



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
(CARDIOLOGIA)
INSTITUTO DO CORAÇÃO EDSON SAAD
LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA CARDIOVASCULAR



**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS
DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS EM MODELO
ANIMAL DE HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA**

BRUNA DE SOUZA ROCHA

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Zapata-Sudo
Co-orientadora: Profa. Dra. Jaqueline Soares da Silva

RIO DE JANEIRO
2023

BRUNA DE SOUZA ROCHA

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS N-
ACILIDRAZÔNICOS EM MODELO ANIMAL DE HIPERTENSÃO
ARTERIAL SISTÊMICA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cardiologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina e do Instituto do Coração Edson Saad, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências – área de concentração – Cardiologia.

Orientadores: Profa. Dra. Gisele Zapata-Sudo
Profa. Dra. Jaqueline Soares da Silva

RIO DE JANEIRO

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

R672a Rocha, Bruna de Souza
Avaliação farmacológica de novos derivados N acilidrazônicos em modelo animal de hipertensão arterial sistêmica / Bruna de Souza Rocha. -- Rio de Janeiro, 2023.
68 f.


Orientadora: Gisele Zapata-Sudo.
Coorientadora: Jaqueline Soares da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina (Cardiologia), 2023.

1. Hipertensão arterial sistêmica. 2. efeito vasodilatador. 3. selênio. 4. N-acilidrazonas. 5. receptor de adenosina. I. Zapata-Sudo, Gisele, orient. II. da Silva, Jaqueline Soares, coorient. III. Título.

BRUNA DE SOUZA ROCHA

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS
EM MODELO ANIMAL DE HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA


Dissertação de Mestrado apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências – área de concentração – Cardiologia ao Programa de Pós-Graduação em Cardiologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina e do Instituto do Coração Edson Saad, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, aprovada pela seguinte banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 PATRICIA MACHADO RODRIGUES E SILVA MART
Data: 04/09/2023 21:43:47-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins – Instituto Oswaldo Cruz (IOC)
– FIOCRUZ – RJ.

Christina Grüne de Souza e Silva

Profa. Dra. Christina Grüne de Souza e Silva – Programa de Pós-Graduação em
Medicina (Cardiologia), Faculdade de Medicina, Instituto do Coração Edson Saad
(ICES) – UFRJ.

Documento assinado digitalmente
 CARLOS ALBERTO MANSSOUR FRAGA
Data: 03/09/2023 16:26:15-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Carlos Alberto Manssour Fraga – Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) –
UFRJ.

Rio de Janeiro, 15 de agosto de 2023.

Aos meus pais Marta e Sérgio por
toda a dedicação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Marta e Sérgio por me apoiarem e me ajudarem em toda a minha caminhada.

À minha avó Norimar por sempre ficar feliz com minhas conquistas.

À amiga Celinha por me considerar como filha.

À minha orientadora Gisele Zapata-Sudo, à minha co-orientadora Jaqueline Soares e ao professor Roberto Takashi Sudo (*in memoriam*) por me proporcionarem essa oportunidade de realizar meu trabalho de conclusão de curso, seguido do mestrado.

Aos professores Eliezer de Jesus Barreiro, Carlos Alberto Manssour Fraga e Lídia Moreira Lima e à aluna Júlia Galvez Pedreira por cederem as substâncias em estudo e por colaborarem com o projeto.

A todos os amigos do laboratório: Aimeé, Rebeca, Fabiana, Tácio, Bruno, Juliana, Fabrício, Gabriel, Vitória, Ana Clara, Fernanda, Kauan, Marcela, Tadeu, Paola, Márcio e, em especial, à Jaqueline e à Bianca pela amizade, ajuda e companheirismo.

À Marly pela atenção e carinho.

À Profa. Dra. Margarete pela amizade e atenção.

À equipe do biotério pela organização e limpeza dos animais.

A todos os membros da banca examinadora.

Às instituições FAPERJ, CAPES, CNPq, INCT-INOVAR e CRISTÁLIA pelo apoio financeiro.

RESUMO

ROCHA, Bruna de Souza. Avaliação farmacológica de novos derivados *N*-acilidrazônicos em modelo animal de hipertensão arterial sistêmica. Rio de Janeiro, 2023. Dissertação de Mestrado. (Mestre em Ciências – área de concentração – Cardiologia) – Programa de Pós-Graduação em Cardiologia da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Introdução: A hipertensão arterial sistêmica é uma condição multifatorial e considerada fator de risco para disfunção cardíaca, encefálica, renal. A busca por novas estratégias de prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares levou ao planejamento e síntese de novas *N*-acilidrazonas para identificar agentes com atividade vasodilatadora. Novas moléculas contendo selênio (–Se) foram projetadas para melhorar a interação com o receptor de adenosina, sendo microelemento essencial com propriedade antioxidante, o que poderia reduzir o estresse oxidativo característico da hipertensão.

Métodos: Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais em pesquisa da Universidade Federal do Rio de Janeiro n. 017/19. A reatividade vascular foi avaliada através do registro da tensão isométrica da aorta torácica proveniente de ratos Wistar machos (220-250 g) após exposição a concentrações crescentes de cada derivado (0,1 - 100 μM). Para investigar o efeito anti-hipertensivo, pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram obtidas após administração intravenosa de 10 e 30 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ dos compostos selecionados LASSBio-2062 e LASSBio-2063 em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

Resultados: As substâncias LASSBio-2062, LASSBio-2063, LASSBio-2075, LASSBio-2076, LASSBio-2084, LASSBio-430, LASSBio-2092 e LASSBio-2093 promoveram vasodilatação com concentração eficaz média de $14,7 \pm 5,2$; $14,6 \pm 2,9$; $18,7 \pm 9,6$; $8,8 \pm 3,3$; > 100 ; $10,1 \pm 3,1$; $37,8 \pm 11,8$; e $15,9 \pm 5,7 \mu\text{M}$, respectivamente. LASSBio-2062 e LASSBio-2063 (30 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$) reduziram a PAM em SHR de $124,6 \pm 8,6$ para $72,0 \pm 12,3$ mmHg e de $114,2 \pm 2,3$ para $87,4 \pm 7,5$ mmHg, respectivamente. O relaxamento vascular induzido pelo LASSBio-2062 resulta da ativação de receptores de adenosina A_3 e da ativação direta/indireta dos canais de K. A ação vasodilatadora de LASSBio-2063, além de apresentar o envolvimento de receptores de adenosina A_3 , também pode bloquear canais de cálcio tipo L.

Conclusão: Os novos derivados *N*-acilidrazônicos LASSBio-2062 e LASSBio-2063 produziram vasodilatação e apresentaram efeito anti-hipertensivo devido à atuação em alvo farmacológico inovador, como o receptor de adenosina A_3 .

Palavras-chave: Hipertensão arterial sistêmica, efeito vasodilatador, selênio, *N*-acilidrazonas, canal de cálcio, receptor de adenosina.

ABSTRACT

ROCHA, Bruna de Souza. Pharmacological evaluation of new *N*-acylhydrazonic derivatives in an animal model of systemic arterial hypertension. Rio de Janeiro, 2023. Master's Dissertation. (Master of Science – concentration area – Cardiology) – Graduate Program in Cardiology at the Faculty of Medicine, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Introduction: Systemic arterial hypertension is a multifactorial condition and considered a risk factor for cardiac, brain, renal dysfunction. The search for new strategies for prevention and treatment of cardiovascular diseases led to the planning and synthesis of new *N*-acylhydrazones to identify agents with vasodilator activity. New molecules containing selenium (–Se) were designed to improve interaction with the adenosine receptor, being an essential microelement with antioxidant property, which could reduce oxidative stress characteristic of hypertension.

Methods: Protocols were approved by the Ethics Committee for the Use of Animals in research of Federal University of Rio de Janeiro n. 017/19. Vascular reactivity was evaluated by recording the isometric tension of the thoracic aorta from male Wistar rats (220-250 g) after exposure to increasing concentrations of each derivative (0.1 - 100 μ M). To investigate the antihypertensive effect, systolic, diastolic and mean arterial pressure (MAP) and heart rate were obtained after intravenous administration of 10 and 30 μ mol.kg⁻¹ of the selected compounds LASSBio-2062 and LASSBio-2063 in spontaneously hypertensive rats (SHR).

Results: The substances LASSBio-2062, LASSBio-2063, LASSBio-2075, LASSBio-2076, LASSBio-2084, LASSBio-430, LASSBio-2092 and LASSBio-2093 promoted vasodilation with a mean effective concentration of 14.7 ± 5.2 ; 14.6 ± 2.9 ; 18.7 ± 9.6 ; 8.8 ± 3.3 ; > 100 ; 10.1 ± 3.1 ; 37.8 ± 11.8 ; and 15.9 ± 5.7 μ M, respectively. LASSBio-2062 and LASSBio-2063 (30 μ mol.kg⁻¹) reduced MAP in SHR from 124.6 ± 8.6 to 72.0 ± 12.3 mmHg and from 114.2 ± 2.3 to 87.4 ± 7.5 mmHg, respectively. LASSBio-2062-induced vascular relaxation through the activation of adenosine A₃ receptors and the direct/indirect activation of K channels. The vasodilator action of LASSBio-2063, in addition to showing the involvement of A₃ adenosine receptors, can also block L-type calcium channels.

Conclusion: The new *N*-acylhydrazone derivatives LASSBio-2062 and LASSBio-2063 produced vasodilation and promoted antihypertensive effect due to the activation of the adenosine A₃ receptor, an innovative pharmacological target to treat hypertension.

Keywords: Systemic arterial hypertension, vasodilator effect, selenium, *N*-acylhydrazones, calcium channel, adenosine receptor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Categorias de Pressão Arterial - DBHA, 2020	16
Figura 2 – Número anual de mortes no mundo por causa, em 2019	18
Figura 3 – Representação dos locais de ação de vasodilatadores	20
Figura 4 – Efeitos vasculares dos agonistas dos receptores de adenosina do subtipo A _{2A}	23
Figura 5 – Ativação dos receptores de adenosina, com destaque para o subtipo A ₃ ..	24
Figura 6 – Estrutura química do LASSBio-294 e seus análogos	25
Figura 7 – Estrutura do LASSBio-294 (A) e suas modificações estruturais (B)	32
Figura 8 – Estrutura e curvas de concentração-resposta vascular do LASSBio-2062 em anéis de aorta com e sem endotélio	33
Figura 9 – Estrutura e curvas de concentração-resposta vascular do LASSBio-2063 em anéis de aorta com e sem endotélio	34
Figura 10 – Estrutura e curvas de concentração-resposta vascular do LASSBio-430 em anéis de aorta com e sem endotélio	34
Figura 11 – Estrutura e curvas de concentração-resposta vascular do LASSBio-2075 em anéis de aorta com e sem endotélio	35
Figura 12 – Estrutura e curvas de concentração-resposta vascular do LASSBio-2084 em anéis de aorta com e sem endotélio	35
Figura 13 – Estrutura e curvas de concentração-resposta vascular do LASSBio-2076 em anéis de aorta com e sem endotélio	36
Figura 14 – Estrutura e curvas de concentração-resposta vascular do LASSBio-2092 em anéis de aorta com e sem endotélio	36
Figura 15 – Estrutura e curvas de concentração-resposta vascular do LASSBio-2093 em anéis de aorta com e sem endotélio	37
Figura 16 – Curvas de concentração-resposta vascular do composto LASSBio-2062 em anéis de aorta com endotélio na ausência ou presença do ZM-241385 (0,1 µM)	38
Figura 17 – Curvas de concentração-resposta vascular do composto LASSBio-2062 em anéis de aorta sem endotélio na ausência ou presença do MRE 3008F20 (0,1 µM)	38

