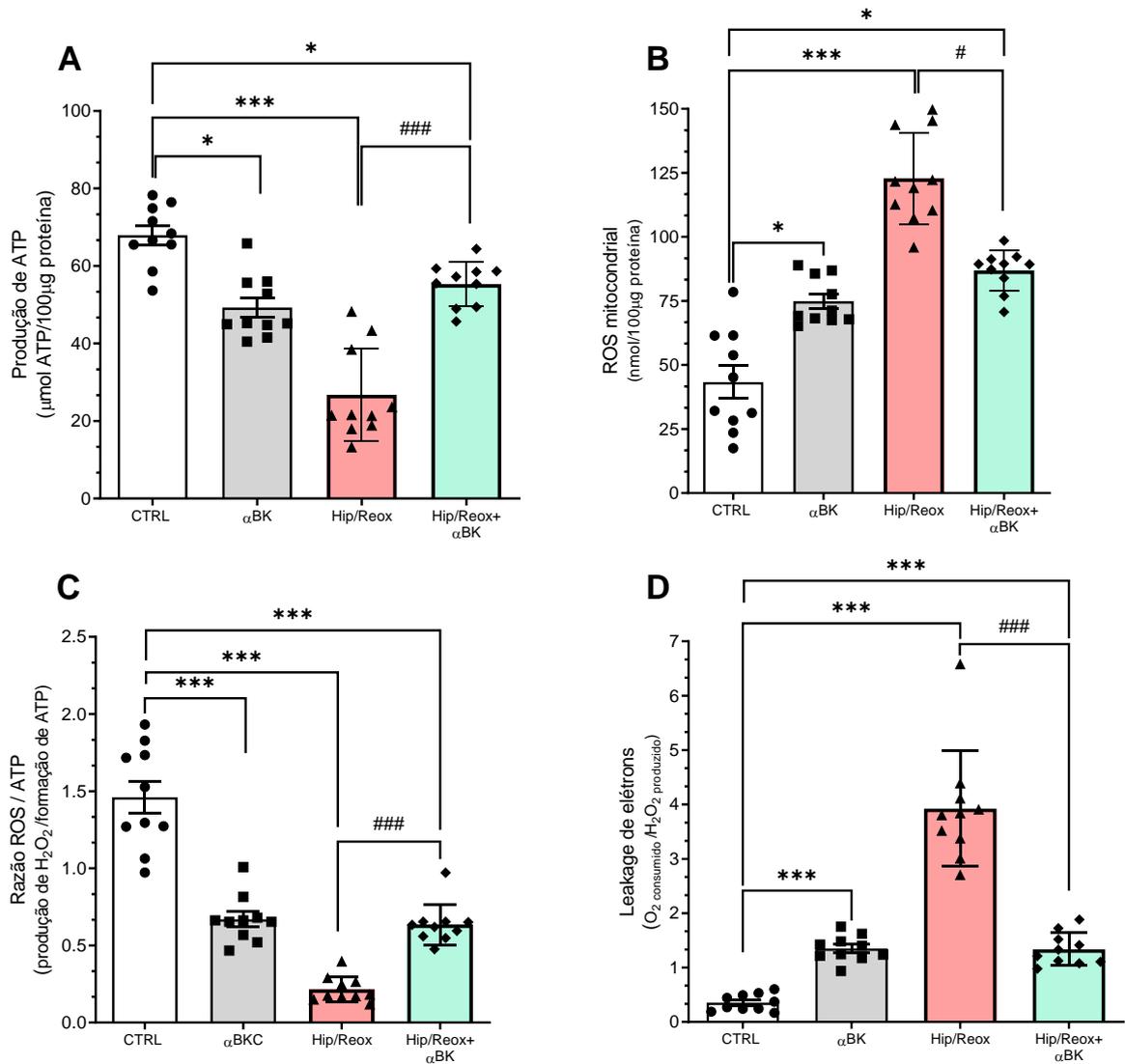


Figura 26. Produtos e características de mitocôndrias submetidas a hipóxia/reoxigenação. Em **A**, produção de ATP; em **B**, produção de ROS; em **C**, razão ROS/ATP; em **D**, extravasamento de elétrons. Valores foram apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs CTRL; *** $p < 0,001$ vs CTRL; # $p < 0,05$ vs Hip/Reox; ### $p < 0,001$ vs Hip/Reox. $n = 10$.

Em relação aos efeitos do ativador de canal BK_{Ca} no potencial transmembrana e turgescência (inchaço) mitocondrial, na presença de $10 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} e $2 \mu\text{M}$ de oligomicina, bem como em condições de hipóxia/reoxigenação, a substância X reduziu a turgescência induzida por $10 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} . Inicialmente houve rápido aumento, que se estabilizou em um platô com valores inferiores ao controle com a mesma

concentração da Ca^{2+} . A linha tracejada representa as mitocôndrias incubadas com FCCP – um controle positivo para a turgescência máxima (Figura 27A). A figura 27B mostra que o ativador de canal BK_{Ca} preveniu a despolarização induzida pelo Ca^{2+} ; no entanto, a despolarização induzida pela substância X foi superior à linha de base (linha tracejada, sem Ca^{2+}).

A oligomicina foi utilizada para inibir a atividade da ATP sintase na presença do ativador de canal BK_{Ca} (Figura 27C). Na presença da substância X e oligomicina foi observado inicialmente um rápido aumento de turgescência, seguido por um período de incremento mais suave, o que não foi observado em presença de oligomicina sem a substância X (CTRL). A linha tracejada indica o controle positivo, em presença de FCCP. Em relação ao potencial de membrana, em presença da oligomicina sem a substância X foi observada hiperpolarização mitocondrial. Porém, na presença da substância X ocorre uma despolarização gradual, seguida da formação de um platô, após 6 minutos de experimento (Figura 27D).

Após hipóxia/reoxigenação as mitocôndrias também um rápido aumento de turgescência, que foi atenuado quando em presença da substância X, embora tenha apresentado valores superiores aos do grupo CTRL (sem hipóxia/reoxigenação), como mostrado na figura 27E. A figura 27F mostra que o potencial transmembrana mitocondrial, quando em hipóxia/reoxigenação, apresentou despolarização ao longo do tempo. Contudo, em presença da substância X essa despolarização foi reduzida significativamente, embora sem atingir valores próximos aos do controle (CTRL, sem hipóxia/reoxigenação).

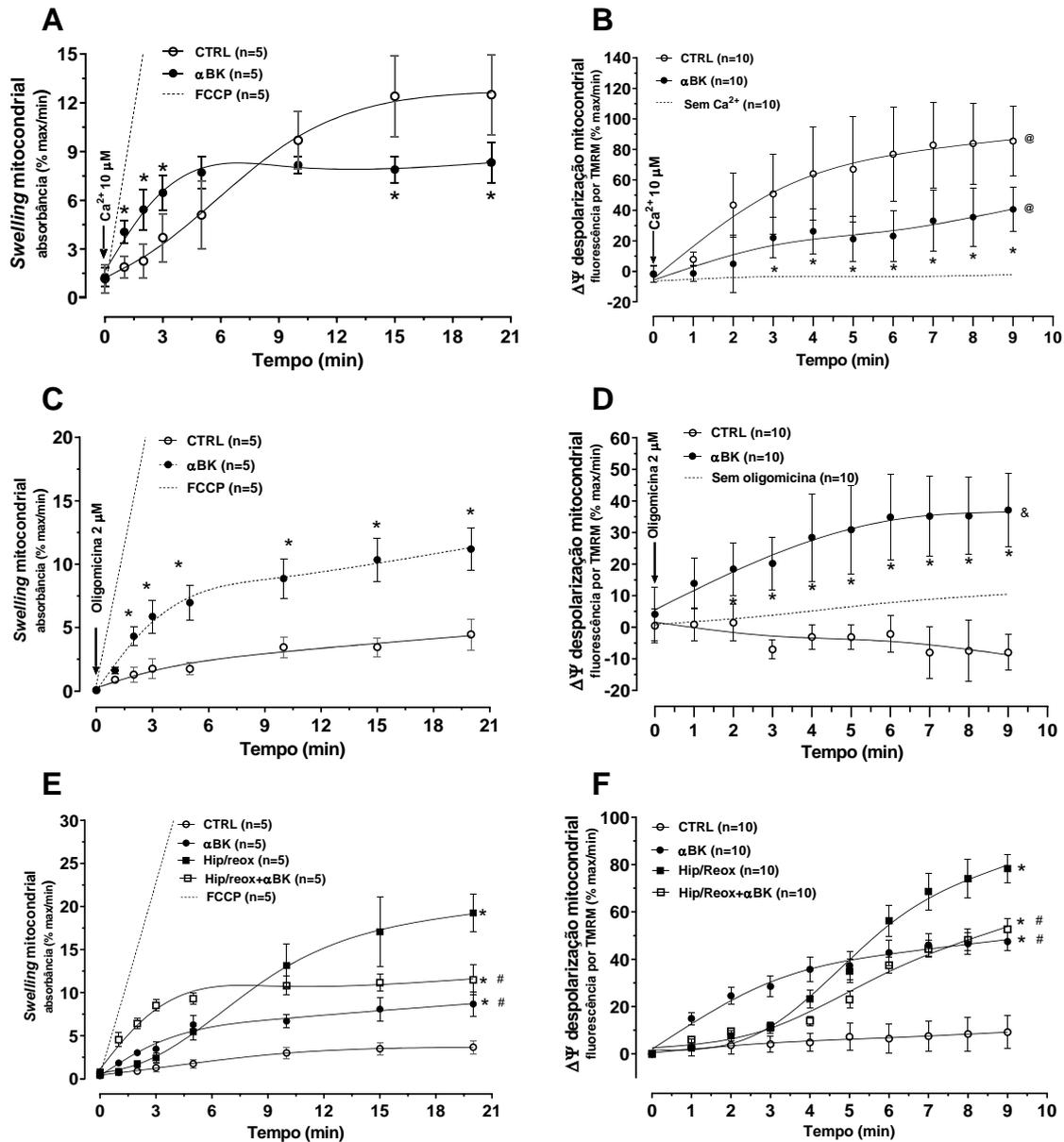


Figura 27. Turgescência mitocondrial e potencial transmembrana ($\Delta\Psi$). **A**, turgescência mitocondrial induzida por 10 μM de Ca^{2+} em mitocôndrias incubadas com a substância X. As linhas tracejadas indicam o FCCP como um controle positivo para turgescência máxima; **B**, Despolarização mitocondrial induzida por 10 μM de Ca^{2+} em mitocôndrias incubadas com a substância X. A linhas tracejadas indicam experimento sem Ca^{2+} ; **C**, turgescência em mitocôndrias incubadas com oligomicina e substância X. A linha tracejada indica o controle positivo em presença de FCCP; **D**, $\Delta\Psi$ em mitocôndrias incubadas com oligomicina e substância X; **E**, turgescência mitocondrial induzida por hipóxia/reoxigenação na presença da substância X. A linha tracejada indica o controle positivo na presença de FCCP; **F**, Depolarização mitocondrial induzido por hipóxia/reoxigenação, em mitocôndrias incubadas com a substância X. Valores apresentados como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs CTRL; @ $p < 0.05$ vs sem Ca^{2+} , & $p < 0.05$ vs sem oligomicina; # $p < 0.05$ vs Hip/Reox.

Em relação ao efeito da substância X na capacidade de retenção de Ca^{2+} e potencial de membrana ($\Delta\Psi$) mitocondrial, foi avaliada como a ativação do canal BK_{Ca} pela substância X influencia a dinâmica do Ca^{2+} mitocondrial e do potencial de membrana mitocondrial, na presença de concentrações crescentes de Ca^{2+} . A figura 28A mostra os traçados representativos do $\Delta\Psi$ de mitocôndrias isoladas, nas seguintes condições: (1) CTRL, sem tratamento; (2) 4 μM de Ciclosporina A; (3) 1 μM de substância X (αBK); e (4) 100 nM de iberiotoxina (IbTx). Em (3), o traçado mostra que o $\Delta\Psi$ mitocondrial se despolarizou rapidamente na presença do ativador de canal BK_{Ca} (visualizado pela redução na fluorescência do TMRM), seguido de estabilização sem exibir despolarização progressiva. Este padrão não foi observado nas demais condições, nas quais ocorreram uma despolarização progressiva de baixa intensidade (traçado 1) ou não houve despolarização (traçados 2 e 4). A quantificação do potencial de membrana é mostrada na figura 28D, com os valores do $\Delta\Psi$ ao início e ao final do experimento. Os dados mostram que a substância X induziu despolarização significativa do $\Delta\Psi$ mitocondrial ao final do experimento, em comparação com os demais grupos.