Figura 18 – Curvas de concentração-resposta vascular do composto LASSBio-2062 em anéis de aorta sem endotélio na ausência ou presença da glibenclamida (10 µM), da 4-aminopiridina (3 mM) e do tetraetilamônio (3 mM), separadamente	39
Figura 19 – Curvas de concentração-resposta vascular de CaCl ₂ em anéis de aorta sem endotélio na ausência ou presença de LASSBio-2062	40
Figura 20 – Curvas de concentração-resposta referentes ao efeito da substância LASSBio-2062 na contratilidade do músculo papilar	41
Figura 21 – Parâmetros hemodinâmicos observados em animais normotensos antes e após administração intravenosa de LASSBio-2062	42
Figura 22 – Parâmetros hemodinâmicos observados em SHR antes e após administração intravenosa de LASSBio-2062	43
Figura 23 – Curvas de concentração-resposta vascular do composto LASSBio-2063 em anéis de aorta com endotélio na ausência ou presença do ZM-241385 (0,1 µM)	44
Figura 24 – Curvas de concentração-resposta vascular do composto LASSBio-2063 em anéis de aorta sem endotélio na ausência ou presença do MRE 3008F20 (0,1 µM)	44
Figura 25 – Curvas de concentração-resposta vascular do composto LASSBio-2063 em anéis de aorta sem endotélio na ausência ou presença da glibenclamida (10 µM)	45
Figura 26 – Curvas de concentração-resposta vascular de CaCl ₂ em anéis de aorta sem endotélio na ausência ou presença de LASSBio-2063	45
Figura 27 – Curvas de concentração-resposta referentes ao efeito da substância LASSBio-2063 na contratilidade do músculo papilar	46
Figura 28 – Parâmetros hemodinâmicos observados em animais normotensos antes e após administração intravenosa de LASSBio-2063	46
Figura 29 – Parâmetros hemodinâmicos observados em SHR antes e após administração intravenosa de LASSBio-2063	47
Figura 30 – Resumo das modificações estruturais e respectivos resultados encontrados	50
Figura 31 – Ativação do receptor de adenosina do subtipo A ₃	52
Figura 32 – Hipótese da atuação das substâncias LASSBio-2062 e LASSBio-2063 no componente vascular	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de CE_{50} dos análogos do LASSBio-294 em anéis de aorta com e sem endotélio	33
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α_1	– receptor adrenérgico α_1
A ₁	– receptor de adenosina do subtipo 1
A _{2A}	– receptor de adenosina do subtipo 2A
A _{2B}	– receptor de adenosina do subtipo 2B
A ₃	– receptor de adenosina do subtipo 3
AC	– adenilato ciclase
ACh	– acetilcolina
ADE	– adenosina
cAMP	– adenosina monofosfato cíclico
4-AP	– 4-aminopiridina
AT ₁	– receptor de angiotensina-II
AT-I	– angiotensina-I
AT-II	– angiotensina-II
ATP	– adenosina trifosfato
BK _{Ca}	– canal de potássio dependente de cálcio de alta condutância
bpm	– batimento por minuto
Ca _L	– canal de cálcio tipo L voltagem-dependente
CaM	– calmodulina
CE ₅₀	– concentração eficaz média
CI ₅₀	– concentração inibitória média
DAG	– diacilglicerol
DBHA	– Diretriz(es) Brasileira(s) de Hipertensão Arterial
DCV	– doenças cardiovasculares
DMSO	– dimetilsulfóxido
ECA	– enzima conversora de angiotensina
eNOS	– enzima óxido nítrico sintase endotelial
EPM	– erro padrão da média
ESF	– Estratégia Saúde da Família
ET-1	– endotelina-1
ET _A /ET _B	– receptores de endotelina-1
FC	– frequência cardíaca
GCs	– guanilato ciclase solúvel

GMP	– guanosina monofosfato
cGMP	– guanosina monofosfato cíclico
GPCR	– Receptores acoplados às proteínas G (do inglês <i>G protein-coupled receptors</i>)
GTP	– guanosina trifosfato
HA	– hipertensão arterial
HAR	– hipertensão arterial resistente
HAS	– hipertensão arterial sistêmica
IHME	– <i>Institute for Health Metrics and Evaluation</i>
IL-12	– interleucina-12
IL-17	– interleucina-17
IL-23	– interleucina-23
i.p.	– intraperitoneal
IP ₃	– inositol-1,4,5-trifosfato
i.v.	– intravenosa
K _{ATP}	– canal de potássio sensível a ATP
KII	– cininase II
K _v	– canal de potássio voltagem-dependente
LASSBio [®]	– Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
M ₃	– receptor muscarínico tipo 3
MCL	– cadeia leve de miosina
MLCK	– cinase da cadeia leve de miosina
mmHg	– milímetro de mercúrio
MLV	– músculo liso vascular
MS	– Ministério da Saúde
NE	– norepinefrina
NFκB	– fator nuclear κB (do inglês <i>nuclear factor kappa B</i>)
NO	– óxido nítrico
OMS	– Organização Mundial de Saúde
PA	– pressão arterial
PAD	– pressão arterial diastólica
PAM	– pressão arterial média
PAS	– pressão arterial sistólica
PDE	– fosfodiesterase

PDE-5	– fosfodiesterase-5
PKA	– proteína cinase A
PKC	– proteína cinase C
PKG	– proteína cinase G
PLC	– fosfolipase C
S	– enxofre
Se	– selênio
SHR	– ratos espontaneamente hipertensos (do inglês <i>Spontaneously Hypertensive Rats</i>)
SRAA	– sistema renina-angiotensina-aldosterona
TEA	– tetraetilamônio
TNF- α	– fator de necrose tumoral α
V	– Volt
VIGITEL	–Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
WKY	– Wistar-Kyoto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Hipertensão Arterial Sistêmica e Epidemiologia das Doenças Cardiovasculares	16
1.2 Fisiopatologia da Hipertensão Arterial Sistêmica	18
1.3 Tratamento	19
1.4 Desenvolvimento de fármacos	22
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Comitê de ética	28
4.2 Substâncias	28
4.3 Experimentos <i>in vitro</i>	28
4.3.1 Reatividade vascular	28
4.3.1.1 Investigação do mecanismo de ação vascular	29
4.3.2 Registro de tensão isométrica de músculo cardíaco	30
4.4 Experimentos <i>in vivo</i>	30
4.4.1 Medida da pressão arterial e frequência cardíaca	30
4.5 Análise estatística	31
5 RESULTADOS	32
5.1 Reatividade vascular em anéis de aorta com e sem endotélio íntegro	32
5.2 Investigação dos mecanismos envolvidos na ação vasodilatadora do LASSBio-2062	37
5.2.1 Via dos receptores de adenosina	37
5.2.1.1 Via dos receptores de adenosina do subtipo A _{2A}	37
5.2.1.2 Via dos receptores de adenosina do subtipo A ₃	38
5.2.2 Participação dos canais de potássio na ação vasodilatadora do derivado LASSBio-2062	39
5.2.3 Influência do influxo de cálcio na ação do LASSBio-2062	40
5.3 Avaliação da ação do derivado LASSBio-2062 no músculo cardíaco	41
5.4 Efeito anti-hipertensivo de LASSBio-2062	41

5.5 Investigação dos mecanismos envolvidos na a�o vasodilatadora do LASSBio-2063	43
5.5.1 Via dos receptores de adenosina	43
5.5.1.1 Via dos receptores de adenosina do subtipo A _{2A}	43
5.5.1.2 Via dos receptores de adenosina do subtipo A ₃	44
5.5.2 Participa�o dos canais de potássio na a�o vasodilatadora do derivado LASSBio-2063	44
5.5.3 Influência do influxo de cálcio na a�o do LASSBio-2063	45
5.6 Avalia�o da a�o do derivado LASSBio-2063 no músculo cardíaco	45
5.7 Efeito anti-hipertensivo de LASSBio-2063	46
6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	67
ANEXO A - Certificado de participa�o em congressos	67
ANEXO B - Participa�o em publica�o de artigo	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão Arterial Sistêmica e Epidemiologia das Doenças Cardiovasculares

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial, influenciada por fatores genéticos/epigenéticos, ambientais e sociais, caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial, nos quais os valores de pressão arterial sistólica (PAS) encontram-se maiores ou iguais a 140 mmHg e/ou de pressão arterial diastólica (PAD) maiores ou iguais a 90 mmHg, além de ser fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) (Figura 1) (VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial (DBHA), 2021).

A HAS pode estar associada a distúrbios metabólicos, alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo, e pode ser agravada por outros fatores de risco, como dislipidemia, obesidade, intolerância à glicose e diabetes mellitus. Eventos como morte súbita, acidente vascular encefálico, infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca, doença arterial periférica e doença renal crônica podem estar relacionados à HAS (VII DBHA, 2016). Além disso, também constitui importante fator de risco para complicações cardíacas, cerebrovasculares, encefálicas, renais, vasculares e alterações metabólicas, sendo considerada um problema de saúde pública em âmbito mundial (RADOVANOVIC *et al.*, 2014, VI DBHA, 2010).

Categoria de Pressão Arterial	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)
PA ÓTIMA	MENOR QUE 120	MENOR QUE 80
PA NORMAL	120 - 129	80 - 84
PRÉ-HIPERTENSÃO	130 - 139	85-89
HIPERTENSÃO ESTÁGIO 1	140 - 159	90 - 99
HIPERTENSÃO ESTÁGIO 2	160 - 179	100 - 109
HIPERTENSÃO ESTÁGIO 3	180 OU MAIOR	110 OU MAIOR

Figura 1. Categorias de Pressão Arterial. (Adaptado). Fonte: Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020. Barroso *et al.* **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 116, n. 3, p. 516-658. 2021.

Assim, as DCV são a principal causa de morte, hospitalizações e atendimentos ambulatoriais em todo o mundo, até mesmo em países em desenvolvimento como o Brasil (DBHA, 2021, GLOBAL BURDEN OF DISEASE (GBD), 2016).

De acordo com os dados da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), relativos ao ano de 2013, a frequência de diagnóstico prévio de HAS é de 24,1% no conjunto da população adulta das 27 capitais brasileiras estudadas, sendo pouco mais elevada em mulheres (23,6%) do que nos homens (21,5%) (da SILVA *et al.*, 2016). Segundo dados de 2021 do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), foram registrados 39966 óbitos por município de residência, decorrentes de doenças hipertensivas no Brasil (Ministério da Saúde (MS) - DATASUS, 2021).

No Brasil, resultados de um estudo sobre os processos de trabalho organizados pela Estratégia Saúde da Família (ESF) para o enfrentamento de condições crônicas, como a HAS, mostraram que a redução na tendência das taxas de internação por HAS no Brasil, no período de 2010 a 2019, foi correlacionado com o aumento na cobertura da ESF (de OLIVEIRA *et al.*, 2022). Isso significa que são importantes a detecção e o tratamento da HAS nos seus estágios iniciais para que se evitem complicações, principalmente cardiovasculares, para os pacientes, bem como melhora em sua qualidade de vida e redução dos gastos com assistência especializada e de alta complexidade no país (de OLIVEIRA *et al.*, 2022).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que em 2030 cerca de 23,6 milhões de pessoas morrerão em consequência de DCV (RADOVANOVIC *et al.*, 2014). Além disso, cerca de 1,4 bilhão de pessoas em todo o mundo sofram de hipertensão, que, no entanto, só está controlada em 14% dos casos (OPAS, 2022).

Em 2008, as DCV foram responsáveis por mais de 17 milhões de óbitos, dos quais três milhões ocorreram antes dos 60 anos de idade, e muitos poderiam ter sido prevenidos (RADOVANOVIC *et al.*, 2014). Em 2019, 18,56 milhões das mortes no mundo, deveram-se às DCV (Figura 2), indicando a importância de se investir na prevenção e tratamento das mesmas (INSTITUTE FOR HEALTH METRICS AND EVALUATION (IHME); GBD, 2018-2019).

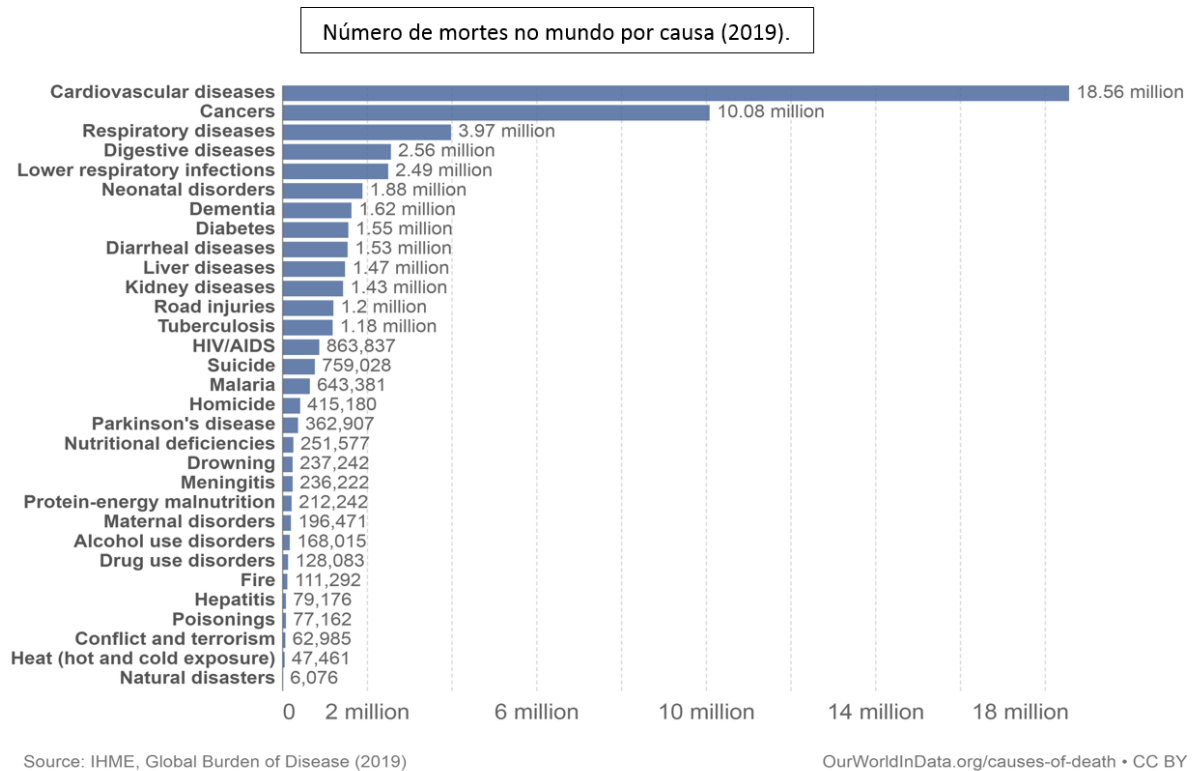


Figura 2. Número de mortes no mundo por causa, em 2019. Fonte: Adaptado de Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME); Global Burden of Disease.

1.2 Fisiopatologia da Hipertensão Arterial Sistêmica

A pressão arterial (PA) resulta do produto do débito cardíaco pela resistência vascular sistêmica (ou periférica) (HARRISON *et al.*, 2021). Os níveis fisiológicos de PA são mantidos pela interação de elementos que incluem o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), as ações dos peptídeos natriuréticos e do endotélio, o sistema nervoso simpático e, até mesmo, o sistema imunológico. Quando ocorre alguma alteração nestes fatores, há uma conseqüente variabilidade na PA, podendo aumentar seus níveis (OPARIL *et al.*, 2018).

O desenvolvimento da HAS envolve fatores genéticos, que predisõem o indivíduo a tal condição, e ambientais, como alta ingestão de sódio e de bebidas alcoólicas, tabagismo, estresse mental, além de o envelhecimento aumentar a probabilidade dessa manifestação, devido ao enrijecimento das artérias (OPARIL *et al.*, 2018).

Pacientes com HAS podem apresentar aumento do débito cardíaco e/ou da resistência vascular periférica. Além disso, é possível que haja tanto o aumento da liberação quanto da sensibilidade periférica aumentada à noradrenalina, bem como a

redefinição dos barorreflexos e redução da sensibilidade dos barorreceptores (DPHIL; SEAR, 2004).

Pode haver elevação do tônus vascular pelo aumento da estimulação dos receptores alfa-adrenérgicos ou da liberação de peptídeos, como angiotensina ou endotelinas, culminando no aumento da concentração do cálcio (Ca^{2+}) citosólico no músculo liso vascular (MLV), levando à vasoconstrição (DPHIL; SEAR, 2004). A hipertensão também está relacionada a prejuízos na vasodilatação. Isso porque o relaxamento vascular depende da integridade do endotélio e da síntese e sinalização de óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador, que estão reduzidos na hipertensão (HARRISON *et al.*, 2021).

1.3 Tratamento

O tratamento da HAS pode ser realizado através de terapias não farmacológicas e mudanças no estilo de vida, que podem incluir redução do peso corporal e do consumo de bebidas alcoólicas, realização de atividades físicas, restrição do sal, suspensão do tabagismo, melhora do padrão alimentar, controle de dislipidemias e outras comorbidades (DBHA, 2021, NOBRE *et al.*, 2013). Além disso, em grande parte dos casos, é necessário iniciar uma terapia medicamentosa.

Para ilustrar, a Figura 3 resume os mecanismos de ação de algumas das classes de fármacos que atuam no componente vascular e são utilizados no tratamento da HAS.

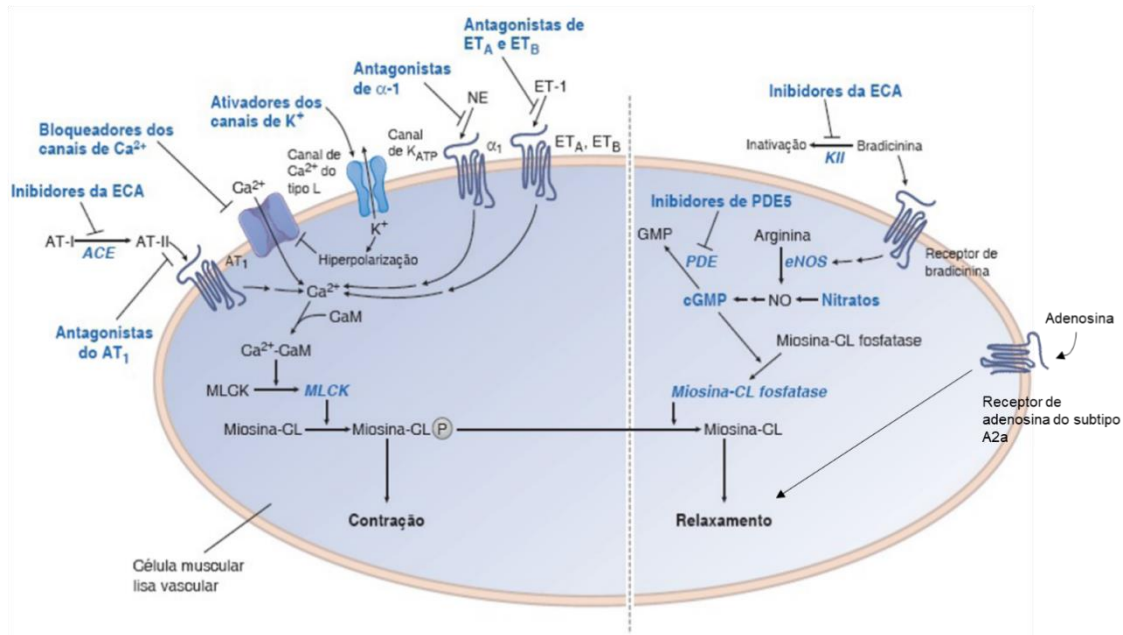


Figura 3. Representação dos locais de ação de vasodilatadores. Os vasodilatadores atuam em diversos locais na célula muscular lisa vascular. Painel da esquerda: os bloqueadores dos canais de Ca^{2+} e os ativadores dos canais de potássio (K^+) inibem a entrada de Ca^{2+} nas células musculares lisas vasculares ao diminuir a ativação dos canais de Ca^{2+} do tipo L. Todos os inibidores da ECA, antagonistas AT_1 , α_1 -antagonistas e antagonistas dos receptores de endotelina (ET_A e ET_B) diminuem a sinalização do Ca^{2+} intracelular. O Ca^{2+} citosólico diminuído resulta em menor contração do músculo liso vascular, portanto em relaxamento. Painel da direita: os inibidores da ECA inibem a cininase II (KII), ocasionando aumento dos níveis de bradicinina. Os nitratos liberam NO, e outros inibidores de PDE5 inibem a fosfodiesterase (PDE). A adenosina ativa o receptor de adenosina do tipo A_{2A} . Todos esses agentes provocam o relaxamento do músculo liso vascular. A forma ativa de cada enzima está indicada em itálico e na cor azul. α_1 = receptor α_1 -adrenérgico; ECA = enzima conversora de angiotensina; AT-I = angiotensina I; AT-II = angiotensina II; AT_1 = receptor de angiotensina II; CaM = calmodulina; eNOS = óxido nítrico sintase endotelial; ET-1 = endotelina-1; MLCK = cinase da cadeia leve de miosina; Miosina-CL = cadeia leve de miosina (Adaptado de GOLAN *et al.*, 2014).

De um modo geral, o tratamento farmacológico de primeira linha para HAS inclui um diurético tiazídico, ou semelhante a tiazídico, um inibidor da enzima conversora de angiotensina ou bloqueador do receptor de angiotensina subtipo AT_1 , e um bloqueador dos canais de cálcio (CAREY *et al.*, 2022). Outras classes de fármacos anti-hipertensivos que também podem estar presentes em esquemas terapêuticos são betabloqueadores, diuréticos de alça, diuréticos poupadores de potássio, agonistas alfa-2 adrenérgicos de ação central, bloqueadores alfa-1 adrenérgicos e vasodilatadores diretos (NOBRE *et al.*, 2013).

A DBHA (2021) indica que o tratamento farmacológico para hipertensão arterial (HA) pode ser iniciado com monoterapia, contudo a combinação de fármacos é a estratégia terapêutica preferencial para a maioria dos hipertensos, independentemente do estágio da HA e do risco CV associado. O início do tratamento deve ser feito com combinação dupla de medicamentos que tenham mecanismos de

ação distintos, exceto na associação entre diurético tiazídico e poupadores de potássio. Caso a meta pressórica não seja alcançada, ajustes de doses e/ou a combinação tripla de fármacos estarão indicados. Na sequência, mais fármacos deverão ser acrescentados até ser alcançado o controle da PA (DBHA, 2021).