A Figura 28B mostra traçados representativos da dinâmica do Ca^{2+} mitocondrial nas seguintes condições: (1) CTRL, sem tratamento; (2) 4 μM de ciclosporina A; (3) 1 μM de substância X (αBK); (4) 100 nM de IbTx; (5) αBK , no início do experimento; e (6) $\alpha\text{BK}+\text{IbTx}$. O traçado 5 mostra que a substância X adicionada no início do ensaio impediu completamente a absorção de Ca^{2+} . Quando alguns pulsos de Ca^{2+} foram fornecidos às mitocôndrias, seguidos da adição da substância X, foi observado aumento na fluorescência, mesmo sem adição de mais Ca^{2+} (indicado por asterisco, no traçado 3), sugerindo que alguma quantidade de cálcio foi liberada pelas mitocôndrias quando em presença do ativador de canal BK_{Ca} . O bloqueador seletivo para canal BK_{Ca} , IbTx, não bloqueou o efeito da substância X nas mitocôndrias isoladas (traçado 6). A figura 28C mostra a quantificação da capacidade mitocondrial de retenção de Ca^{2+} , demonstrando que a substância X impede a absorção de Ca^{2+} pelas mitocôndrias. A Figura 28E mostra a cinética de absorção de Ca^{2+} pelas mitocôndrias no início e ao final dos ensaios. Os resultados não apresentaram diferenças entre os grupos, exceto para o grupo αBK , no qual, por não apresentar capacidade de retenção, a cinética foi igual ao tempo total do experimento.

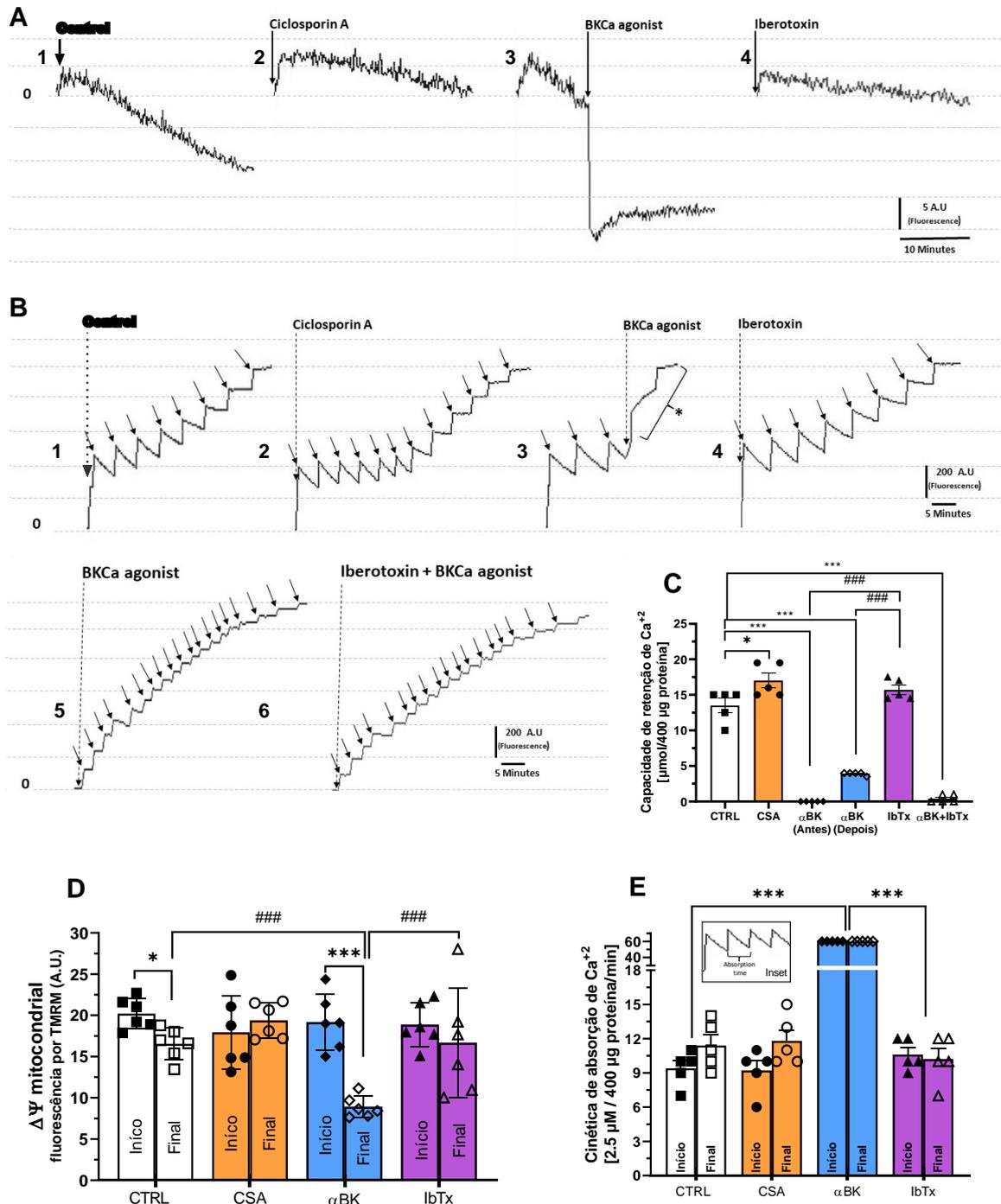


Figura 28. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) e retenção de Ca^{2+} em mitocôndrias isoladas, em presença de concentrações crescentes de Ca^{2+} . A, traçados representativos da dinâmica do $\Delta\Psi$ mitocondrial. Traçado 1: controle sem tratamento; traçado 2: mitocôndrias isoladas incubadas em $4 \mu\text{M}$ de CSA, como controle positivo para bloqueio do poro de transição mitocondrial; traçado 3: mitocôndrias isoladas incubadas com a substância X depois de 3 ou 4 picos de Ca^{2+} ; traçado 4: mitocôndrias incubadas com IbTx. B, traçados representativos da dinâmica de retenção de Ca^{2+} mitocondrial. traçado 1: controle sem tratamento; traçado 2: mitocôndrias isoladas incubadas com $4 \mu\text{M}$ de CSA, como controle positivo para bloqueio do poro de transição mitocondrial; traçado 3: mitocôndrias incubadas com a substância X depois de 3 picos de Ca^{2+} . O asterisco ao lado do colchete indica o aumento da fluorescência depois da incubação das mitocôndrias com o ativador do canal BKCa, sem adição de Ca^{2+} ; traçado 4: mitocôndrias incubadas com IbTx, desde o começo do experimento; traçado 5: mitocôndrias incubadas com a substância X desde o início do experimento; traçado 6: mitocôndrias

incubadas com IbTx + α BK desde o início do experimento. As setas representam cada adição de Ca^{2+} . **C**, quantificação da capacidade mitocondrial de retenção de Ca^{2+} (*antes*: anterior ao pico de Ca^{2+} ; *depois*: após 3 ou 4 picos de Ca^{2+}). **D**, quantificação do $\Delta\Psi$ mitocondrial. **E**, quantificação da cinética de absorção de Ca^{2+} pelas mitocôndrias. O quadro representa como foi medido. As colunas *início* e *final* representam o início e final do experimento, respectivamente. Valores apresentados como média \pm EPM. * $p < 0.05$; *** ou ### $p < 0,001$.

7. DISCUSSÃO

Neste estudo, mostramos que o tratamento crônico com a substância X, um potente e seletivo ativador de canais de potássio de alta condutância sensíveis ao cálcio, teve efeitos terapêuticos no modelo experimental de hipertensão arterial pulmonar.

O modelo experimental utilizado foi o da hipertensão arterial pulmonar induzida por uma única dose de monocrotalina em rato macho jovem. Apesar de haverem outros modelos clássicos, como a hipóxia crônica e o Sugen5416+hipóxia, este modelo é o mais comumente utilizado em estudos pré-clínicos da HAP, em razão da facilidade técnica, rapidez e baixo custo de implementação do modelo experimental (ao contrário do Sugen5416+hipóxia). Além disso, apresenta diversas características fisiopatológicas similares às observadas em pacientes com HAP, como o remodelamento vascular pulmonar e ventricular direito, bem como o aumento de mPAP (Boucherat et al., 2022; Stenmark et al., 2009).

Dados da literatura mostram que, a partir do décimo quarto dia após a injeção de monocrotalina, já é possível observar alterações hemodinâmicas e vasoconstrição, assim como alterações morfológicas nas células endoteliais da artéria pulmonar. Da mesma forma, após 28 dias, a HAP se instala em sua forma severa (o que não ocorre no modelo de hipóxia crônica), marcada pela insuficiência ventricular direita, que normalmente leva os animais hipertensos a óbito (Bueno-Beti et al., 2018; Rafikova et al., 2016). Em nosso estudo, o êxito no estabelecimento do modelo experimental de HAP, mediante a injeção de uma única dose de monocrotalina (60 mg/kg), foi evidenciado pela observação do desenvolvimento de alterações cardíacas, hemodinâmicas e biométricas, como hipertrofia ventricular direita e consequente aumento do intervalo QT do eletrocardiograma, aumento da PSVD e congestão pulmonar, além da diminuição da taxa de sobrevivência. Todas essas alterações são características do desenvolvimento da HAP e compatíveis com aquelas apresentadas na literatura (Ferraz et al., 2020.; Gomez-Arroyo et al., 2012; Huxtable, 1990; Nogueira-Ferreira et al., 2015).

Neste estudo, o agente terapêutico avaliado foi a substância X, uma mistura racêmica de dois enantiômeros (**Y** e **Z**), com ação ativadora em canais de potássio de alta condutância, sensíveis ao cálcio. Ponte e colaboradores (2012) mostraram que a

substância X e seu enantiômero Z causam vasodilatação em anéis de aorta de ratos normotensos, quando pré-contraídos com fenilefrina, na presença ou ausência de endotélio, evidenciando que o efeito vasodilatador ocorre por ação desses ativadores na musculatura lisa vascular, na qual os canais BK_{Ca} são amplamente expressos (Tanaka et al., 2004). Dado que, o endotélio é essencial na regulação do tônus vascular, inclusive o pulmonar, há a possibilidade de as duas tetrahydroquinolinas estarem atuando também nas células endoteliais, hiperpolarizando-as e promovendo a vasodilatação mediada por óxido nítrico (NO). O NO, além da vasodilatação, também tem ação antiproliferativa, antiplaquetária e anti-inflamatória, contribuindo para a redução do tônus e melhora do remodelamento vascular (M. A. Hill et al., 2010; Lei et al., 2013).

Neste estudo, a substância X foi administrada durante quatorze dias, a partir do 14º dia de indução da HAP pela monocrotalina. A dose de substância X (28 mg/kg/dia) administrada aos animais foi igual àquela administrada em nosso estudo anterior (Ferraz et al., 2020).

Poucos são os estudos envolvendo a ativação do canal BK_{Ca} e a HAP. Revermann e colaboradores (2014) utilizaram o ativador de canal BK_{Ca} NS1619, por via inalatória, como ferramenta terapêutica para o tratamento da HAP induzida por monocrotalina em ratos. O protocolo consistia em avaliar o efeito agudo do NS1619, após 30 e 120 minutos de inalação, no 24º dia após a indução da HAP. O grupo de pesquisadores observou que o tratamento com NS1619 reduziu as pressões sistólica e média do VD, aumentou a PaO_2 , o pH plasmático e diminuiu a $PaCO_2$. Já em estudo prévio de nosso laboratório, Ferraz e colaboradores (2020) mostraram que o tratamento com a substância X, no mesmo modelo experimental de HAP em ratos, foi eficiente em melhorar diversos parâmetros dos animais hipertensos, tratados por via oral durante quatorze dias, a partir do 14º dia de indução da HAP. O grupo observou a melhora na tolerância ao esforço, na PSVD, no remodelamento vascular e ventricular, entre outros parâmetros.

No presente estudo, observamos que o ativador de canal BK_{Ca} utilizado, substância X, reduziu a mortalidade dos animais hipertensos que receberam o tratamento por duas semanas, quando comparados aos animais hipertensos que receberam apenas o veículo. Esse mesmo padrão foi observado por Ferraz e

colaboradores (2020), e por outros trabalhos utilizando o modelo de monocrotalina (Gomez-Arroyo et al., 2012; Nogueira-Ferreira et al., 2015). Importante ressaltar que os animais do grupo controle que receberam o tratamento com a substância X também apresentaram 100% de sobrevivência.

Em relação ao peso corporal, os animais hipertensos não tratados (grupo MCT) apresentaram menor percentual de ganho de peso, quando comparados aos outros grupos, que tiveram ganho de peso similar (resultado semelhante ao observado por Ferraz e colaboradores (2020)). Possivelmente, o menor percentual de ganho de peso do grupo hipertenso não tratado se deve ao maior esforço respiratório que esses animais exercem por conta da progressão da doença.