Apesar da efetividade e da eficácia comprovadas do tratamento anti-hipertensivo, os índices de controle da HA ainda são insatisfatórios na maioria dos países, inclusive o Brasil (GELDSETZER *et al.*, 2019). A taxa de controle da HA no Brasil varia de 43,7% a 67,5%, de acordo com estudo realizado na atenção primária (PICON *et al.*, 2017). Os motivos para a falta de controle dos hipertensos são diversos, mas um dos fatores de maior peso nesse cenário é a falta de adesão ao tratamento por diferentes motivos. Esta falta de adesão ao tratamento tem como principal consequência a falta de controle da HA e, portanto, o aumento de lesões em órgãos-alvo e da morbimortalidade cardiovascular. Essas consequências, por sua vez, têm grande impacto econômico, devido a maiores gastos de atendimentos de saúde e aposentadorias precoces. Dentre os fatores que influenciam diretamente na adesão ao tratamento estão incluídos o custo de aquisição, esquemas posológicos complexos e efeitos adversos. Estes fatores são ainda mais significativos quando há necessidade de tratamento com múltiplos fármacos (DBHA, 2021).

A respeito dos efeitos adversos, há aumento da frequência cardíaca para fármacos da classe dos antagonistas alfa-adrenérgicos e bloqueadores de canais de cálcio, da ativação do sistema nervoso simpático para antagonistas alfa adrenérgicos, bloqueadores de canais de cálcio e diuréticos tiazídicos, ativação do SRAA para bloqueadores de canais de cálcio e diuréticos tiazídicos. Além disso, há efeitos desfavoráveis relacionados aos níveis plasmáticos de lipídeos e glicemia para os fármacos da classe dos diuréticos tiazídicos e para a maioria dos betabloqueadores (LEONETTI; EGAN, 2012).

Adicionalmente, cerca de 12 a 15% dos pacientes hipertensos, apresentam a hipertensão arterial resistente (HAR), que é definida como condição que apresenta níveis pressóricos acima de 140/90 mmHg mesmo com o uso de três ou mais classes de anti-hipertensivos com ações sinérgicas, em doses máximas preconizadas ou toleradas, sendo um deles preferencialmente um diurético tiazídico; e quando se encontram em uso de quatro ou mais fármacos anti-hipertensivos, mesmo com a pressão arterial controlada (BRANDÃO; NOGUEIRA, 2018).

De um modo geral, e, por ser frequentemente assintomática, a HAS pode evoluir com alterações estruturais e/ou funcionais em órgãos-alvo, como coração, cérebro, rins e vasos. Com isso, pode-se destacar que a HAS e suas complicações são muito relacionadas à disfunção endotelial, caracterizada pela baixa disponibilidade de NO e pelo consequente desequilíbrio local entre fatores de relaxamento e constrição de arteríolas, o que resulta em um aumento da resistência vascular periférica (KANEL; LARSON, 1993; DBHA, 2021).

1.4 Desenvolvimento de fármacos

Neste contexto, é sempre importante a busca de novas estratégias para a prevenção e o tratamento de DCV. Assim, uma substância foi planejada pelo emprego da estratégia de simplificação molecular e sintetizado a partir do safrol, principal componente químico do óleo de sassafrás, pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®) designada LASSBio-294 – 3,4-metilenodioxibenzoil-2-tienilhidrazona, descrita como um inotrópico positivo (BARREIRO, 2002, SUDO *et al.*, 2001) e possível alternativa terapêutica para disfunção diastólica por reduzir a pressão de enchimento ventricular ao favorecer o aumento da recaptção de cálcio para o retículo sarcoplasmático (COSTA *et al.*, 2010). De acordo com os resultados obtidos com o LASSBio-294 no tratamento da insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio em ratos normotensos e hipertensos (COSTA *et al.*, 2010, da SILVA, 2012, da SILVA *et al.*, 2014, da SILVA *et al.*, 2017), em conjunto a ensaios de competição com radioligantes, foi identificado que seus efeitos estariam relacionados com a ativação de receptores de adenosina do subtipo A_{2A} (da SILVA *et al.*, 2017).

A adenosina, produto do metabolismo do trifosfato de adenosina (ATP), promove vasoconstrição ou vasodilatação de veias e artérias (SHETH *et al.*, 2014). Quando este metabólito ou outro agonista se liga aos receptores A_{2A} na superfície das células do MLV, há a ativação da adenilato ciclase (AC), o aumento da concentração de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e a ativação da proteína cinase A (PKA). Conseqüentemente, ocorre a abertura de canais de K^+ , resultando na hiperpolarização da membrana das células do MLV com consequente bloqueio de canais de Ca^{2+} voltagem dependente, levando à redução do influxo de Ca^{2+} e, assim, vasodilatação (RADICO *et al.*, 2014). O receptor da adenosina do tipo A_{2A} também se encontra no

endotélio vascular e, quando ativado, provoca a ativação da PKA, que por sua vez, ativa a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), levando à produção de NO, o qual se difunde para a camada do MLV e induz a vasodilatação (LEAL, 2014, RAY; MARSHALL, 2006) (Figura 4).

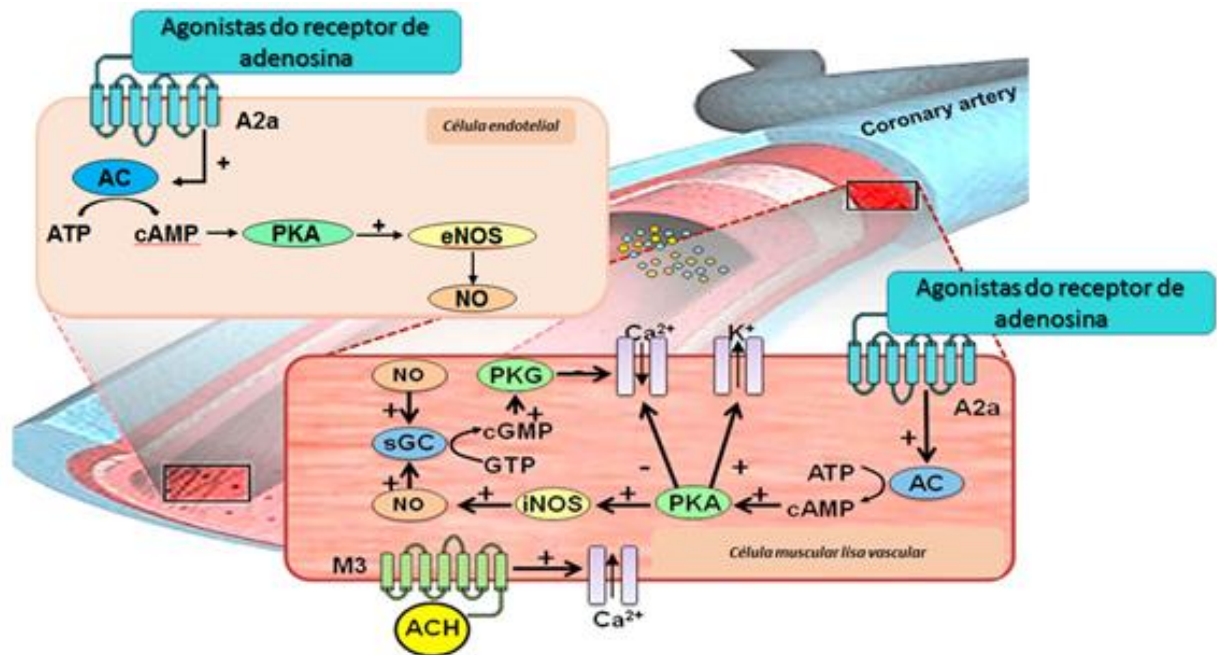


Figura 4. Efeitos vasculares dos agonistas dos receptores de adenosina do subtipo A_{2A}. A ativação de receptores de adenosina do subtipo A_{2A} na superfície das células musculares lisas vasculares, ativa a adenilato ciclase (AC), conduzindo a um aumento da concentração de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e da ativação da proteína cinase dependente de AMPc (PKA). Esta última resulta na abertura do canal de potássio (K⁺), resultando numa hiperpolarização das células musculares lisas vasculares, inibe a entrada de Ca²⁺, além de levar à formação de NO, produzindo assim vasodilatação. ATP = trifosfato de adenosina (Adaptado de RADICO *et al.*, 2014).

No entanto, além do receptor A_{2A}, existem outros três subtipos de receptores de adenosina, denominados A₁, A_{2B} e A₃, todos pertencentes à superfamília dos receptores acoplados à proteína G (GPCR), sendo que os subtipos A₁ e A₃ são acoplados a proteínas Gi/o, enquanto A_{2A} e A_{2B} são acoplados a proteínas Gs. Assim, enquanto a ativação de A_{2A} e A_{2B} aumenta a produção de cAMP e ativa PKA, a ativação de A₁ e A₃ inibe a produção de cAMP e diminui a atividade de PKA (SHETH *et al.*, 2014).

Através de modificação estrutural do LASSBio-294 por retroisosterismo originou-se o LASSBio-1027, que demonstrou ter efeitos terapêuticos via receptores de adenosina A_{2A}, bem como via subtipo A₃, promovendo melhora da HA em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (LEAL *et al.*, 2012). A ativação deste receptor,

além de inibir a atividade da AC, via proteína Gi, também pode estimular, quando acoplado à proteína Gq, a via da fosfolipase C (PLC), resultando na elevação dos níveis intracelulares de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e cálcio. Além disso, através da ativação de proteínas Gi/o, via subunidades Gβγ, resulta na ativação do canal de potássio sensível a ATP (K_{ATP}) e na redução da entrada de cálcio no meio intracelular (Figura 5) (NISHAT *et al.*, 2016).

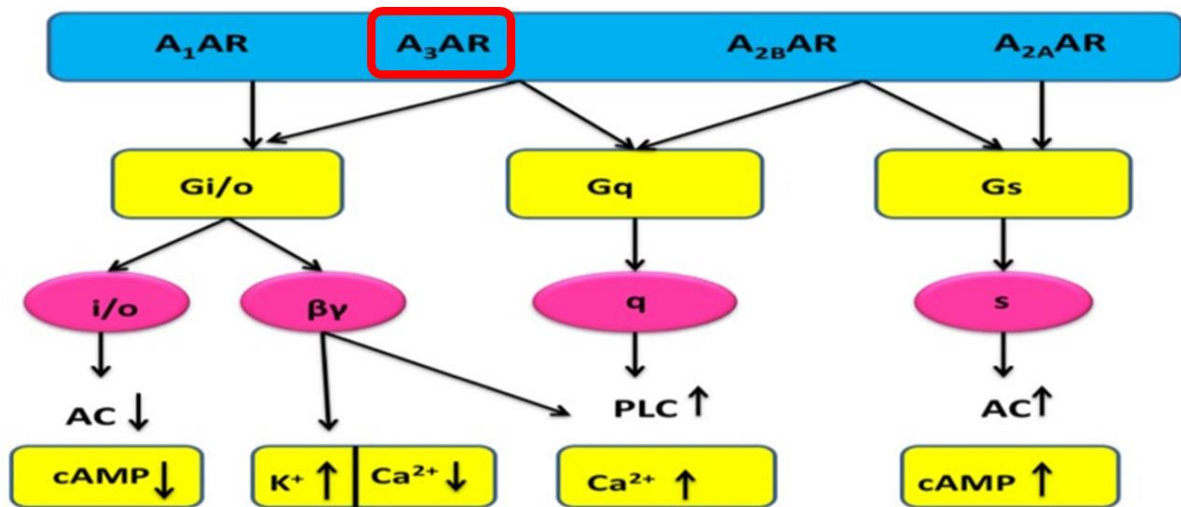


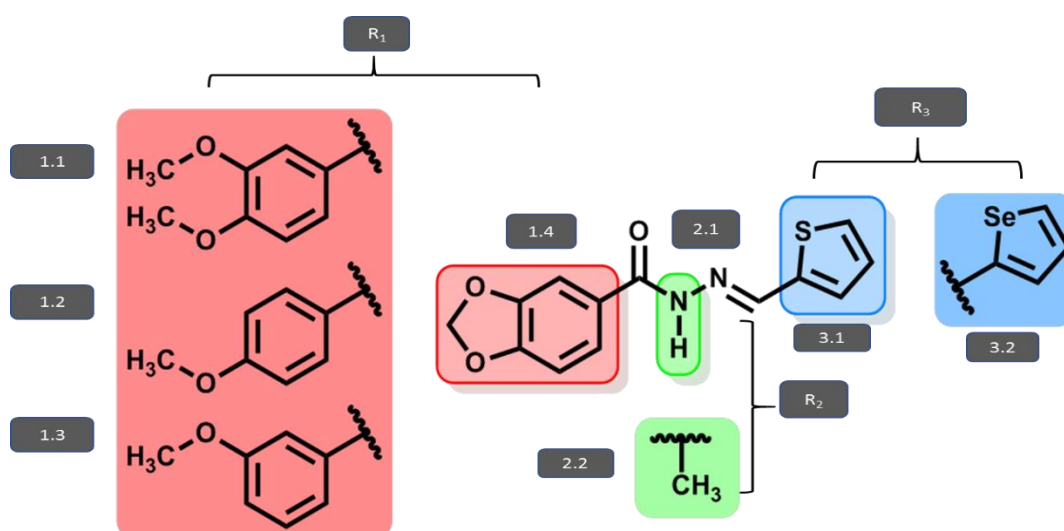
Figura 5. Ativação dos receptores de adenosina, com destaque para o subtipo A₃. O receptor de adenosina do subtipo A₃, quando acoplado à proteína Gi/o, não promove ativação da AC e, conseqüentemente, redução da concentração de cAMP. Via subunidade Gβγ, promove ativação da PLC, bem como ativação de canais de K⁺ e bloqueio de canais de Ca²⁺. Quando acoplado à proteína Gq, ativa a PLC e promove liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático. A₁AR= receptor de adenosina do subtipo A₁; A₃AR= receptor de adenosina do subtipo A₃; A_{2B}AR= receptor de adenosina do subtipo A_{2B}; A_{2A}AR= receptor de adenosina do subtipo A_{2A}; AC= adenilato ciclase; cAMP= adenosina monofosfato cíclico; PLC= fosfolipase C (Adaptado de NISHAT *et al.*, 2016).

Visto a eficácia do LASSBio-294, novas séries de análogos foram planejadas, através de alterações em sua estrutura química, visando à obtenção de novos compostos com potencial vasodilatador para o tratamento da HAS e suas complicações cardíacas. Tais substâncias foram desenvolvidas com base no bioisosterismo, que é uma estratégia da Química Medicinal para o desenho racional de novos fármacos, como um processo especial de modificação molecular (LIMA; BARREIRO, 2005).

Ao passo que o composto LASSBio-294 é um protótipo cardioativo com atividade vasodilatadora dependente do endotélio vascular, seu análogo *N*-metilado, denominado LASSBio-785, apresentou maior potência para o efeito vasodilatador, mas independente da integridade endotelial. Desse modo, nota-se que características

estruturais pontuais e modificações moleculares podem levar à obtenção de uma substância com as propriedades desejadas (KÜMMERLE *et al.*, 2009, de MIRANDA, 2011, SILVA *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de novos compostos *N*-acilidrazônicos derivados do LASSBio-294 com a substituição do átomo de enxofre (–S) pelo selênio (–Se) (Figura 5), que é o enfoque deste trabalho, foi realizado com o intuito de se encontrar uma possível melhora na interação entre a molécula e seu sítio de ação. Ou seja, o bioisosterismo clássico implementado teve como objetivo verificar se o aumento da polarizabilidade do selênio levaria a uma restrição conformacional maior durante a interação que pudesse mimetizar a metilação (BARREIRO, 2021). Além disso, o selênio é um microelemento essencial envolvido no sistema antioxidante do organismo através da enzima glutatona peroxidase (GIERUS, 2007).



Substância	R ₁	R ₂	R ₃
LASSBio-294	1.4	2.1	3.1
LASSBio-785	1.4	2.2	3.1
LASSBio-2062	1.4	2.1	3.2
LASSBio-2063	1.4	2.2	3.2
LASSBio-430	1.1	2.1	3.1
LASSBio-2075	1.1	2.1	3.2
LASSBio-2084	1.2	2.1	3.1
LASSBio-2076	1.2	2.1	3.2
LASSBio-2092	1.3	2.1	3.1
LASSBio-2093	1.3	2.1	3.2

Figura 6. Estrutura química dos derivados *N*-acilidrazônicos. “Radical 1 (R₁)”= -OCH₂O- ou - 3,4-OCH₃ ou - 3-OCH₃ ou - 4-OCH₃; “Radical 2 (R₂)”= - H ou - CH₃; “Radical 3 (R₃)”= anel tiofeno ou anel selenofeno (Elaborado por Tadeu L. Montagnoli).

2 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de novos compostos *N*-acilidrazônicos com a substituição do átomo de enxofre (–S) pelo selênio (–Se) deve-se ao fato de que a conformação do composto restrita pelo selênio junto do nitrogênio sp^2 da cadeia da *N*-acilidrazona é um fator de restrição conformacional muito mais significativo do que quando se tem o enxofre. Este fato poderia assemelhar a conformação do derivado *N*-metilado (BARREIRO, 2021) para melhorar a interação substância-sítio de ação e, conseqüentemente, aumentar a potência vasodilatadora da atividade biológica. Adicionalmente, foi demonstrado que algumas das alterações estruturais propostas para essa nova série de substâncias poderiam gerar compostos que apresentam mecanismo de ação multialvo. Esta possibilidade favoreceria um dos problemas atuais para o tratamento da HAS, que é a adesão dos pacientes à terapia medicamentosa. A reduzida aderência ao esquema terapêutico se deve ao fato de o uso de múltiplos medicamentos e/ou de administrações, efeitos adversos, para o adequado controle da hipertensão arterial (DBHA, 2021).

Este trabalho apresenta a proposta de avaliação de novas substâncias candidatas a fármacos para o tratamento da HAS com o intuito de, possivelmente, estabelecer uma monoterapia e reduzir a incidência de efeitos adversos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de novos derivados *N*-acilidrazônicos de LASSBio-294 na reatividade vascular *in vitro* e possível ação anti-hipertensiva em ratos.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a reatividade vascular através do registro da tensão isométrica de anéis de aorta torácica isolada com e sem endotélio íntegro;
- Investigar os prováveis mecanismos envolvidos na ação vasodilatadora;
- Determinar o efeito anti-hipertensivo dos derivados selecionados através do registro de pressão sanguínea e frequência cardíaca após administração intravenosa em SHR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de ética

Os experimentos foram realizados de acordo com os protocolos aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ sob número 017/19. Ratos Wistar machos, ratos Wistar-Kyoto (WKY) (grupo controle) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR, 12-15 semanas de idade), pesando entre 220 e 250 g foram mantidos em ambiente com controle de temperatura e ciclos claro/escuro de 12 horas, com acesso a água e ração *ad libitum*.

4.2 Substâncias

As substâncias utilizadas foram sintetizadas pela Dra. Júlia Galvez Bulhões Pedreira durante seu doutorado e apresentadas em sua tese, sob orientação e supervisão do Prof. Dr. Eliezer Barreiro, coordenador científico do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sendo os compostos denominados LASSBio-2062, LASSBio-2063, LASSBio-430, LASSBio-2075, LASSBio-2084, LASSBio-2076, LASSBio-2092 e LASSBio-2093, dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) para a realização dos experimentos.

4.3 Experimentos *in vitro*

4.3.1 Reatividade vascular

O registro de tensão isométrica de artéria aorta foi utilizado para a avaliação do efeito das substâncias na reatividade vascular. Ratos Wistar machos foram eutanasiados para retirada da aorta torácica para, em seguida, ser seccionada em anéis de 2-3 mm a serem posicionados em cubas experimentais contendo 20 mL de solução Tyrode modificada constituída de (em mM): 123 NaCl; 4,7 KCl; 15,5 NaHCO₃; 1,2 CaCl₂; 1,2 KH₂PO₄; 1,2 MgCl₂; e 11,5 glicose (reagentes adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil)); mantidos com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) a 37°C e pH 7,4. Após 2 horas de estabilização com 1 g de tensão inicial, os anéis foram inicialmente expostos a 10 µM de fenilefrina (Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)) para promover contração máxima registrada, através do uso de transdutor de força (Digidata 1322A) e conectado a um sistema de aquisição (AXoScope 8.1,

AxonInstruments, Inc). Em seguida, realizou-se exposição a 10 μ M de acetilcolina (ACh) (Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)) para induzir relaxamento que, quando igual ou maior a 80%, representava a integridade funcional do endotélio vascular. No entanto, quando os anéis de aorta submetidos à remoção mecânica do endotélio apresentavam relaxamento vascular menor ou igual a 10% em resposta a ACh, foram considerados com ausência de endotélio íntegro.

Após a avaliação da integridade endotelial, as preparações foram lavadas durante 45 minutos com a solução Tyrode modificada e uma nova contratatura foi induzida através da exposição a 10 μ M de fenilefrina. Em seguida, as preparações foram submetidas a exposição de concentrações crescentes das substâncias em teste LASSBio-2062, LASSBio-2063, LASSBio-430, LASSBio-2075, LASSBio-2084, LASSBio-2076, LASSBio-2092 e LASSBio-2093 (0,1 a 100 μ M) para obtenção de curva concentração-resposta para cada substância e cálculo da concentração eficaz média (CE_{50}) (PEREIRA *et al.*, 2014; PONTES *et al.*, 2012). Em alguns dos experimentos, mesmo protocolo foi realizado após remoção mecânica do endotélio para avaliar o envolvimento da integridade endotelial na ação vasodilatadora dos derivados.

4.3.1.1 Investigação dos mecanismos envolvidos para ação vascular

Inicialmente, foi avaliado se o efeito das substâncias era dependente da integridade do endotélio vascular. Numa etapa seguinte, foi realizada a análise da ação de LASSBio-2062 e LASSBio-2063 na reatividade vascular, na presença de antagonistas de receptores de adenosina. Para tanto, os anéis de aorta foram previamente incubados com 0,1 μ M de ZM-241385 (Tocris Bioscience™ (Ellisville, MO, USA)), um antagonista de receptor de adenosina A_{2A} ou com 0,1 μ M de MRE 3008F20 (Tocris Bioscience™ (Ellisville, MO, USA)), um antagonista de receptor de adenosina A_3 , antes da indução da contração por fenilefrina.

Para a investigação da participação dos canais de K na ação de relaxamento vascular, efetuou-se a pré-adição de 10 μ M de glibenclamida (Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)), um bloqueador do canal K_{ATP} ; 3 mM de 4-aminopiridina (4-AP) (Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)), um bloqueador do canal de potássio voltagem-dependente (K_V); 3 mM de cloreto de tetraetilamônio (TEA), um bloqueador do canal de potássio dependente de cálcio de alta condutância (BK_{Ca}) (Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)).

O efeito das substâncias LASSBio-2062 e LASSBio-2063 na resposta contrátil vascular induzida pelo Ca^{2+} foi investigada utilizando-se o seguinte protocolo: após o período de estabilização das preparações durante 120 minutos, anéis de aorta desprovidos de endotélio vascular foram mantidos em solução Tyrode modificada sem CaCl_2 por 15 minutos. Em seguida, esta solução foi substituída por outra despolarizante contendo 40 mM de KCl e sem Ca^{2+} acrescida de LASSBio-2062 ou LASSBio-2063 (50 μM). Após 15 min, adicionaram-se concentrações crescentes de CaCl_2 (10^{-6} – 10^{-3} M) (PEREIRA *et al.*, 2014).