Outro parâmetro avaliado foi a duração do intervalo QT do eletrocardiograma, expresso em valores corrigidos (QTc). Neste estudo, observamos que nos ECGs registrados previamente à indução da HAP, os intervalos QTc dos animais não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Já os registros de ECG realizados quatorze dias após a injeção de monocrotalina, mostram que apenas os dois grupos com animais hipertensos tiveram aumento do intervalo QTc. Após quatorze dias de tratamento com o ativador de canal BK_{Ca} , apenas os animais que receberam a substância X tiveram a progressão do intervalo QTc inibida, ao passo que os animais hipertensos, que receberam apenas o veículo, apresentaram aumento do intervalo QTc. O prolongamento do intervalo QT é uma alteração característica da hipertrofia cardíaca e está presente tanto em animais com HAP induzida por monocrotalina (Piao et al., 2010; Rich et al., 2013), quanto em pacientes com HAP (Hong-Liang et al., 2009) estando correlacionado com a hipertrofia ventricular direita. O aumento do intervalo QT reflete o prolongamento da duração dos potenciais de ação ventriculares, decorrente de mudanças na expressão de canais de K^+ dependentes de voltagem e consequente redução das correntes repolarizantes. Intervalo QT prolongado é marcador clínico de risco de surgimento de arritmias cardíacas e morte súbita (Muensterman & Tisdale, 2018). Alguns estudos sugerem como tratamento para a HAP o uso de agentes que atuem de forma semelhante ao ativador de canal BK_{Ca} , melhorando essa alteração eletrocardiográfica (Benoist et al., 2012; Rich et al., 2013; Temple et al., 2014).

Uma das características mais marcantes na HAP é a elevação da mPAP, que se encontra acima de 20 mmHg. No modelo animal, dada a maior dificuldade para a

medição da mPAP, se utiliza a medida da PSVD, que apresenta valores semelhantes aos encontrados na clínica. Nosso estudo mostrou que o tratamento com a substância X reduziu a PSVD para valores, inclusive, inferiores a 20 mmHg, enquanto os animais do grupo MCT não tratados apresentavam valores três vezes maior. O mesmo foi mostrado por Ferraz e colaboradores (2020). Fato interessante é que, nos animais controle que receberam só o tratamento com a substância X, não foi observada alteração na PSVD, que também se manteve em torno de 20 mmHg.

É importante ressaltar que, o uso de substâncias vasodilatadoras no tratamento da HAP deve ser administrado com cautela, pois elas podem causar hipotensão sistêmica, agravando ainda mais a disfunção pulmonar (Fox et al., 2018; Reffelmann & Kloner, 2006). Dados prévios do nosso grupo já haviam demonstrado que a substância X é eficiente em reduzir a PSVD, porém, sem nenhum efeito hipotensor sistêmico (valores de pressão sistêmica sistólica, diastólica e média não se alteraram), tanto em animais com HAP, quanto em animais normotensos. Agora, demonstramos que os animais normotensos tratados com a substância X também não sofreram alterações na PSVD.

Em relação aos parâmetros biométricos, não foi observada diferença significativa entre os grupos quanto ao peso relativo do coração; porém, o VD dos animais hipertensos não tratados mostraram aumento significativo comparado aos demais, ao final dos 28 dias, indicando hipertrofia ventricular direita, característica da HAP. O grupo hipertenso tratado com substância X também apresentou aumento no tamanho do VD, porém, em intensidade menor que a apresentada pelos animais do grupo MCT. Esse dado sugere que o VD dos animais desse grupo pode ter iniciado a hipertrofia no período anterior ao início do tratamento, e a substância X preveniu a progressão desse quadro. A menor hipertrofia do VD pode estar associada à redução da sobrecarga de pressão, decorrente do vasorelaxamento induzido pelo ativador de canal BK_{Ca} . Adicionalmente, a redução no remodelamento cardíaco e vascular pode estar associada à hiperpolarização causada pela ativação dos canais BK_{Ca} , a qual tem efeito antiproliferativo e apoptótico, por diminuir a atividade dos canais de Ca^{2+} tipo L, o que reduz o influxo de Ca^{2+} e, conseqüentemente, diminui a concentração de Ca^{2+} nas células cardíacas e vasculares (Ferraz et al., 2020.; Krick et al., 2001; Revermann et al., 2014; Yun et al., 2010).

Em relação ao peso relativo do pulmão, foi observado aumento nos dois grupos de animais hipertensos (MCT e MCT+ α BK). Diferente do observado por Ferraz e colaboradores (2020), a substância X não reverteu esse parâmetro, sugerindo uma possível congestão pulmonar. O peso relativo do fígado não apresentou diferença entre os grupos, exceto o grupo controle tratado, cujo aumento foi significativo. Na HAP, com o aumento da resistência vascular pulmonar e consequente sobrecarga e disfunção do VD, é esperado o aumento de volume e peso desses órgãos, dificultando a difusão de O₂, causando dispneia e induzindo atrofia dos hepatócitos (Naeije et al., 2022). Neste estudo, o aumento do peso relativo do fígado foi observado somente no grupo controle tratado. Para confirmar se essa alteração, de fato, ocorre, seria necessário realizar a relação entre o peso seco e peso úmido do órgão, já que nenhum dos demais grupos apresentou o mesmo padrão.

Na HAP, é bem conhecido o aumento do tônus vascular, com diminuição da capacidade vasodilatadora, especialmente pela redução da biodisponibilidade de NO (Vazquez & Klinger, 2020). Estudos mostram que artérias pulmonares de ratos com HAP induzida por monocrotalina são menos responsivas à acetilcolina (Ferraz et al., 2020; Pereira et al., 2013), o que não foi observado neste estudo. Aqui, a análise da reatividade dos anéis de artéria pulmonar mostrou que as curvas concentração-resposta à acetilcolina dos quatro grupos foram semelhantes entre si. Um mecanismo que, possivelmente, explicaria o relaxamento observado no grupo MCT, seria uma maior sensibilização da musculatura lisa vascular, frente à disfunção endotelial (Shiraki et al., 2001); porém, esse experimento precisaria ser realizado novamente. Comparando os IC₅₀, observamos que as artérias pulmonares dos animais que receberam o tratamento com a substância X, tanto os hipertensos quanto os controles, apresentaram maior capacidade de relaxamento (menor IC₅₀; 2.41 μ M e 2.14 μ M, respectivamente), sugerindo que a ativação crônica de canais BK_{Ca} melhora a função endotelial.

Quando os anéis de artéria pulmonar foram estimulados com concentrações crescentes de nitroprussiato, um doador de NO (Friederich & Butterworth, 1995), todos os grupos apresentaram, em determinada concentração máxima, relaxamento de 100%. O grupo hipertenso-não tratado (MCT) apresentou o menor IC₅₀ (6 nM). Os grupos controle (CTRL) e hipertenso tratado (MCT+ α BK) mostraram valores similares de IC₅₀ (27.6 e 28 nM), enquanto o grupo controle tratado (CTRL+ α BK) apresentou o

maior IC_{50} (72.9 nM). Este resultado sugere que no grupo controle tratado houve liberação excessiva de NO e a alta concentração de NO pode ter levado a produção de peroxinitrito, uma espécie reativa de oxigênio que contribui para alterações na função vascular (Griendling et al., 2021; Tousoulis et al., 2012).

O relaxamento de anéis de artéria pulmonar foi também estimulado com concentrações crescentes da substância X. Este protocolo foi realizado na ausência e na presença de ODQ, um potente e seletivo inibidor da guanilato ciclase solúvel (sGC). O NO se liga à sGC, que então catalisa a conversão de GTP em GMP cíclico, que ativa a proteína quinase G, levando à redução do tônus vascular. Portanto, o ODQ inibe esse mecanismo, impedindo o relaxamento vascular (Dupont et al., 2014; Tousoulis et al., 2012).

Na ausência do ODQ, os anéis de artéria pulmonar de todos os grupos responderam de forma semelhante, mostrando que o relaxamento induzido pela substância X foi independente do tratamento prévio recebido pelos animais dos diferentes grupos experimentais. Já na presença de ODQ, a vasodilatação promovida pela substância X foi drasticamente reduzida (aproximadamente, cinco vezes menor), mostrando a importância do NO na vasodilatação mediada pela ativação do canal BK_{Ca} . Além disso, mostra a importância da ativação do canal BK_{Ca} na modulação do tônus vascular.

Na HAP, outro fator importante na sua patogênese é a disfunção mitocondrial. As mitocôndrias são a principal fonte produtora de energia no organismo, e alterações em sua função levam, entre outras mudanças metabólicas, ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo, maximização de respostas inflamatórias e desordens celulares na vasculatura pulmonar (Zhang et al., 2022). Na base dessas alterações, está a cadeia transportadora de elétrons, formada por uma série de complexos que permitem o fluxo de elétrons através deles, gerando um gradiente de prótons, necessário para a síntese do ATP. Estudos diversos já demonstraram que na HAP, tanto em pacientes humanos quanto em modelos animais, ocorrem modificações na atividade/expressão dos complexos da cadeia transportadora (Rafikov et al., 2015; Rafikova et al., 2018)

Na HAP, o aumento da resistência vascular pulmonar aumenta a pós-carga do ventrículo direito, levando à hipertrofia e insuficiência cardíaca direita (Cassady &

Ramani, 2020; Singh & Lakshminrusimha, 2021). A disfunção mitocondrial é o principal contribuinte para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca (Murphy, 2016). Neste estudo, avaliamos se o tratamento com o ativador de canais BK_{Ca} previne a disfunção mitocondrial em cardiomiócitos de ratos com HAP induzida por monocrotalina.

Adicionalmente, avaliamos em mitocôndrias isoladas de corações de camundongos, o efeito direto da ativação de canais BK_{Ca} pela substância X sobre a função mitocondrial em condições de normóxia ou hipóxia/reoxigenação. Observamos que, na ausência de Ca^{2+} , o consumo de O_2 mitocondrial do grupo αBK foi menor nos estados II e III do complexo I, e II do complexo II, quando comparados aos seus respectivos controles. Nessa mesma condição, o grupo αBK mostrou menor produção de ATP, maior produção de ROS, maior razão ROS/ATP e maior extravasamento de prótons, sugerindo que a ativação dos canais BK_{Ca} foi capaz de reduzir a função mitocondrial. Em estudos envolvendo a atividade da cadeia e seus complexos em cardiomiócitos de animais com HAP experimental, foi visto que a atividade do complexo II estava aumentada, levando ao aumento na produção de ROS (Mouchaers et al., 2009; Redout et al., 2007). Assim, esse dado implicaria que a diminuição da atividade do complexo II gerada pela ativação do canal BK_{Ca} poderia promover alguma espécie de proteção quanto ao desenvolvimento da HAP.

De forma interessante, observamos que o a ativação dos canais BK_{Ca} levou ao aumento na produção de ROS. Estudos sugerem que a abertura do mito BK_{Ca} , frente a um influxo submáximo de potássio (através do ativador NS1619), causa a produção de ROS, como resposta a um aumento no fluxo de elétrons (Heinen et al., 2007). Apesar de ser amplamente reconhecido que aumento do nível de ROS causa danos teciduais, há certo nível de aumento de ROS considerado benéfico, necessário para estimular a capacidade antioxidante celular, além de induzir a produção de enzimas antioxidantes (Huang & Li, 2020; Raaz et al., 2014).

Não foram observadas diferenças entre os grupos no consumo de O_2 pelo complexo IV, indicando que as mitocôndrias exibiram viabilidade semelhante (desacoplamento máximo) entre os grupos.

Na presença de 5 nM de Ca^{2+} , nos estados II e III do complexo I, a manobra de hipóxia/reoxigenação reduziu significativamente o consumo de O_2 pelas mitocôndrias

do grupo controle, enquanto no grupo α BK, a ativação do canal pela substância X preveniu esse evento. Em relação a produção de ATP, o grupo controle se apresentou significativamente maior em relação ao grupo α BK. A hipóxia/reoxigenação minimizou essa produção, e a ativação do canal BK_{Ca} reduziu esse efeito; quanto a produção de ROS, a do grupo controle foi menor, enquanto a hipóxia/reoxigenação estimulou o aumento na quantidade de ROS. A ativação do canal BK_{Ca} também preveniu esse aumento. O mesmo foi observado na relação ATP/ROS e no extravasamento de prótons. Esses dados mostram que, no estado de normóxia, a ativação do canal mito BK_{Ca} reduziu a função mitocondrial, enquanto em presença de hipóxia/reoxigenação a ativação do canal levou a um pré-condicionamento da mitocôndria, melhorando as suas funções. Isso sugere que a ativação do canal conferiu estabilidade a mitocôndria, de forma a manter suas funções preservadas, especialmente frente a um estímulo danoso, como a hipóxia.

A hipóxia é um importante fator na patogênese da HAP. Nesse estado, os canais iônicos mitocondriais da vasculatura pulmonar são drasticamente afetados, alterando diversas funções nas mitocôndrias, como a fosforilação oxidativa, a síntese de ATP, a proliferação celular e apoptose (Wang et al., 2021; Zhang et al., 2022). A capacidade de reversão dos efeitos promovidos pela manobra de hipóxia/reoxigenação, observados com a ativação dos canais BK_{Ca} pela substância X, nos sugere que, assim como os demais canais de K^+ mitocondriais, o BK_{Ca} também é responsável por manter a estabilidade mitocondrial, garantindo a expressão de enzimas relacionadas ao metabolismo energético e proteção celular. Assim, nossos dados sugerem que, de forma semelhante ao do canal K_{ATP} mitocondrial, a ativação dos canais BK_{Ca} mitocondriais pode reduzir o metabolismo das mitocôndrias, quando em situação patológica, como a hipóxia na HAP, protegendo as mitocôndrias de alterações funcionais e eventos isquêmicos (Heinzel et al., 2005; Heusch et al., 2015; Zhang et al., 2022).

A ativação do canal BK_{Ca} pela substância X também minimizou a turgescência mitocondrial, seja induzido por $10 \mu M$ de Ca^{2+} , por oligomicina ou por hipóxia/reoxigenação, além de prevenir a despolarização induzida pelo Ca^{2+} . Esses resultados sugerem que o influxo de K^+ gerado pelos canais BK_{Ca} causou despolarização da membrana interna e, conseqüentemente, reduziu o impulso de entrada de Ca^{2+} nas mitocôndrias, atenuando a turgescência e a despolarização do

potencial transmembrana. O Ca^{2+} é um íon essencial para o metabolismo celular e, assim como o retículo, a mitocôndria também tem capacidade de armazená-lo. Apesar de ser essencial para diversos processos na mitocôndria (como a produção de ATP), em situações patológicas, como a HAP, o aumento excessivo na concentração do Ca^{2+} intracelular – assim como de ROS – são fatores que podem promover a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP); quando aberto, a água, íons e outras moléculas com até 1,5 kDa tem livre passagem para o interior da matriz mitocondrial, “inchando” a organela e modificando sua estrutura – a turgescência. Essas alterações culminam no processo de apoptose (Skulachev, 1996; Wakabayashi & Karbowski, 2001).

Por último, foi observado que a ativação do canal BK_{Ca} despolarizou rapidamente $\Delta\Psi$ mitocondrial, visto pela redução na fluorescência do TMRM, sem despolarização progressiva. Também, a capacidade de retenção de Ca^{2+} das mitocôndrias foi avaliada, mostrando que a substância X impediu a absorção do Ca^{2+} . No momento em que alguns pulsos de Ca^{2+} eram fornecidos às mitocôndrias, seguidos de exposição à substância X, houve aumento na fluorescência, porém, sem adição de mais Ca^{2+} . Isso sugere que havia alguma quantidade de Ca^{2+} sendo liberada das mitocôndrias quando em presença do ativador do canal BK_{Ca} . Fato interessante é que, quando as mitocôndrias foram incubada com a substância X, a IbTx não bloqueou esse efeito. Isso pode ter ocorrido devido a concentração de IbTx utilizada; como o canal se localiza na membrana interna da mitocôndria, a concentração em questão não foi suficiente para atingir o canal.

Esses dados mostram que a ativação dos canais BK_{Ca} pela substância X impediu a captação de Ca^{2+} pelas mitocôndrias, além de expulsar o Ca^{2+} previamente absorvido. Isso é particularmente curioso, uma vez que o aumento na concentração de Ca^{2+} pode ativar os mecanismos associados à formação e abertura do MPTP, e seus efeitos prejudiciais consequentes. Mecanicamente, o Ca^{2+} pode ter sido extrudado devido à abertura do MPTP. No entanto, é conhecido que essa abertura gera dissipação do gradiente eletroquímico de prótons, assim como interrupção na síntese de ATP (Szabo & Zoratti, 2014) – o que não foi observado em nosso estudo. O ativador de canal BK_{Ca} preservou as funções mitocondriais, manteve a turgescência e o potencial de membrana em valores mais próximos aos das mitocôndrias controle do que das que passaram por hipóxia/reoxigenação.

Estudos já demonstraram que o MPTP expela Ca^{2+} , e o modo reverso do uniportador deste íon também pode ter essa função (De Marchi et al., 2014; Montero et al., 2001). O uniportador é considerado um transportador que permite a entrada do Ca^{2+} na matriz interna da mitocôndria, com baixa seletividade ao íon. Essa seletividade aumenta à medida que a concentração de Ca^{2+} citosólico também aumenta (Szabo & Zoratti, 2014). Montero e colaboradores (2001) demonstraram que o uniportador pode liberar Ca^{2+} em seu modo reverso, dependendo da concentração de Ca^{2+} extramitocondrial e de uma alta concentração de K^+ no interior da mitocôndria.

A figura 29 é um resumo gráfico representando os mecanismos propostos pela ativação do canal BK_{Ca} neste trabalho.

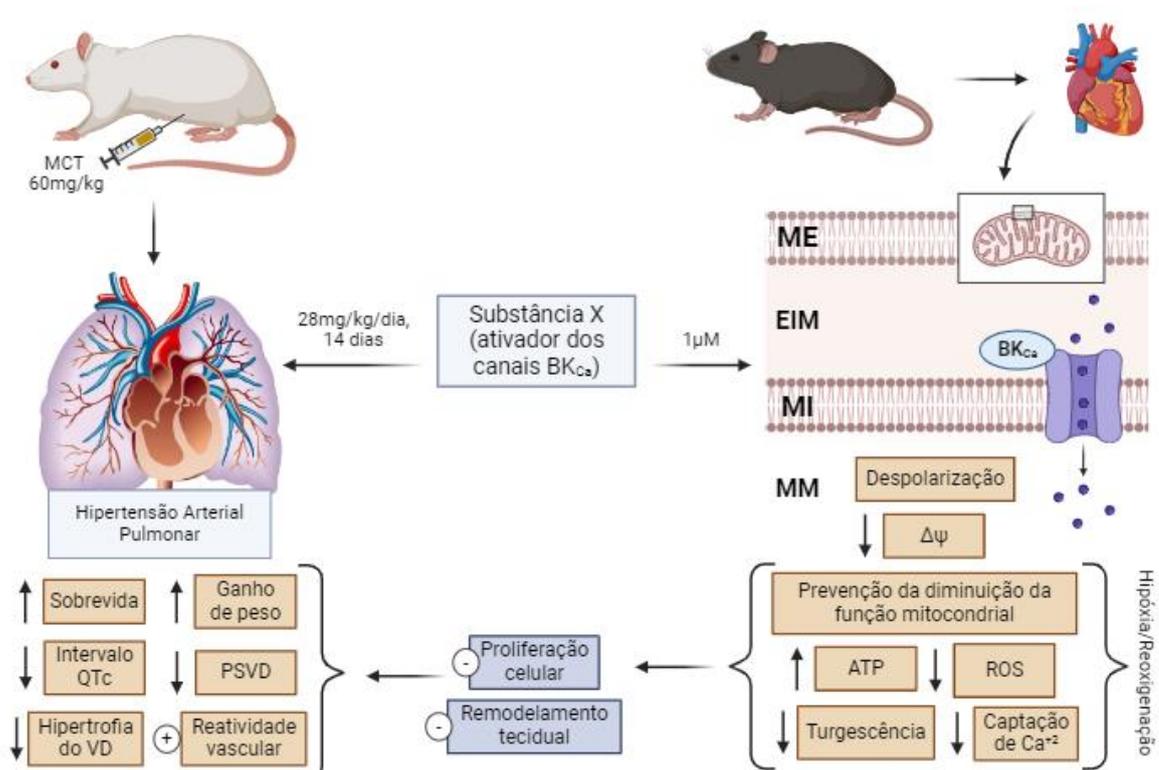


Figura 29. Resumo gráfico dos experimentos realizados. Em ratos com HAP induzida por MCT, o tratamento diário, por 14 dias, com a substância X (ativador dos canais BK_{Ca}) melhorou a sobrevivência dos animais, o ganho de peso, a reatividade da artéria pulmonar, reduziu a duração do intervalo QTc, a PSVD e a hipertrofia do VD; também, o mesmo ativador, em mitocôndrias isoladas de cardiomiócitos de camundongos, frente a hipóxia/reoxigenação, preveniu a perda de função mitocondrial, aumentando a produção de ATP e diminuindo a produção de ROS, turgescência e captação de Ca^{2+} . A melhora das funções mitocondriais leva a menor proliferação celular e melhora do remodelamento tecidual, características que são importantes na patogênese da HAP. MCT = monocrotoalina; HAP = hipertensão arterial pulmonar; PSVD = pressão sistólica do ventrículo direito; VD = ventrículo direito; ME = membrana externa; EIM = espaço intermembranar; MI = membrana interna; MM = matriz mitocondrial.

8. CONCLUSÕES

Os efeitos terapêuticos da substância X, pela ativação de canais BK_{Ca} nas células vasculares e cardíacas, propiciou ação anti-hipertensiva na vasculatura pulmonar, inibindo o desenvolvimento de hipertrofia mal adaptativa do ventrículo direito, prevenindo a insuficiência cardíaca direita e consequentes alterações elétricas cardíacas, além de prevenir alterações no metabolismo mitocondrial, resultando assim em maior sobrevida dos animais.

9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

- Embora a HAP induzida por monocrotalina em ratos machos seja um modelo padrão para o estudo da doença, este tem como limitação o fato de não gerar lesões plexiformes, característica da doença em humano. Na proposta inicial, pretendíamos repetir o estudo em outro modelo experimental de HAP, no caso o modelo de HAP induzida por hipóxia e SUGEN, mas, o período de pandemia do covid-19 e o aumento do custo de importação do SUGEN impôs o adiamento da implantação desse outro modelo de HAP em nosso laboratório.
- Os dados de avaliação da função mitocondrial em corações de ratos hipertensos tratados com a substância X ficaram incompletos, pois quando os animais dos grupos experimentais foram eutanasiados, os eletrodos do oxímetro se danificaram, impedindo realizar os ensaios de respiração mitocondrial. A importação de novos eletrodos demorou aproximadamente seis meses e com a limitação do prazo para defesa de tese não foi possível repetir atualmente esses experimentos.
- A similaridade na resposta vasodilatadora a acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio entre os grupos, na avaliação da reatividade vascular, pode ter ocorrido devido ao pequeno número de animais ($n = 3$) nesse experimento.

10. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Mais estudos acerca da atividade mitocondrial frente a ativação do canal BK_{Ca} pela substância X, como por exemplo, expondo as mitocôndrias a MCTP, e

observando o efeito direto do metabólito sobre elas e se o ativador ainda é capaz de modulá-lo.

- Estudos *in vivo* para o conhecimento das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas da substância X.
- Avaliação da função mitocondrial em corações de ratos hipertensos tratados com a substância X, assim como aumento do n experimental para os dados de reatividade vascular.

REFERÊNCIAS

- Antigny, F., Mercier, O., Humbert, M., & Sabourin, J. (2020). Excitation-contraction coupling and relaxation alteration in right ventricular remodelling caused by pulmonary arterial hypertension. In *Archives of Cardiovascular Diseases* (Vol. 113, Issue 1, pp. 70–84). Elsevier Masson SAS.
<https://doi.org/10.1016/j.acvd.2019.10.009>
- Artigo Original Artigo Original Artigo Original Artigo Original Artigo Original Artigo Original*. (n.d.).
- Attanasio, U., Cuomo, A., Pirozzi, F., Loffredo, S., Abete, P., Petretta, M., Marone, G., Bonaduce, D., de Paulis, A., Rossi, F. W., Tocchetti, C. G., & Mercurio, V. (n.d.). *Molecular Sciences Pulmonary Hypertension Phenotypes in Systemic Sclerosis: The Right Diagnosis for the Right Treatment*.
<https://doi.org/10.3390/ijms21124430>
- Badagliacca, R., Poscia, R., Pezzuto, B., Nocioni, M., Mezzapesa, M., Francone, M., Giannetta, E., Papa, S., Gambardella, C., Sciomer, S., Volterrani, M., Fedele, F., & Dario Vizza, C. (2015). Right ventricular remodeling in idiopathic pulmonary arterial hypertension: Adaptive versus maladaptive morphology. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, *34*(3), 395–403.
<https://doi.org/10.1016/j.healun.2014.11.002>
- Balderas, E., Zhang, J., Stefani, E., & Toro, L. (2015). Mitochondrial BKCa channel. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 6, Issue MAR). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00104>
- Barberà, J. A., Román, A., Gómez-Sánchez, M. Á., Blanco, I., Otero, R., López-Reyes, R., Otero, I., Pérez-Peñate, G., Sala, E., & Escribano, P. (2018). Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension: Summary of Recommendations. *Archivos de Bronconeumología*, *54*(4), 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2017.11.014>
- Barenco-Marins, T. S., Seara, F. A. C., Ponte, C. G., & Nascimento, J. H. M. (2023). Pulmonary Circulation Under Pressure: Pathophysiological and Therapeutic Implications of BK Channel. In *Cardiovascular Drugs and Therapy*. Springer.
<https://doi.org/10.1007/s10557-023-07503-7>
- Benoist, D., Stones, R., Drinkhill, M. J., Benson, A. P., Yang, Z., Cassan, C., Gilbert, S. H., Saint, D. A., Cazorla, O., Steele, D. S., Rernus, O., & White, E. (2012). Cardiac arrhythmia mechanisms in rats with heart failure induced by pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *302*(11). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01084.2011>
- Bentzen, B. H., Olesen, S. P., Rønn, L. C. B., & Grønnet, M. (2014). BK channel activators and their therapeutic perspectives. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 5,