4.3.2 Registro de tensão isométrica de músculo cardíaco

Ratos Wistar machos foram anestesiados para a realização da retirada dos músculos papilares do ventrículo esquerdo, que foram posicionados em cubas experimentais contendo solução nutritiva constituída em (mM): NaCl, 130; KCl, 5,0; MgCl_2 , 1,0; dextrose, 5,6; NaHCO_3 , 24,8; CaCl_2 , 2,5; NaH_2PO_4 , 0,9 (reagentes adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil)); mantidos com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) a 37°C e pH 7,4. Os músculos papilares foram estabilizados por 30 minutos sob estimulação elétrica de 50 V e 1 Hz, sendo os abalos captados por um transdutor de tensão, com dados digitalizados e armazenados em computador (Powerlab, ADInstruments, Austrália) para posterior análise no programa Lab Chart (versão 7.0, ADInstruments, Austrália). Após 30 minutos de estabilização, foram adicionadas concentrações crescentes de LASSBio-2062 ou LASSBio-2063 (1,0 – 50 μM).

4.4 Experimentos *in vivo*

4.4.1 Medida da pressão arterial e frequência cardíaca

Após anestesia com cetamina (80 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, por via intraperitoneal (i.p.)) (Cristália[®]) e xilazina (15 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) (Syntec do Brasil LTDA), SHR e WKY foram submetidos a introdução de cateter na artéria carótida direita preenchido com soro fisiológico acrescido de heparina. O cateter conectado a transdutor de pressão (MLT884, ADInstruments) possibilitou o registro da pressão arterial sistólica (PAS), pressão diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). As substâncias LASSBio-2062 e LASSBio-2063 (10 e 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$, por via intravenosa (i.v.)) foram administradas pela veia jugular esquerda nos animais, a fim de se avaliar seus efeitos na pressão sanguínea. Para isso, foram preparadas

soluções de concentração de, aproximadamente, 30 e 100 mg.mL⁻¹ para que fossem administradas as doses de 10 e 30 µmol.kg⁻¹, respectivamente. Todos os registros foram obtidos através de um sistema de aquisição (Powerlab, ADInstruments, Austrália), utilizando-se o programa Lab Chart (versão 7.0, ADInstruments, Austrália).

SHR foi o modelo animal de hipertensão utilizado neste trabalho, pois a doença vascular hipertensiva em SHR assemelha-se à hipertensão humana essencial em muitos aspectos, incluindo o seu aparecimento no decorrer do envelhecimento, bem como as alterações hemodinâmicas e complicações cardiovasculares que podem induzir. Além de uma pressão arterial mais elevada e uma frequência cardíaca mais rápida do que ratos normotensos da mesma linhagem (WKYs), os SHRs têm um peso cardíaco maior, uma atividade de renina plasmática semelhante ou menor e, eventualmente, desenvolvem hiper-reatividade vascular a agentes vasopressores (RICHER *et al.*, 1978).

4.5 Análise estatística

Os resultados expressos como média ± erro padrão da média (EPM) foram analisados utilizando-se o programa Prism 6.0 (GraphPad, EUA). A concentração que provocou 50% do efeito vasodilatador máximo (CE₅₀) foi calculada para cada substância testada. O teste *t* de Student foi utilizado para comparar as médias obtidas para cada concentração nas duas condições experimentais (endotélio ou sem endotélio; presença ou ausência de inibidor) ou para a comparação dos dois grupos experimentais. Para análise estatística da comparação de múltiplos grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com *post-test Tukey*. A diferença entre os grupos experimentais foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Reatividade vascular em anéis de aorta com e sem endotélio íntegro

As substâncias *N*-acilidrazônicas foram avaliadas inicialmente quanto ao potencial em produzir vasodilatação, comparativamente ao protótipo LASSBio-294, que apresenta um anel 1,3-benzodioxola e um anel tiofeno. LASSBio-294 e seus derivados, cujas estruturas estão representadas de modo genérico na Figura 7, foram testados em anéis de aorta com e sem endotélio íntegro, que foram expostos a concentrações crescentes (0,1 – 100 μ M) de cada um dos análogos.

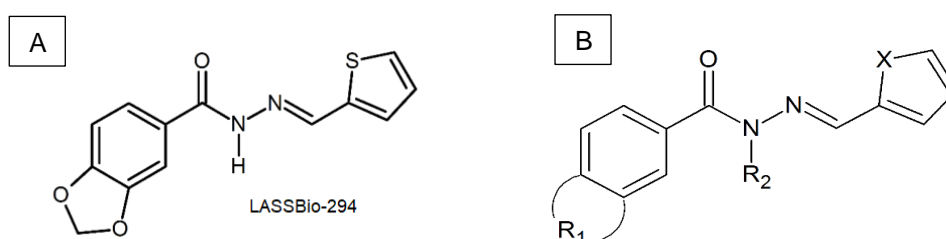


Figura 7. Estrutura do LASSBio-294 (A) e estrutura genérica indicando os pontos de alteração na molécula deste composto (B), os quais originaram seus respectivos análogos, onde: “X”= S ou Se; “Radical 1 (R₁)”= -OCH₂O- ou - 3,4-OCH₃ ou - 3-OCH₃ ou - 4-OCH₃; e “Radical 2 (R₂)”= - H ou - CH₃.

LASSBio-294 (100 μ M) produziu relaxamento máximo de $73,0 \pm 12,1\%$, e apresentou a CE₅₀ de $65,4 \pm 30,0 \mu$ M.

Na Tabela 1, encontram-se os valores de CE₅₀ para o precursor LASSBio-294, seu derivado LASSBio-785, bem como os compostos correlatos com substituição do -S por -Se em anéis de aorta com e sem endotélio íntegro.

LASSBio-2062, análogo do LASSBio-294 no qual o anel tiofeno foi substituído pelo anel selenofeno, produziu relaxamento máximo de $84,4 \pm 4,1\%$ e apresentou CE₅₀ menor que o obtido pelo LASSBio-294, ou seja, de $14,7 \pm 5,2 \mu$ M ($p < 0,05$) em anéis de aorta com endotélio. Essa alteração também levou a melhora da resposta do LASSBio-2062 em anéis de aorta sem endotélio com redução da CE₅₀, comparado ao LASSBio-294 (Tabela 1).

LASSBio-2063, derivado *N*-metilado com anel de selenofeno, promoveu relaxamento máximo em anéis de aorta com e sem endotélio íntegro de $94,8 \pm 2,1$ e $97,1 \pm 1,6\%$, respectivamente (Figura 9). Os valores de CE_{50} foram $14,6 \pm 2,9$ e $18,2 \pm 6,3 \mu\text{M}$ para anéis de aorta com e sem integridade endotelial, indicando que a ação da substância foi independente da funcionalidade do endotélio vascular.

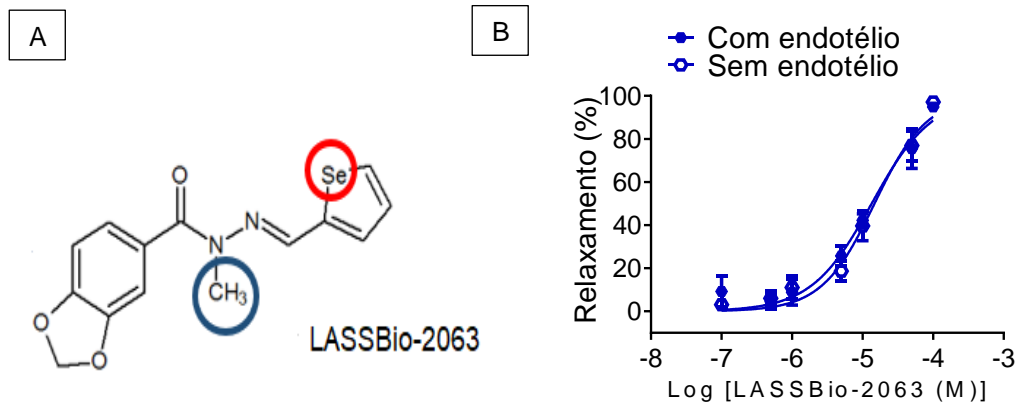


Figura 9. Curvas de concentração-resposta vascular do LASSBio-2063 em anéis de aorta com (n= 5) e sem (n= 7) endotélio vascular íntegro. Dados expressos como média \pm EPM. Análise por *two-way* ANOVA seguido pelo *post-test* Tukey.

A síntese do LASSBio-430 baseou-se na abertura do anel 1,3-benzodioxola (Figura 10), cujos resultados indicam houve aumento da eficácia e potência da vasodilatação, com relaxamento máximo de $99,5 \pm 0,5\%$ e CE_{50} de $10,1 \pm 3,1 \mu\text{M}$ (Figura 10, Tabela 1). A CE_{50} do efeito vasodilatador foi de $14,1 \pm 2,8 \mu\text{M}$ em anéis sem endotélio vascular íntegro, sugerindo ausência de necessidade da funcionalidade endotelial.

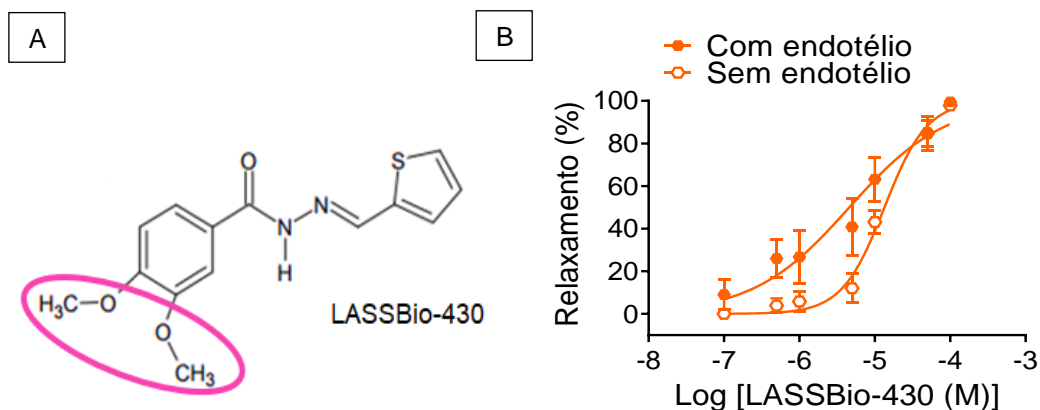


Figura 10. Curvas concentração-resposta vascular do LASSBio-430 em anéis de aorta com (n= 8) e sem (n= 5) endotélio íntegro. Dados expressos como média \pm EPM. Análise por *two-way* ANOVA seguido pelo *post-test* Tukey.

A substituição do S pelo Se na estrutura do LASSBio-430, gerando o LASSBio-2075, não promoveu alteração na resposta em aorta com endotélio. Contudo, reduziu significativamente o relaxamento em aorta sem endotélio, ocasionando deslocamento para direita da curva concentração-resposta do LASSBio-2075 (Figura 11), com consequente aumento da CE_{50} de $18,7 \pm 9,6$ para $> 100 \mu\text{M}$, em anéis de aorta com e sem endotélio vascular, respectivamente.