- Issue OCT). Frontiers Research Foundation.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00389>
- Bonnet, S., Savineau, J. P., Barillot, W., Dubuis, E., Vandier, C., & Bonnet, P. (2003). Role of Ca²⁺-sensitive K⁺ channels in the remission phase of pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary diseases. *Cardiovascular Research*, *60*(2), 326–336. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(03\)00527-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(03)00527-3)
- Boucherat, O., Agrawal, V., Lawrie, A., & Bonnet, S. (2022). The Latest in Animal Models of Pulmonary Hypertension and Right Ventricular Failure. In *Circulation Research* (Vol. 130, Issue 9, pp. 1466–1486). Lippincott Williams and Wilkins.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.319971>
- Boucherat, O., Chabot, S., Antigny, F., Perros, F., Provencher, S., & Bonnet, S. (2015). Potassium channels in pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal*, *46*(4), 1167–1177. <https://doi.org/10.1183/13993003.00798-2015>
- Boucherat, O., Vitry, G., Trinh, I., Paulin, R., Provencher, S., & Bonnet, S. (2017). The cancer theory of pulmonary arterial hypertension. In *Pulmonary Circulation* (Vol. 7, Issue 2, pp. 285–299). Bellwether Publishing, Ltd.
<https://doi.org/10.1177/2045893217701438>
- Brand, M. D. (2016). Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 100, pp. 14–31). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001>
- Buchwalow, I., Cacanyiova, S., Neumann, J., Samoilova, V., Boecker, W., & Kristek, F. (n.d.). *The non-obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*.
- Bueno-Beti, C., Sassi, Y., Hajjar, R. J., & Hadri, L. (2018). Pulmonary artery hypertension model in rats by monocrotaline administration. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1816, pp. 233–241). Humana Press Inc.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8597-5_18
- Cansu, D. Ü., & Korkmaz, C. (2023). Pulmonary hypertension in connective tissue diseases: epidemiology, pathogenesis, and treatment. In *Clinical Rheumatology* (Vol. 42, Issue 10, pp. 2601–2610). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s10067-022-06446-y>
- Carraro, M., & Bernardi, P. (2023). The mitochondrial permeability transition pore in Ca²⁺ homeostasis. *Cell Calcium*, *111*.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2023.102719>

- Cassady, S., & Ramani, G. V. (2020). Right Heart Failure in Pulmonary Hypertension. In *Cardiology Clinics* (Vol. 38, Issue 2, pp. 243–255). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2020.02.001>
- Chen, C. Y., Hung, C. C., Chiang, C. H., Tsa, Y. C., Fu, Y. J., Wang, C. L., Tsai, F. T., Tai, H. Y., Lin, K. C., Hung, W. T., Kuo, S. H., & Huang, W. C. (2022). Pulmonary arterial hypertension in the elderly population. In *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA* (Vol. 85, Issue 1, pp. 18–23). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1097/JCMA.0000000000000658>
- Chen, R., Zhong, W., Shao, C., Liu, P., Wang, C., Wang, Z., Jiang, M., Lu, Y., Yan, J., & Docosahexaenoic, Y. J. (2018). Docosahexaenoic acid inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension via attenuating endoplasmic reticulum stress and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *314*, 243–255. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00046.2017.-Endoplasmic>
- Cheron, C., McBride, S. A., Antigny, F., Girerd, B., Chouchana, M., Chaumais, M. C., Jaïs, X., Bertoletti, L., Sitbon, O., Weatherald, J., Humbert, M., & Montani, D. (2021). Sex and gender in pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Review*, *30*(162). <https://doi.org/10.1183/16000617.0330-2020>
- Cobb, A., & Thornton, L. (2018). Sodium Nitroprusside as a Hyperinflation Drug and Therapeutic Alternatives. *Journal of Pharmacy Practice*, *31*(4), 374–381. <https://doi.org/10.1177/0897190018776396>
- Cober, N. D., Vandenbroek, M. M., Ormiston, M. L., & Stewart, D. J. (2022). Evolving Concepts in Endothelial Pathobiology of Pulmonary Arterial Hypertension. In *Hypertension* (Vol. 79, Issue 8, pp. 1580–1590). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.122.18261>
- Culley, M. K., & Chan, S. Y. (2018). Mitochondrial metabolism in pulmonary hypertension: Beyond mountains there are mountains. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 128, Issue 9, pp. 3704–3715). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI120847>
- Cullivan, S., Higgins, M., & Gaine, S. (2022). Diagnosis and management of pulmonary arterial hypertension. In *Breathe* (Vol. 18, Issue 4). European Respiratory Society. <https://doi.org/10.1183/20734735.0168-2022>
- Cullivan, S., Lennon, D., Meghani, S., Minnock, C., McCullagh, B., & Gaine, S. (2022). Incidence and outcomes of pulmonary hypertension in the Ireland. *BMJ Open Respiratory Research*, *9*(1), e001272. <https://doi.org/10.1136/bmjresp-2022-001272>
- Dasgupta, A., Wu, D., Tian, L., Xiong, P. Y., Dunham-Snary, K. J., Chen, K., Alizadeh, E., Motamed, M., Potus, F., Hindmarch, C. C. T., & Archer, S. L. (2020). Mitochondria in the Pulmonary Vasculature in Health and Disease:

- Oxygen-Sensing, Metabolism, and Dynamics. In *Comprehensive Physiology* (pp. 713–765). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cphy.c190027>
- De Marchi, E., Bonora, M., Giorgi, C., & Pinton, P. (2014). The mitochondrial permeability transition pore is a dispensable element for mitochondrial calcium efflux. *Cell Calcium*, *56*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.03.004>
- Dresdale, D. T., Schultz, M., Michtom, R. J., & York, N. (n.d.). *Primary Pulmonary Hypertension* I. Clinical and Hemoenamic Study*.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. In *Physiological Reviews* (Vol. 82, Issue 1, pp. 47–95). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Dumas De La Roque, E., Quignard, J. F., Ducret, T., Dahan, D., Courtois, A., Begueret, H., Marthan, R., & Savineau, J. P. (2013). Beneficial effect of dehydroepiandrosterone on pulmonary hypertension in a rodent model of pulmonary hypertension in infants. *Pediatric Research*, *74*(2), 163–169. <https://doi.org/10.1038/pr.2013.73>
- Dumas de La Roque, E., Savineau, J. P., Metivier, A. C., Billes, M. A., Kraemer, J. P., Doutreleau, S., Jougon, J., Marthan, R., Moore, N., Fayon, M., Baulieu, É. É., & Dromer, C. (2012). Dehydroepiandrosterone (DHEA) improves pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): A pilot study. *Annales d'Endocrinologie*, *73*(1), 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2011.12.005>
- Dupont, L. L., Glynos, C., Bracke, K. R., Brouckaert, P., & Brusselle, G. G. (2014). Role of the nitric oxide-soluble guanylyl cyclase pathway in obstructive airway diseases. In *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 29, Issue 1, pp. 1–6). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2014.07.004>
- Edwards, G., Niederste-Hollenberg, A., Schneider, J., Noack, T., & Weston, A. H. (1994). Ion channel modulation by NS 1619, the putative BKCa channel opener, in vascular smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, *113*(4), 1538–1547. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1994.tb17171.x>
- Evans, C. E., Cober, N. D., Dai, Z., Stewart, D. J., & Zhao, Y. Y. (2021). Endothelial cells in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. In *European Respiratory Journal* (Vol. 58, Issue 3). European Respiratory Society. <https://doi.org/10.1183/13993003.03957-2020>
- Evanson, K. W., Bannister, J. P., Leo, M. D., & Jaggar, J. H. (2014). LRRC26 is a functional BK channel auxiliary γ subunit in arterial smooth muscle cells. *Circulation Research*, *115*(4), 423–431. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.303407>

- Farrukh, I. S., Peng, W., Orlinska, U., & Hoidal, J. R. (1998). *Effect of dehydroepiandrosterone on hypoxic pulmonary vasoconstriction: a Ca²⁺-activated K-channel opener*.
- Ferraz, A. P., Seara, F. A. C., Baptista, E. F., Barenco, T. S., Sottani, T. B. B., Souza, N. S. C., Domingos, A. E., Barbosa, R. A. Q., Takiya, C. M., Couto, M. T., Resende, G. O., Campos De Carvalho, A. C., Ponte, C. G., Hamilton, J., & Nascimento, M. (n.d.). *BK Ca Channel Activation Attenuates the Pathophysiological Progression of Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Wistar Rats*. <https://doi.org/10.1007/s10557-020-07115-5>/Published
- Fox, C. J., Cornett, E. M., Hart, B. M., Kaye, A. J., Patil, S. S., Turpin, M. C., Valdez, A., Urman, R. D., & Kaye, A. D. (2018). Pulmonary vasodilators: Latest evidence and outcomes in the perioperative setting. In *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology* (Vol. 32, Issue 2, pp. 237–250). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2018.06.006>
- Francis, M., Xu, N., Zhou, C., & Stevens, T. (2016). Transient Receptor Potential Channel 4 Encodes a Vascular Permeability Defect and High-Frequency Ca²⁺ Transients in Severe Pulmonary Arterial Hypertension. *American Journal of Pathology*, 186(6), 1701–1709. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.02.002>
- Frankenreiter, S., Bednarczyk, P., Kniess, A., Bork, N. I., Straubinger, J., Koprowski, P., Wrzosek, A., Mohr, E., Logan, A., Murphy, M. P., Gawaz, M., Krieg, T., Szewczyk, A., Nikolaev, V. O., Ruth, P., & Lukowski, R. (2017). cGMP-Elevating Compounds and Ischemic Conditioning Provide Cardioprotection Against Ischemia and Reperfusion Injury via Cardiomyocyte-Specific BK Channels. *Circulation*, 136(24), 2337–2355. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028723>
- Friederich, J. A., & Butterworth, J. F. (n.d.). *Sodium Nitroprusside: Twenty Years and Counting*. <http://journals.lww.com/anesthesia-analgesia>
- Frumpp, A., Prewitt, A., & de Caestecker, M. P. (2018). BMPR2 mutations and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension (2017 Grover Conference Series). In *Pulmonary Circulation* (Vol. 8, Issue 2). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/2045894018765840>
- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373–376. <https://doi.org/10.1038/288373a0>
- Galiè, N., Humbert, M., Vachiery, J. L., Gibbs, S., Lang, I., Torbicki, A., Simonneau, G., Peacock, A., Vonk Noordegraaf, A., Beghetti, M., Ghofrani, A., Gomez Sanchez, M. A., Hansmann, G., Klepetko, W., Lancellotti, P., Matucci, M., McDonagh, T., Pierard, L. A., Trindade, P. T., ... Sirenko, Y. (2016). 2015

- ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *European Heart Journal*, 37(1), 67–119. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv317>
- Galiè, N., McLaughlin, V. v., Rubin, L. J., & Simonneau, G. (2019). An overview of the 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension. *The European Respiratory Journal*, 53(1), 0–3. <https://doi.org/10.1183/13993003.02148-2018>
- Galvez, A., Gimenez-Gallego, G., Reuben, J. P., Roy-Contancin, L., Feigenbaum, P., Kaczorowski, G. J., & Garcia, M. L. (1990). Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *Journal of Biological Chemistry*, 265(19), 11083–11090. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)38560-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)38560-6)
- Garbincius, J. F., & Elrod, J. W. (2022). MITOCHONDRIAL CALCIUM EXCHANGE IN PHYSIOLOGY AND DISEASE. In *Physiological Reviews* (Vol. 102, Issue 2, pp. 893–992). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2020>
- Garg, L., Akbar, G., Agrawal, S., Agarwal, M., Khaddour, L., Handa, R., Garg, A., Shah, M., Patel, B., & Dalal, B. D. (2017). Drug-induced pulmonary arterial hypertension: a review. In *Heart Failure Reviews* (Vol. 22, Issue 3, pp. 289–297). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s10741-017-9612-9>
- Giangiaco, K. M., Kamassah, A., Harris, G., & Mcmanus, O. B. (1998). Mechanism of Maxi-K Channel Activation by Dehydrosoyasaponin-I. In *J. Gen. Physiol* (Vol. 112). <http://www.jgp.org>
- Gomez-Arroyo, J. G., Farkas, L., Alhussaini, A. A., Farkas, D., Kraskauskas, D., Voelkel, N. F., Bogaard, H. J., & Voelkel, N. F. (2012). The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 302, 363–369. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00212.2011.-Severe>
- Gore, V. K., Ma, V. V., Yin, R., Ligutti, J., Immke, D., Doherty, E. M., & Norman, M. H. (2010). Structure-activity relationship (SAR) investigations of tetrahydroquinolines as BKCa agonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20(12), 3573–3578. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.04.125>
- Griendling, K. K., Camargo, L. L., Rios, F. J., Alves-Lopes, R., Montezano, A. C., & Touyz, R. M. (2021). Oxidative Stress and Hypertension. In *Circulation Research* (Vol. 128, Issue 7, pp. 993–1020). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318063>
- Guan, S., Zhao, L., & Peng, R. (2022). Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes: From Structure to Function. In *International Journal of*

Molecular Sciences (Vol. 23, Issue 22). MDPI.
<https://doi.org/10.3390/ijms232213880>

- Heinen, A., S Camara, A. K., Aldakkak, M., Rhodes, S. S., Riess, M. L., & Stowe, D. F. (2007). Mitochondrial Ca²⁺-induced K⁺ influx increases respiration and enhances ROS production while maintaining membrane potential Stowe DF. Mitochondrial Ca²⁺-induced K⁺ influx increases respiration and enhances ROS production while maintaining membrane potential. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292, 148–156. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00215.2006.-We>
- Heinzel, F. R., Luo, Y., Li, X., Boengler, K., Buechert, A., García-Dorado, D., Di Lisa, F., Schulz, R., & Heusch, G. (2005). Impairment of Diazoxide-Induced Formation of Reactive Oxygen Species and Loss of Cardioprotection in Connexin 43 Deficient Mice. *Circulation Research*, 97(6), 583–586. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000181171.65293.65>
- Heusch, G., Bøtker, H. E., Przyklenk, K., Redington, A., & Yellon, D. (2015). Remote Ischemic Conditioning. *Journal of the American College of Cardiology*, 65(2), 177–195. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.10.031>
- Hill, M. A., Yang, Y., Ella, S. R., Davis, M. J., & Braun, A. P. (2010). Large conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channels (BKCa) and arteriolar myogenic signaling. In *FEBS Letters* (Vol. 584, Issue 10, pp. 2033–2042). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.02.045>
- Hill, N. S., Gillespie, M. N., & McMurtry, I. F. (2017). Fifty Years of Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension: What Has It Meant to the Field? In *Chest* (Vol. 152, Issue 6, pp. 1106–1108). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.10.007>
- Hoepfer, M. M., Ghofrani, H. A., Grünig, E., Klose, H., Olschewski, H., & Rosenkranz, S. (2017). Pulmonary hypertension. *Deutsches Arzteblatt International*, 114(5), 73–84. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2017.0073>
- Hong-Liang, Z., Qin, L., Zhi-Hong, L., Zhi-Hui, Z., Chang-Ming, X., Xin-Hai, N., Jian-Guo, H., Ying-Jie, W., & Shu, Z. (2009). Heart rate-corrected QT interval and QT dispersion in patients with pulmonary hypertension. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 121(9–10), 330–333. <https://doi.org/10.1007/s00508-009-1184-9>
- Hoshi, T., Tian, Y., Xu, R., Heinemann, S. H., & Hou, S. (2013). Mechanism of the modulation of BK potassium channel complexes with different auxiliary subunit compositions by the omega-3 fatty acid DHA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(12), 4822–4827. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222003110>

- Hu, Y., Chi, L., Kuebler, W. M., & Goldenberg, N. M. (2020). Perivascular Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. In *Cells* (Vol. 9, Issue 11). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9112338>
- Huai, X., Sun, Y., Sun, X., Wu, W., Wang, L., Jiang, R., Gong, S., Li, J., Miao, Y., Yuan, P., & Zhao, Q. (2021). The effect of docosahexaenoic acid on predicting the survival of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Annals of Translational Medicine*, 9(12), 995–995. <https://doi.org/10.21037/atm-21-2479>
- Huang, M. Z., & Li, J. Y. (2020). Physiological regulation of reactive oxygen species in organisms based on their physicochemical properties. In *Acta Physiologica* (Vol. 228, Issue 1). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/apha.13351>
- Hudson, J., & Farkas, L. (2021). Epigenetic regulation of endothelial dysfunction and inflammation in pulmonary arterial hypertension. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222212098>
- Huertas, A., Perros, F., Tu, L., Cohen-Kaminsky, S., Montani, D., Dorfmüller, P., Guignabert, C., & Humbert, M. (2014). Immune dysregulation and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension: A complex interplay. *Circulation*, 129(12), 1332–1340. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004555>
- Huertas, A., Tu, L., & Guignabert, C. (2017). New targets for pulmonary arterial hypertension: Going beyond the currently targeted three pathways. In *Current Opinion in Pulmonary Medicine* (Vol. 23, Issue 5, pp. 377–385). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000404>
- Humbert, M., Guignabert, C., Bonnet, S., Dorfmüller, P., Klinger, J. R., Nicolls, M. R., Olschewski, A. J., Pullamsetti, S. S., Schermuly, R. T., Stenmark, K. R., & Rabinovitch, M. (2019). Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives. *The European Respiratory Journal*, 53(1). <https://doi.org/10.1183/13993003.01887-2018>
- Humbert, M., Kovacs, G., Hoeper, M. M., Badagliacca, R., Berger, R. M. F., Brida, M., Carlsen, J., Coats, A. J. S., Escribano-Subias, P., Ferrari, P., Ferreira, D. S., Ghofrani, H. A., Giannakoulas, G., Kiely, D. G., Mayer, E., Meszaros, G., Nagavci, B., Olsson, K. M., Pepke-Zaba, J., ... Sivakumaran, K. (2022). 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. In *European Heart Journal* (Vol. 43, Issue 38, pp. 3618–3731). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac237>
- Humbert, M., Sitbon, O., & Simonneau, G. (2004). Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. In *N Engl J Med* (Vol. 351). www.nejm.org
- Hurst, L. A., Dunmore, B. J., Long, L., Crosby, A., Al-Lamki, R., Deighton, J., Southwood, M., Yang, X., Nikolic, M. Z., Herrera, B., Inman, G. J., Bradley, J. R.,

- Rana, A. A., Upton, P. D., & Morrell, N. W. (2017). TNF α drives pulmonary arterial hypertension by suppressing the BMP type-II receptor and altering NOTCH signalling. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14079>
- Huxtable, R. J. (1990). *ACTIVATION AND PULMONARY TOXICITY OF PYRROLIZIDINE ALKALOIDS* (Vol. 47).
- Jaggar, J. H., Porter, V. A., Lederer, W. J., & Nelson, M. T. (2000). Calcium sparks in smooth muscle. In *Am. J. Physiol. Cell Physiol* (Vol. 278). <http://www.ajpcell.org>
- Jardim, C., & Waetge, D. (2018). The importance of the world symposium on pulmonary hypertension. In *Jornal Brasileiro de Pneumologia* (Vol. 44, Issue 3, pp. 173–174). Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. <https://doi.org/10.1590/s1806-37562018000030001>
- Johnson, S. R., Granton, J. T., & Mehta, S. (2006). Thrombotic arteriopathy and anticoagulation in pulmonary hypertension. In *Chest* (Vol. 130, Issue 2, pp. 545–552). American College of Chest Physicians. <https://doi.org/10.1378/chest.130.2.545>
- Kim, D., & George, M. P. (2019). Pulmonary Hypertension. In *Medical Clinics of North America* (Vol. 103, Issue 3, pp. 413–423). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.12.002>
- King, J. T., Lovell, P. V., Rishniw, M., Kotlikoff, M. I., Zeeman, M. L., & McCobb, D. P. (2006). β 2 and β 4 subunits of BK channels confer differential sensitivity to acute modulation by steroid hormones. *Journal of Neurophysiology*, 95(5), 2878–2888. <https://doi.org/10.1152/jn.01352.2005>
- Kowaltowski, A. J., Menezes-Filho, S. L., Assali, E. A., Gonçalves, I. G., Cabral-Costa, J. V., Abreu, P., Miller, N., Nolasco, P., Laurindo, F. R. M., Bruni-Cardoso, A., & Shirihai, O. S. (2019). Mitochondrial morphology regulates organellar Ca²⁺ uptake and changes cellular Ca²⁺ homeostasis. *FASEB Journal*, 33(12), 13176–13188. <https://doi.org/10.1096/fj.201901136R>
- Krick, S., Platoshyn, O., Sweeney, M., Kim, H., X-j Yuan, J., & X-J Yuan, J. (2001). *Activation of K channels induces apoptosis in vascular smooth muscle cells*. <http://www.ajpcell.org>
- Kurakula, K., Smolders, V. F. E. D., Tura-Ceide, O., Wouter Jukema, J., Quax, P. H. A., & Goumans, M. J. (2021). Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension: Cause or consequence? In *Biomedicines* (Vol. 9, Issue 1, pp. 1–23). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9010057>
- Lambert, M., Capuano, V., Olschewski, A., Sabourin, J., Nagaraj, C., Girerd, B., Weatherald, J., Humbert, M., & Antigny, F. (2018). Ion channels in pulmonary

- hypertension: A therapeutic interest? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19103162>
- Lei, J., Vodovotz, Y., Tzeng, E., & Billiar, T. R. (2013). Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system. In *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* (Vol. 35, pp. 175–185). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2013.09.004>
- Leo, M. D., Bannister, J. P., Narayanan, D., Nair, A., Grubbs, J. E., Gabrick, K. S., Boop, F. A., & Jaggar, J. H. (2014). Dynamic regulation of β 1 subunit trafficking controls vascular contractility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(6), 2361–2366. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317527111>
- Li, B., & Gao, T. M. (2016). Functional Role of Mitochondrial and Nuclear BK Channels. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 128, pp. 163–191). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irm.2016.03.018>
- Liu, X. R., Zhang, M. F., Yang, N., Liu, Q., Wang, R. X., Cao, Y. N., Yang, X. R., Sham, J. S. K., & Lin, M. J. (2012). Enhanced store-operated Ca²⁺ entry and TRPC channel expression in pulmonary arteries of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 302(1). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00247.2011>
- Maciel, L., de Oliveira, D. F., Monnerat, G., Campos de Carvalho, A. C., & Nascimento, J. H. M. (2020). Exogenous 10 kDa-Heat Shock Protein Preserves Mitochondrial Function After Hypoxia/Reoxygenation. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00545>
- Mandras, S. A., Mehta, H. S., & Vaidya, A. (2020). Pulmonary Hypertension: A Brief Guide for Clinicians. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 95, Issue 9, pp. 1978–1988). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2020.04.039>
- Martins Júnior, L. (2014). HIPERTENSÃO PULMONAR PULMONARY HYPERTENSION. In *Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba, v* (Vol. 16, Issue 4).
- Mazat, J. P., Devin, A., & Ransac, S. (2020). Modelling mitochondrial ROS production by the respiratory chain. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 77, Issue 3, pp. 455–465). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03381-1>
- McCullough, D. J., Vang, A., & Choudhary, G. (2014). NS1619-induced vasodilation is enhanced and differentially mediated in chronically hypoxic lungs. *Lung*, 192(5), 811–817. <https://doi.org/10.1007/s00408-014-9633-2>
- McGoon, M. D., & Miller, D. P. (2012). REVEAL: A contemporary US pulmonary arterial hypertension registry. *European Respiratory Review*, 21(123), 8–18. <https://doi.org/10.1183/09059180.00008211>