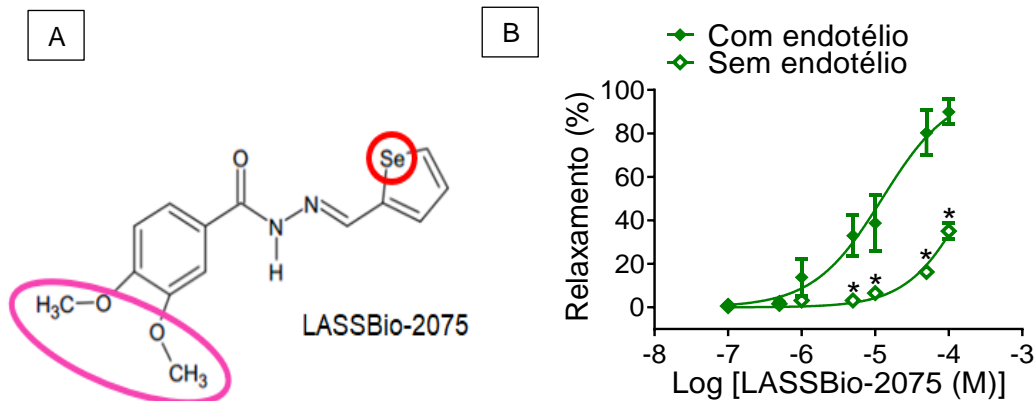


Figura 11. Curvas concentração-resposta vascular do LASSBio-2075 em anéis de aorta com (n= 5) e sem (n= 5) endotélio vascular. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs com endotélio. Análise por *two-way* ANOVA seguido pelo *post-test* Tukey.

No entanto, o derivado *p*-metoxilado, denominado LASSBio-2084, provocou relaxamento máximo de apenas $45,2 \pm 18,9\%$ e com $CE_{50} > 100 \mu\text{M}$ em anéis de aorta que apresentaram integridade endotelial (Figura 12).

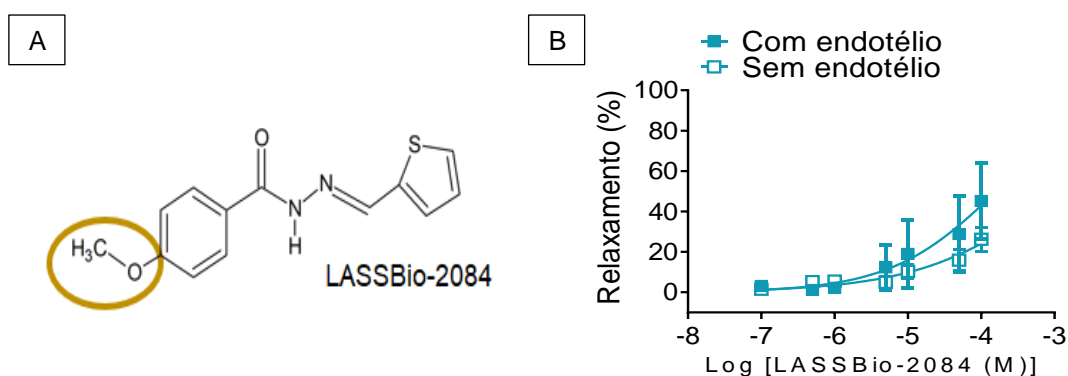


Figura 12. Curvas de concentração-resposta vascular do LASSBio-2084 em anéis de aorta com (n= 5) e sem (n= 5) endotélio vascular. Dados expressos como média \pm EPM. Análise por *two-way* ANOVA seguido pelo *post-test* Tukey.

A substituição com o anel selenofeno no derivado *p*-metoxilado, LASSBio-2076 (Figura 13) promoveu relaxamento de $92,9 \pm 2,6\%$ que foi reduzido para $32,4 \pm 17,9\%$ quando retirado o endotélio vascular dos anéis de aorta. A dependência da integridade

vascular para a ação vasodilatadora de LASSBio-2076 foi confirmada pelo aumento da CE_{50} de $8,8 \pm 3,3 \mu\text{M}$, na presença do endotélio, para $60,1 \pm 20,2 \mu\text{M}$ na ausência de integridade endotelial.

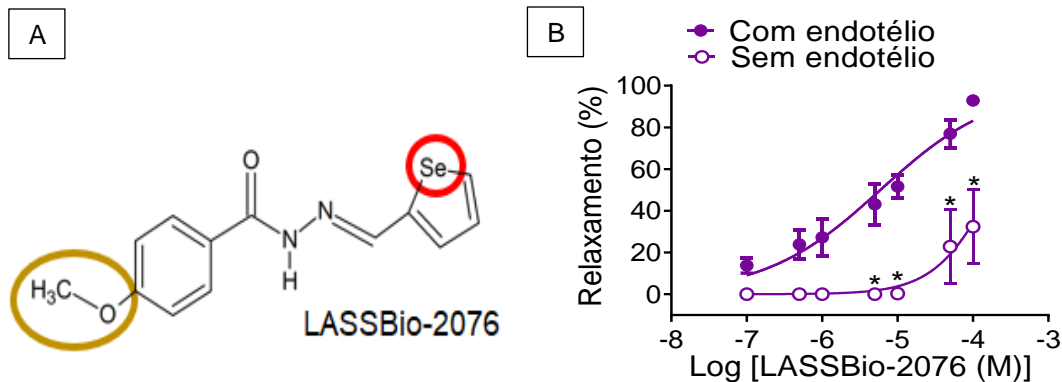


Figura 13. Curvas de concentração-resposta vascular do LASSBio-2076 em anéis de aorta com (n= 7) e sem (n= 3) endotélio vascular. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs com endotélio. Análise por *two-way* ANOVA seguido pelo *post-test Tukey*.

Já o análogo 1,3-metoxilado, denominado LASSBio-2092, apresentou aumento da potência vasodilatadora e promoveu relaxamento máximo, na concentração de $100 \mu\text{M}$ de $77,6 \pm 8,2\%$ (Figura 14). Os valores de CE_{50} em anéis de aorta com e sem endotélio, foram de $37,8 \pm 11,8$ e $59,8 \pm 11,9 \mu\text{M}$, respectivamente.

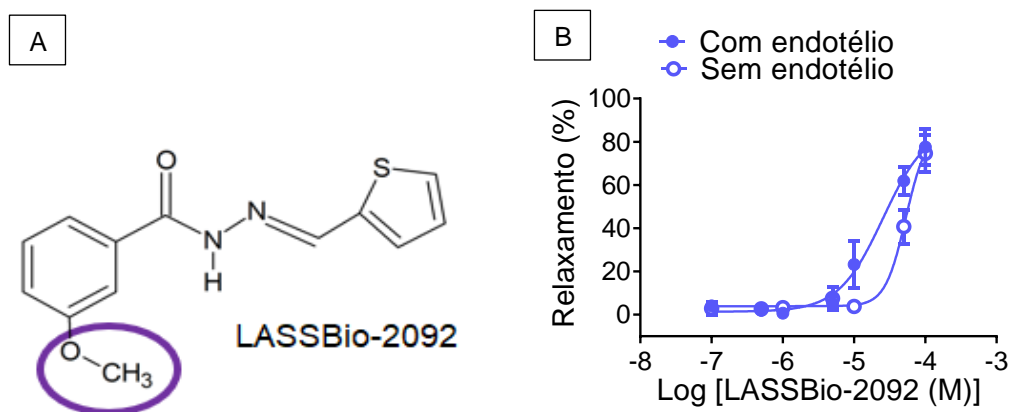


Figura 14. Curvas de concentração-resposta vascular do LASSBio-2092 em anéis de aorta com (n= 4) e sem (n= 3) endotélio vascular. Dados expressos como média \pm EPM. Análise por *two-way* ANOVA seguido pelo *post-test Tukey*.

A metoxilação na posição *meta* e a presença do anel selenofeno na estrutura do composto LASSBio-2093, representado na Figura 15, permitiram o aumento da potência em comparação ao LASSBio-294 e ao LASSBio-2092, cujos resultados foram apresentados anteriormente.

LASSBio-2093 produziu relaxamento vascular de $95,1 \pm 4,4\%$ com CE_{50} de $15,9 \pm 5,7\mu\text{M}$. No entanto, com a retirada do endotélio, o relaxamento foi de $53,2 \pm 7,9\%$ e $CE_{50} > 100 \mu\text{M}$.

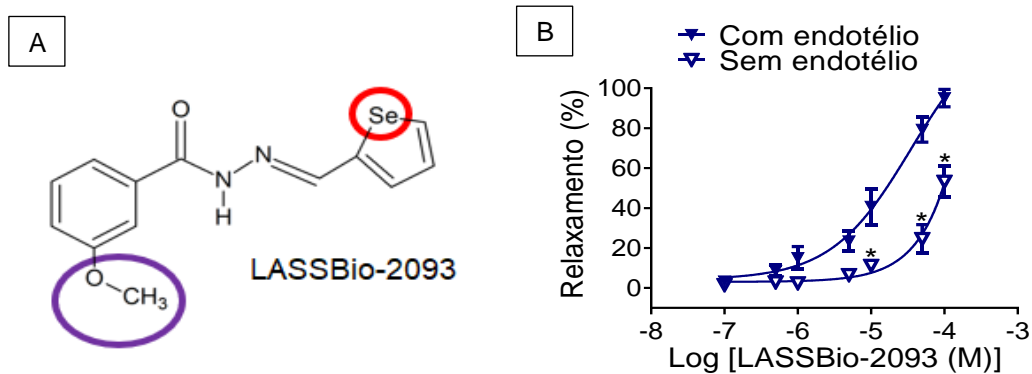


Figura 15. Curvas de concentração-resposta vascular do LASSBio-2093 em anéis de aorta com (n= 5) e sem (n= 5) endotélio vascular. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs com endotélio. Análise por *two-way* ANOVA seguido pelo *post-test Tukey*.

Em resumo, todos os compostos exceto o LASSBio-2084 promoveram relaxamento vascular em anéis de aorta com endotélio íntegro.

Pela semelhança estrutural com as substâncias que deram origem a série de análogos – LASSBio-294 e LASSBio-785 –, os derivados LASSBio-2062, que depende do endotélio funcional para promover vasodilatação, e LASSBio-2063, que promove relaxamento vascular sem necessitar de endotélio íntegro, foram selecionados para a continuidade da investigação dos mecanismos envolvidos na ação vasodilatadora como possível ação anti-hipertensiva *in vivo*.

5.2 Investigação dos mecanismos envolvidos na ação vasodilatadora do composto LASSBio-2062

5.2.1 Via dos receptores de adenosina

5.2.1.1 Via dos receptores de adenosina do subtipo A_{2A}

Visando investigar o envolvimento da via da adenosina na ação dos derivados do LASSBio-294, realizou-se a pré-incubação dos anéis de aorta com endotélio com ZM-241385 ($0,1 \mu\text{M}$), um antagonista de receptores de adenosina do tipo A_{2A} . Esta avaliação se baseou ao fato de LASSBio-294 ter sido descrito como um agonista do receptor de adenosina do tipo A_{2A} .

Em relação à substância LASSBio-2062, quando os anéis foram pré-incubados com ZM-241385, a CE_{50} foi de $22,1 \pm 11,4 \mu\text{M}$, com relaxamento máximo de $89,2 \pm 6,0\%$ (Figura 16). Note a sobreposição das curvas concentração-resposta vascular quando na ausência ou presença do antagonista do receptor de adenosina A_{2A} .