- Meera, P., Wallner, M., Song, M., Toro, L., & Kaback, H. R. (1997). *Large conductance voltage-and calcium-dependent K channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus* (Vol. 94). www.pnas.org.
- Mingatto, F. E., Dorta, D. J., dos Santos, A. B., Carvalho, I., da Silva, C. H. T. P., da Silva, V. B., Uyemura, S. A., dos Santos, A. C., & Curti, C. (2007). Dehydromonocrotaline inhibits mitochondrial complex I. A potential mechanism accounting for hepatotoxicity of monocrotaline. *Toxicol*, *50*(5), 724–730. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2007.06.006>
- MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE PORTARIA N o 35, DE 16 DE JANEIRO DE 2014 (*). (n.d.). www.saude.gov.br/sas, *mitchell1961*. (n.d.).
- Montero, M., Alonso, M. T., Albillos, A., García-Sancho, J., & Alvarez, J. (2001). Mitochondrial Ca²⁺-induced Ca²⁺ Release Mediated by the Ca²⁺ Uniporter. In *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 12).
- Mouchaers, K. T. B., Schaliij, I., Versteilen, A. M. G., Hadi, A. M., Van, G. P., Amerongen, N., Van Hinsbergh, V. W. M., Postmus, P. E., Van Der Laarse, W. J., & Vonk-Noordegraaf, A. (2009). Endothelin receptor blockade combined with phosphodiesterase-5 inhibition increases right ventricular mitochondrial capacity in pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *297*, 200–207. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00893.2008>.-Pulmonary
- Muensterman, E. T., & Tisdale, J. E. (n.d.). *Predictive Analytics for Identification of Patients at Risk for QT Interval Prolongation-A Systematic Review Running Title: Prediction of QT Interval Prolongation*. <https://doi.org/10.1002/phar.02146>
- Murphy, M. P. (2016). Understanding and preventing mitochondrial oxidative damage. *Biochemical Society Transactions*, *44*(5), 1219–1226. <https://doi.org/10.1042/BST20160108>
- Naeije, R., Richter, M. J., & Rubin, L. J. (2022). The physiological basis of pulmonary arterial hypertension. In *European Respiratory Journal* (Vol. 59, Issue 6). European Respiratory Society. <https://doi.org/10.1183/13993003.02334-2021>
- Nagaraj, C., Tang, B., Nagy, B. M., Papp, R., Jain, P. P., Marsh, L. M., Meredith, A. L., Ghanim, B., Klepetko, W., Kwapiszewska, G., Weir, E. K., Olschewski, H., & Olschewski, A. (2016). Docosahexaenoic acid causes rapid pulmonary arterial relaxation via K_{Ca} channel-mediated hyperpolarisation in pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*, *48*(4), 1127–1136. <https://doi.org/10.1183/13993003.01814-2015>

- Naranjo, M., & Hassoun, P. M. (2021). Systemic sclerosis-associated pulmonary hypertension: Spectrum and impact. In *Diagnostics* (Vol. 11, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS11050911>
- Nardi, A., & Olesen, S.-P. (2008). BK Channel Modulators: A Comprehensive Overview. In *Current Medicinal Chemistry* (Vol. 15).
- Nogueira-Ferreira, R., Vitorino, R., Ferreira, R., & Henriques-Coelho, T. (2015). Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 35, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2015.09.007>
- Nolfi-Donagan, D., Braganza, A., & Shiva, S. (2020). Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. In *Redox Biology* (Vol. 37). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101674>
- Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: In sickness and in health. In *Cell* (Vol. 148, Issue 6, pp. 1145–1159). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>
- Ohta-Ogo, K., Hao, H., Ishibashi-Ueda, H., Hirota, S., Nakamura, K., Ohe, T., & Ito, H. (2012). CD44 expression in plexiform lesions of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Pathology International*, 62(4), 219–225. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2011.02779.x>
- Ohya, S., Kuwata, Y., Sakamoto, K., Muraki, K., & Imaizumi, Y. (2005). Cardioprotective effects of estradiol include the activation of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac mitochondria. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 289(4 58-4). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00016.2005>
- Olesen, S.-P., Munch, E., Moldt, P., & Drejer, J. (1994). Selective activation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels by novel benzimidazolone. In *European Journal of Pharmacology*.
- Orriols, M., Gomez-Puerto, M. C., & ten Dijke, P. (2017). BMP type II receptor as a therapeutic target in pulmonary arterial hypertension. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 74, Issue 16, pp. 2979–2995). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2510-4>
- Peinado, V. I., París, R., Ramírez, J., Roca, J., Rodríguez-Roisin, R., & Barberà, J. A. (2008). Expression of BKCa channels in human pulmonary arteries: Relationship with remodeling and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Vascular Pharmacology*, 49(4–6), 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2008.07.006>

- Pereira, S. L., Kummerle, A. E., Fraga, C. A. M., Barreiro, E. J., Rocha, N. D. N., Ferraz, E. B., Nascimento, J. H. M. Do, Sudo, R. T., & Zapata-Sudo, G. (2013). A novel Ca²⁺ channel antagonist reverses cardiac hypertrophy and pulmonary arteriolar remodeling in experimental pulmonary hypertension. *European Journal of Pharmacology*, *702*(1–3), 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.01.050>
- Piao, L., Fang, Y. H., Cadete, V. J. J., Wietholt, C., Urboniene, D., Toth, P. T., Marsboom, G., Zhang, H. J., Haber, I., Rehman, J., Lopaschuk, G. D., & Archer, S. L. (2010). The inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase improves impaired cardiac function and electrical remodeling in two models of right ventricular hypertrophy: Resuscitating the hibernating right ventricle. *Journal of Molecular Medicine*, *88*(1), 47–60. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0524-6>
- Pietra, G. G., Capron, F., Stewart, S., Leone, O., Humbert, M., Robbins, I. M., Reid, L. M., & Tuder, R. M. (2004). Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, *43*(12 SUPPL.), S25–S32. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.02.033>
- Ponte, C. G., McManus, O. B., Schmalhofer, W. A., Shen, D. M., Dai, G., Stevenson, A., Sur, S., Shah, T., Kiss, L., Shu, M., Doherty, J. B., Nargund, R., Kaczorowski, G. J., Suarez-Kurtz, G., & Garcia, M. L. (2012). Selective, direct activation of high-conductance, calcium-activated potassium channels causes smooth muscle relaxation. *Molecular Pharmacology*, *81*(4), 567–577. <https://doi.org/10.1124/mol.111.075853>
- Pousada, G., Lupo, V., Castro-Sánchez, S., Álvarez-Satta, M., Sánchez-Monteaugudo, A., Balóira, A., Espinós, C., & Valverde, Di. (2017). Molecular and functional characterization of the BMPR2 gene in Pulmonary Arterial Hypertension. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02074-8>
- Price, L. C., Wort, S. J., Perros, F., Dorfmüller, P., Huertas, A., Montani, D., Cohen-Kaminsky, S., & Humbert, M. (2012). Inflammation in pulmonary arterial hypertension. In *Chest* (Vol. 141, Issue 1, pp. 210–221). American College of Chest Physicians. <https://doi.org/10.1378/chest.11-0793>
- Prisco, S. Z., Thenappan, T., & Prins, K. W. (2020). Treatment Targets for Right Ventricular Dysfunction in Pulmonary Arterial Hypertension. In *JACC: Basic to Translational Science* (Vol. 5, Issue 12, pp. 1244–1260). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2020.07.011>
- Raaz, U., Toh, R., Maegdefessel, L., Adam, M., Nakagami, F., Emrich, F. C., Spin, J. M., & Tsao, P. S. (2014). Hemodynamic regulation of reactive oxygen species: Implications for vascular diseases. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 20, Issue 6, pp. 914–928). <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5507>

- Rabinovitch, M., Guignabert, C., Humbert, M., & Nicolls, M. R. (2014). Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Circulation Research*, *115*(1), 165–175. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301141>
- Rafikov, R., Sun, X., Rafikova, O., Louise Meadows, M., Desai, A. A., Khalpey, Z., Yuan, J. X. J., Fineman, J. R., & Black, S. M. (2015). Complex I dysfunction underlies the glycolytic switch in pulmonary hypertensive smooth muscle cells. *Redox Biology*, *6*, 278–286. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.016>
- Rafikova, O., Meadows, M. L., Kinchen, J. M., Mohny, R. P., Maltepe, E., Desai, A. A., Yuan, J. X. J., Garcia, J. G. N., Fineman, J. R., Rafikov, R., & Black, S. M. (2016). Metabolic changes precede the development of pulmonary hypertension in the monocrotaline exposed rat lung. *PLoS ONE*, *11*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150480>
- Rafikova, O., Srivastava, A., Desai, A. A., Rafikov, R., & Tofovic, S. P. (2018). Recurrent inhibition of mitochondrial complex III induces chronic pulmonary vasoconstriction and glycolytic switch in the rat lung. *Respiratory Research*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0776-1>
- Ranchoux, B., Harvey, L. D., Ayon, R. J., Babicheva, A., Bonnet, S., Chan, S. Y., Yuan, J. X. J., & Perez, V. de J. (2018). Endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension: An evolving landscape (2017 Grover Conference Series). In *Pulmonary Circulation* (Vol. 8, Issue 1). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/2045893217752912>
- Redel-Traub, G., Sampson, K. J., Kass, R. S., & Bohnen, M. S. (2022). Potassium Channels as Therapeutic Targets in Pulmonary Arterial Hypertension. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom12101341>
- Redout, E. M., Wagner, M. J., Zuidwijk, M. J., Boer, C., Musters, R. J. P., van Hardeveld, C., Paulus, W. J., & Simonides, W. S. (2007). Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. *Cardiovascular Research*, *75*(4), 770–781. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.05.012>
- Reffellmann, T., & Klöner, R. A. (2006). Cardiovascular Effects of Phosphodiesterase 5 Inhibitors. In *Current Pharmaceutical Design* (Vol. 12).
- Revermann, M., Neofitidou, S., Kirschning, T., Schloss, M., Brandes, R. P., & Hofstetter, C. (2014). Inhalation of the BKCa⁻ opener NS1619 attenuates right ventricular pressure and improves oxygenation in the rat monocrotaline model of pulmonary hypertension. *PLoS ONE*, *9*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086636>
- Ribeuz, H. Le, Capuano, V., Girerd, B., Humbert, M., Montani, D., & Antigny, F. (2020). Implication of potassium channels in the pathophysiology of pulmonary

- arterial hypertension. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 9, pp. 1–22). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom10091261>
- Rich, J. D., Thenappan, T., Freed, B., Patel, A. R., Thisted, R. A., Childers, R., & Archer, S. L. (2013). QTc prolongation is associated with impaired right ventricular function and predicts mortality in pulmonary hypertension. *International Journal of Cardiology*, *167*(3), 669–676. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.03.071>
- Riou, M., Enache, I., Sauer, F., Charles, A. L., & Geny, B. (2023). Targeting Mitochondrial Metabolic Dysfunction in Pulmonary Hypertension: Toward New Therapeutic Approaches? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 11). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms24119572>
- Roderburg, C., Loosen, S. H., Hippe, H.-J., Luedde, T., Kostev, K., & Luedde, M. (2021). Pulmonary hypertension is associated with an increased incidence of cancer diagnoses. *Pulmonary Circulation*. <https://doi.org/10.1002/pul2.12000>
- Ryan, J. J., Huston, J., Kutty, S., Hatton, N. D., Bowman, L., Tian, L., Herr, J. E., Johri, A. M., & Archer, S. L. (2015). Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension. In *Canadian Journal of Cardiology* (Vol. 31, Issue 4, pp. 391–406). Pulsus Group Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2015.01.023>
- Sankhe, S., Manousakidi, S., Antigny, F., Arthur Ataam, J., Bentebbal, S., Ruchon, Y., Lecerf, F., Sabourin, J., Price, L., Fadel, E., Dorfmueller, P., Eddahibi, S., Humbert, M., Perros, F., & Capuano, V. (2017). T-type Ca²⁺ channels elicit proliferative and anti-apoptotic responses through impaired PP2A/Akt1 signaling in PSMCs from patients with pulmonary arterial hypertension. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1864*(10), 1631–1641. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.06.018>
- Santos-Gomes, J., Le Ribeuz, H., Brás-Silva, C., Antigny, F., & Adão, R. (2022). Role of Ion Channel Remodeling in Endothelial Dysfunction Induced by Pulmonary Arterial Hypertension. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom12040484>
- Sanz, J., Sánchez-Quintana, D., Bossone, E., Bogaard, H. J., & Naeije, R. (2019). Anatomy, Function, and Dysfunction of the Right Ventricle: JACC State-of-the-Art Review. In *Journal of the American College of Cardiology* (Vol. 73, Issue 12, pp. 1463–1482). Elsevier USA. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.12.076>
- Savai, R., Pullamsetti, S. S., Kolbe, J., Bieniek, E., Voswinckel, R., Fink, L., Scheed, A., Ritter, C., Dahal, B. K., Vater, A., Klussmann, S., Ghofrani, H. A., Weissmann, N., Klepetko, W., Banat, G. A., Seeger, W., Grimminger, F., & Schermuly, R. T. (2012). Immune and inflammatory cell involvement in the

pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186(9), 897–908.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201202-0335OC>

Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Wilkins, M. R., & Grimminger, F. (2011). Mechanisms of disease: Pulmonary arterial hypertension. In *Nature Reviews Cardiology* (Vol. 8, Issue 8, pp. 443–455).
<https://doi.org/10.1038/nrcardio.2011.87>

science.1074360. (n.d.).

Shah, A. J., Vorla, M., & Kalra, D. K. (2022). Molecular Pathways in Pulmonary Arterial Hypertension. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 17). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms231710001>

Shiraki, H., Kawasaki, H., Tezuka, S., Nakatsuma, A., Nawa, H., Araki, H., Gomita, Y., & Kurosaki, Y. (2001). Adrenergic nerves mediate acetylcholine-induced endothelium-independent vasodilation in the rat mesenteric resistance artery. In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 419). www.elsevier.nl/locate/ejphar

Sibomana, J. P., Campeche, A., Carvalho-Filho, R. J., Correa, R. A., Duani, H., Pacheco Guimaraes, V., Hilton, J. F., Kassa, B., Kumar, R., Lee, M. H., Loureiro, C. M. C., Mazimba, S., Mickael, C., Oliveira, R. K. F., Ota-Arakaki, J. S., Rezende, C. F., Silva, L. C. S., Sinkala, E., Ahmed, H. Y., & Graham, B. B. (2020). Schistosomiasis Pulmonary Arterial Hypertension. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.608883>

Siemen, D., Loupatatzis, C., Borecky, J., Gulbins, E., & Lang, F. (1999). *Ca²⁺-Activated K Channel of the BK-Type in the Inner Mitochondrial Membrane of a Human Glioma Cell Line*. <http://www.idealibrary.com>

Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D. S., Denton, C. P., Gatzoulis, M. A., Krowka, M., Williams, P. G., & Souza, R. (2019a). Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *The European Respiratory Journal*, 53(1). <https://doi.org/10.1183/13993003.01913-2018>

Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D. S., Denton, C. P., Gatzoulis, M. A., Krowka, M., Williams, P. G., & Souza, R. (2019b). Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*, 53(1). <https://doi.org/10.1183/13993003.01913-2018>

Singh, Y., & Lakshminrusimha, S. (2021). Pathophysiology and Management of Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn. *Clinics in Perinatology*, 48(3), 595–618. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2021.05.009>

- Sinkala, E., Ahmed, H. Y., Sibomana, J. P., Lee, M. H., Kassa, B., Kumar, R., Mazimba, S., Binegdie, A. B., Mpisa, S., Wamundila, K., Graham, B. B., & Hilton, J. F. (2022). Rationale and design of a screening study to detect schistosomiasis-associated pulmonary hypertension in Ethiopia and Zambia. *Pulmonary Circulation*, *12*(2). <https://doi.org/10.1002/pul2.12072>
- Skulachev, V. P. (1996). Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Letters*, *397*(1), 7–10. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00989-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00989-1)
- Soltysinska, E., Bentzen, B. H., Barthmes, M., Hattel, H., Thrush, A. B., Harper, M. E., Qvortrup, K., Larsen, F. J., Schiffer, T. A., Losa-Reyna, J., Straubinger, J., Kniess, A., Thomsen, M. B., Brüggemann, A., Fenske, S., Biel, M., Ruth, P., Wahl-Schott, C., Boushel, R. C., ... Lukowski, R. (2014). KCNMA1 encoded cardiac BK channels afford protection against ischemia-reperfusion injury. *PLoS ONE*, *9*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103402>
- Stenmark, K. R., Frid, M. G., Graham, B. B., & Tuder, R. M. (2018). Dynamic and diverse changes in the functional properties of vascular smooth muscle cells in pulmonary hypertension. In *Cardiovascular Research* (Vol. 114, Issue 4, pp. 551–564). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy004>
- Stenmark, K. R., Meyrick, B., Galie, N., Mooi, W. J., & McMurtry, I. F. (2009). Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *297*, 1013–1032. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00217.2009.-At>
- Stenmark, K. R., Yeager, M. E., El Kasmi, K. C., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, E. V., Li, M., Riddle, S. R., & Frid, M. G. (2013). The adventitia: Essential regulator of vascular wall structure and function. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 75, pp. 23–47). <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183802>
- Suzuki, Y. J., Nikolaienko, S. I., Shults, N. V., & Gychka, S. G. (2021). COVID-19 patients may become predisposed to pulmonary arterial hypertension. *Medical Hypotheses*, *147*. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2021.110483>
- Szabo, I., & Zoratti, M. (2014). Mitochondrial Channels: Ion Fluxes and More. *Physiol Rev*, *94*, 519–608. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2013.-The>
- Szewczyk, A., Jarmuszkiewicz, W., Koziel, A., Sobieraj, I., Nobik, W., Lukasiak, A., Skup, A., Bednarczyk, P., Drabarek, B., Dymkowska, D., Wrzosek, A., & Zablocki, K. (2015). Mitochondrial mechanisms of endothelial dysfunction. In *Pharmacological Reports* (Vol. 67, Issue 4, pp. 704–710). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.04.009>

- Szteyn, K., & Singh, H. (2020). Bkca channels as targets for cardioprotection. In *Antioxidants* (Vol. 9, Issue 8, pp. 1–16). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox9080760>
- Tanaka, Y., Koike, K., & Toro, L. (2004). MaxiK channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms. In *J. Smooth Muscle Res* (Issue 5).
- Tara Elizabeth Scott, C., Elizabeth Scott, T., Kemp-Harper, B. K., & Hobbs, A. J. (2018). *Inflammasomes: a novel therapeutic target in pulmonary hypertension? LINKED ARTICLES*. <https://doi.org/10.1111/bph.v176.12/issuetoc>
- Temple, I. P., Monfredi, O., Quigley, G., Schneider, H., Zi, M., Cartwright, E. J., Boyett, M. R., Mahadevan, V. S., & Hart, G. (2014). Macitentan treatment retards the progression of established pulmonary arterial hypertension in an animal model. *International Journal of Cardiology*, *177*(2), 423–428. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.09.005>
- Thenappan, T., Chan, S. Y., & Kenneth Weir, E. (2018). Role of extracellular matrix in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *REVIEW Extracellular Matrix in Cardiovascular Pathophysiology Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *315*, 1322–1331. <https://doi.org/10.1152/ajpheart>
- Thenappan, T., Ormiston, M. L., Ryan, J. J., & Archer, S. L. (2018). Pulmonary arterial hypertension: Pathogenesis and clinical management. In *BMJ (Online)* (Vol. 360). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmj.j5492>
- Tobal, R., Potjewijd, J., Empel, V. P. M. van, Ysermans, R., Schurgers, L. J., Reutelingsperger, C. P., Damoiseaux, J. G. M. C., & Paassen, P. van. (2021). Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension: The Potential Involvement of Innate and Adaptive Immunity. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.806899>
- Tofovic, S. P., Salah, E. M., Mady, H. H., Jackson, E. K., & Melhem, M. F. (n.d.). *Estradiol Metabolites Attenuate Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats*. <http://journals.lww.com/cardiovascularpharm>
- Tousoulis, D., Kampoli, A.-M., Tentolouris, C., Papageorgiou, N., & Stefanadis, C. (2012). The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. In *Current Vascular Pharmacology* (Vol. 10).
- Townsley, M. I. (2012). Structure and composition of pulmonary arteries, capillaries, and veins. *Comprehensive Physiology*, *2*(1), 675–709. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100081>

- Tuder, R. M. (2017). Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 367, Issue 3, pp. 643–649). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2539-y>
- Valverde, M. A., Rojas, P., Amigo, J., Cosmelli, D., Orio, P., Bahamonde, M. I., Mann, G. E., Vergara, C., & Latorre, R. (n.d.). *Acute Activation of Maxi-K Channels (hSlo) by Estradiol Binding to the Subunit*. <https://www.science.org>
- Van Der Bruggen, C. E. E., Tedford, R. J., Handoko, M. L., Van Der Velden, J., & De Man, F. S. (2017). RV pressure overload: From hypertrophy to failure. In *Cardiovascular Research* (Vol. 113, Issue 12, pp. 1423–1432). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx145>
- Vazquez, Z. G. S., & Klinger, J. R. (2020). Guidelines for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Lung*, 198(4), 581–596. <https://doi.org/10.1007/s00408-020-00375-w>
- Vercellino, I., & Sazanov, L. A. (2022). The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 23, Issue 2, pp. 141–161). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00415-0>
- Veyssier-Belot, C., & Cacoub, P. (1999). Role of endothelial and smooth muscle cells in the physiopathology and treatment management of pulmonary hypertension. In *Cardiovascular Research* (Vol. 44). www.elsevier.com/locate/cardiores www.elsevier.nl/locate/cardiores
- Vonk Noordegraaf, A., Channick, R., Cottreel, E., Kiely, D. G., Marcus, J. T., Martin, N., Moiseeva, O., Peacock, A., Swift, A. J., Tawakol, A., Torbicki, A., Rosenkranz, S., & Galiè, N. (2022). The REPAIR Study: Effects of Macitentan on RV Structure and Function in Pulmonary Arterial Hypertension. *JACC: Cardiovascular Imaging*, 15(2), 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2021.07.027>
- Vonk-Noordegraaf, A., Haddad, F., Chin, K. M., Forfia, P. R., Kawut, S. M., Lumens, J., Naeije, R., Newman, J., Oudiz, R. J., Provencher, S., Torbicki, A., Voelkel, N. F., & Hassoun, P. M. (2013). Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: Physiology and pathobiology. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(25 SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.10.027>
- Wakabayashi, T., & Karbowski, M. (2001). Structural Changes of Mitochondria Related to Apoptosis. In *Biol Signals Recept* (Vol. 10). www.karger.com/journals/bsi
- Walkon, L. L., Strubbe-Rivera, J. O., & Bazil, J. N. (2022). Calcium Overload and Mitochondrial Metabolism. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom12121891>

- Walsh, T. P., Baird, G. L., Atalay, M. K., Agarwal, S., Arcuri, D., Klinger, J. R., Mullin, C. J., Morreo, H., Normandin, B., Shiva, S., Whittenhall, M., & Ventetuolo, C. E. (2021). Experimental design of the Effects of Dehydroepiandrosterone in Pulmonary Hypertension (EDIPHY) trial. *Pulmonary Circulation*, *11*(2). <https://doi.org/10.1177/2045894021989554>
- Wan, J., Yamamura, A., Zimnicka, A. M., Voiriot, G., Smith, K. A., Tang, H., Ayon, R. J., Choudhury, M. S. R., Ko, E. A., Wang, J., Wang, C., Makino, A., & Yuan, J. X. J. (2013). Chronic hypoxia selectively enhances L- and T-type voltage-dependent Ca²⁺ channel activity in pulmonary artery by upregulating Cav1.2 and Cav3.2. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, *305*(2). <https://doi.org/10.1152/ajplung.00313.2012>
- Wang, A., Cao, S., Stowe, J. C., & Valdez-jasso, D. (2021). Substrate stiffness and stretch regulate profibrotic mechanosignaling in pulmonary arterial adventitial fibroblasts. *Cells*, *10*(5). <https://doi.org/10.3390/cells10051000>
- Wang, A., & Valdez-Jasso, D. (2021). Cellular mechanosignaling in pulmonary arterial hypertension. In *Biophysical Reviews* (Vol. 13, Issue 5, pp. 747–756). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00828-3>
- Wang, D., Gomes, M. T., Mo, Y., Prohaska, C. C., Zhang, L., Chelvanambi, S., Clauss, M. A., Zhang, D., Machado, R. F., Gao, M., & Bai, Y. (2023). Human Endogenous Retrovirus, SARS-CoV-2, and HIV Promote PAH via Inflammation and Growth Stimulation. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms24087472>
- Wang, X., An, P., Gu, Z., Luo, Y., & Luo, J. (2021). Mitochondrial metal ion transport in cell metabolism and disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 14). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22147525>
- White, R. J., Meoli, D. F., Swarthout, R. F., Kallop, D. Y., Galaria, I. I., Harvey, J. L., Miller, C. M., Blaxall, B. C., Hall, C. M., Pierce, R. A., Cool, C. D., & Taubman, M. B. (2007). Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *293*, 583–590. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00321.2006>.-Severe
- Wilson, D. W., Segall¹², H. J., Pan¹², M. C. W., Lame¹², J. E., & Morin², D. (1992). Mechanisms and Pathology of Monocrotaline Pulmonary Toxicity. In *Critical Reviews in Toxicology* (Vol. 22, Issue 6).
- Ying Zhong, X., Catheline, D., Houeijeh, A., Sharma, D., Du, L., Besengez, C., Deruelle, P., Legrand, P., & Storme, L. (2018). Maternal omega-3 PUFA supplementation prevents hyperoxia-induced pulmonary hypertension in the offspring. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *315*, 116–132. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00527.2017>.-Pulmonary

- Yun, Y. R., Won, J. E., Jeon, E., Lee, S., Kang, W., Jo, H., Jang, J. H., Shin, U. S., & Kim, H. W. (2010). Fibroblast growth factors: Biology, function, and application for tissue regeneration. In *Journal of Tissue Engineering* (Vol. 1, Issue 1, pp. 1–18). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.4061/2010/218142>
- Zhang, W., Liu, B., Wang, Y., Zhang, H., He, L., Wang, P., & Dong, M. (2022). Mitochondrial dysfunction in pulmonary arterial hypertension. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1079989>