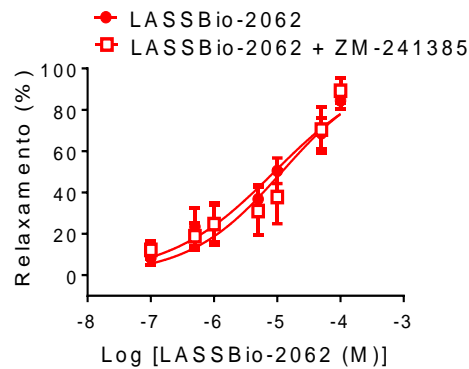


Figura 16. Curvas de concentração-resposta vascular do composto LASSBio-2062 em anéis de aorta com endotélio na ausência (n= 7) ou presença do ZM-241385 (0,1 μM) (n= 6), um antagonista de receptor de adenosina A_{2A} . Dados expressos como média \pm EPM. Análise por *two-way* ANOVA seguido pelo *post-test* Tukey.

5.2.1.2 Via dos receptores de adenosina do subtipo A_3

Para a avaliação do possível envolvimento do receptor de adenosina do subtipo A_3 localizado na musculatura lisa vascular, a vasodilatação promovida pelo LASSBio-2062, foi observada após pré-exposição dos anéis sem endotélio com o antagonista seletivo deste receptor, denominado MRE 3008F20 (0,1 μM) (Figura 17).

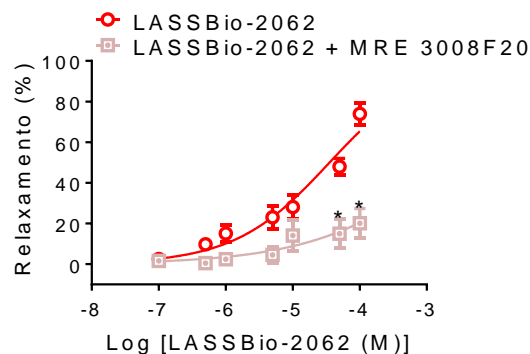


Figura 17. Curvas de concentração-resposta da administração da substância em anéis de aorta sem endotélio (n= 8). E, em comparação, temos a curva de concentração-resposta da administração do mesmo composto em anéis de aorta sem endotélio pré-incubados (20 minutos antes) com MRE 3008F20 (0,1 μM) (antagonista de receptor de adenosina A_3) (n= 6). Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs LASSBio-2062. Análise por *two-way* ANOVA seguido pelo *post-test* Tukey.

Desse modo, notou-se um deslocamento significativo da curva de relaxamento da substância na presença deste antagonista (Figura 17), no qual o valor de CE_{50} foi $>100 \mu\text{M}$.

5.2.2 Participação dos canais de potássio na ação vasodilatadora do derivado LASSBio-2062

Em continuidade à investigação dos mecanismos envolvidos na ação dos novos derivados *N*-acilimidrazônicos, realizou-se a pré-incubação dos anéis de aorta sem endotélio com bloqueadores de diferentes canais de K presentes na musculatura lisa vascular, tais como glibenclamida, tetraetilamônio (TEA), 4-aminopiridina (4-AP). A exposição prévia a glibenclamida ($10 \mu\text{M}$), um bloqueador do canal K_{ATP} , inibiu completamente o efeito relaxante vascular do LASSBio-2062 (Figura 18A).

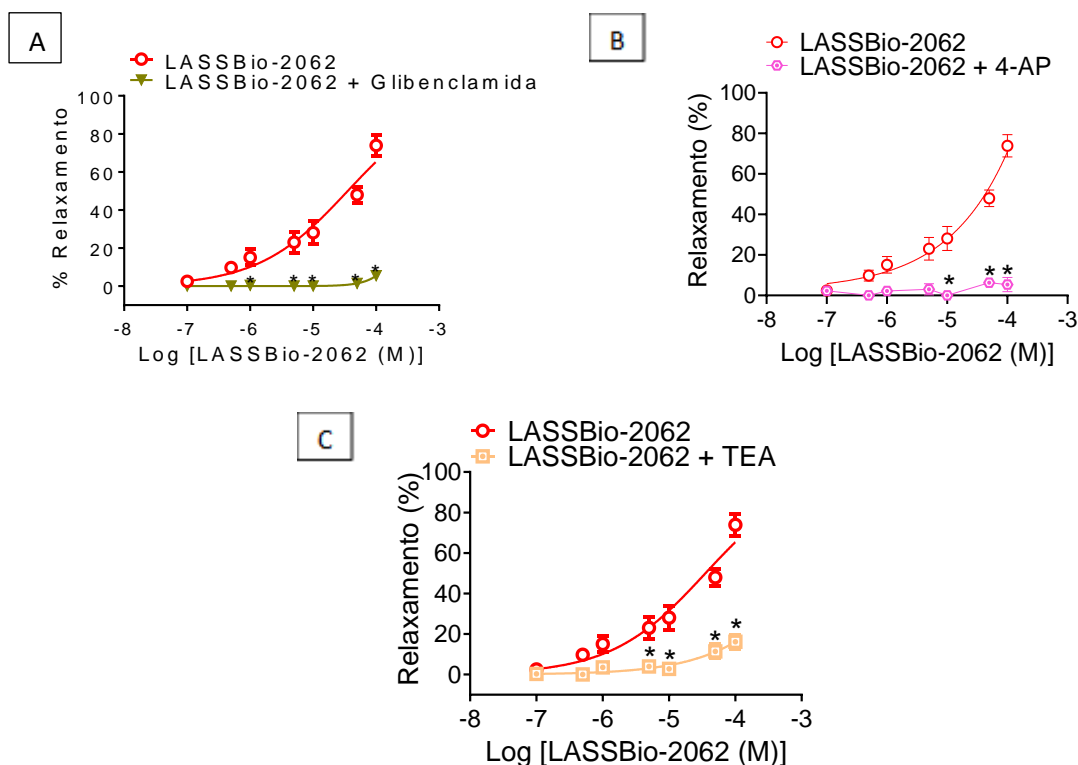


Figura 18. Curva de concentração-resposta da administração da substância em anéis de aorta sem endotélio ($n = 8$). E, em comparação, temos a curva de concentração-resposta da administração do mesmo composto em anéis de aorta sem endotélio pré-incubados (20 minutos antes) com glibenclamida ($10 \mu\text{M}$) (bloqueador de canal de potássio sensível a ATP – K_{ATP}) ($n = 7$) (A), com 4-aminopiridina (3mM) (bloqueador de canal de potássio voltagem-dependente – K_v) ($n = 4$) (B) e com cloreto de tetraetilamônio (3mM) (bloqueador de canal de potássio dependente de cálcio de alta condutância – BK_{Ca}) ($n = 4$) (C). Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. LASSBio-2062. Análise por *two-way* ANOVA seguido pelo *post-test* Tukey.

Pelo fato de a vasodilatação induzida pelo LASSBio-2062, apresentar o envolvimento da ativação de canais de K_{ATP} , investigou-se a participação de outros tipos de canais através da pré-incubação com 4-AP, um bloqueador de K_v ; ou com TEA, um bloqueador de BK_{Ca} (Figura 18B e 18C). Observou-se que ambos os bloqueadores dos canais de K impediram que LASSBio-2062 provocasse o efeito de relaxamento vascular.

5.2.3 Influência do influxo de cálcio na ação do LASSBio-2062

Numa etapa seguinte, foi avaliada a interferência da concentração de cálcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ para a ação do LASSBio-2062, e, portanto, anéis de aorta sem endotélio foram expostos a concentrações crescentes de $CaCl_2$ (10^{-6} – 10^{-3} M), na ausência ou presença de LASSBio-2062 (50 μ M) (Figura 19).

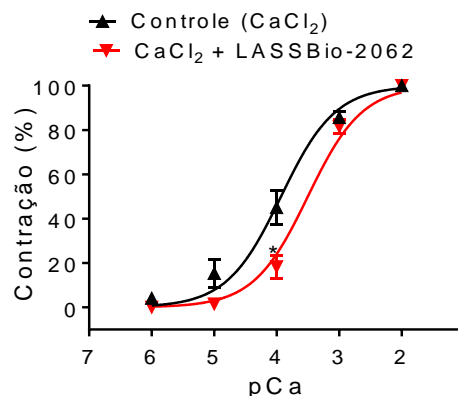


Figura 19. Curva de concentração-resposta da administração de $CaCl_2$ em anéis de aorta sem endotélio pré-incubados ($n=5$) ou não (20 minutos antes) com LASSBio-2062 (50 μ M) ($n=5$). Dados expressos como média \pm EPM. * $p<0,05$ vs controle ($CaCl_2$). Análise por *two-way* ANOVA seguido pelo *post-test* Tukey.

Note que ocorreu um leve deslocamento para a direita da curva de resposta contrátil vascular em função da concentração de cálcio, quando na presença de LASSBio-2062. No entanto, apenas na concentração de 100 μ M de $CaCl_2$, houve redução significativa da resposta contrátil induzida pelo cálcio. CE_{50} foi $0,16 \pm 0,05$ mM e $0,42 \pm 0,11$ mM ($p<0,05$), na ausência e na presença de LASSBio-2062, respectivamente.

5.3 Avaliação da ação do LASSBio-2062 no músculo cardíaco

Conforme observado na Figura 20, LASSBio-2062 não provocou nenhuma alteração na atividade contrátil do músculo papilar nas concentrações testadas, indicando ausência de efeito direto no coração.

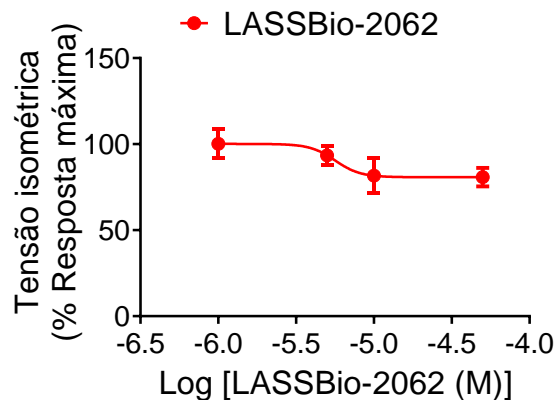


Figura 20. Curvas de concentração-resposta referentes ao efeito da substância LASSBio-2062 na contratilidade do músculo papilar (n= 4). Dados expressos como média \pm EPM. Análise por *two-way ANOVA* seguido pelo *post-test Tukey*.

5.4 Efeito anti-hipertensivo de LASSBio-2062

Inicialmente, os parâmetros hemodinâmicos como PAS, PAD, PAM e FC foram obtidos após a administração i.v. do derivado *N*-acilidrazônico LASSBio-2062 em ratos normotensos anestesiados.

LASSBio-2062 reduziu a PAS de $120,3 \pm 6,1$ para $100,9 \pm 4,6$ mmHg na dose de $10 \mu\text{mol.kg}^{-1}$; e reduziu a PAS de $110,3 \pm 11,9$ para $66,2 \pm 14,5$ mmHg ($p < 0,05$) com a administração de $30 \mu\text{mol.kg}^{-1}$. PAD, por sua vez, foi reduzida de $70,1 \pm 5,4$ e $67,1 \pm 9,0$ mmHg para $37,9 \pm 6,5$ ($p < 0,05$) e $29,9 \pm 9,4$ mmHg ($p < 0,05$) após injeção venosa de LASSBio-2062, 10 e $30 \mu\text{mol.kg}^{-1}$, o que levou a redução da PAM de $92,3 \pm 6,5$ e $85,8 \pm 11,4$ mmHg para $57,2 \pm 7,9$ ($p < 0,05$) e $42,9 \pm 9,8$ mmHg ($p < 0,05$), respectivamente (Figura 21). Ainda, a FC foi reduzida de $192,3 \pm 7,0$ e $179,7 \pm 6,8$ bpm para $118,1 \pm 33,0$ bpm ($p < 0,05$) e $86,7 \pm 31,1$ bpm ($p < 0,05$), nas mesmas doses de LASSBio-2062 em animais normotensos.

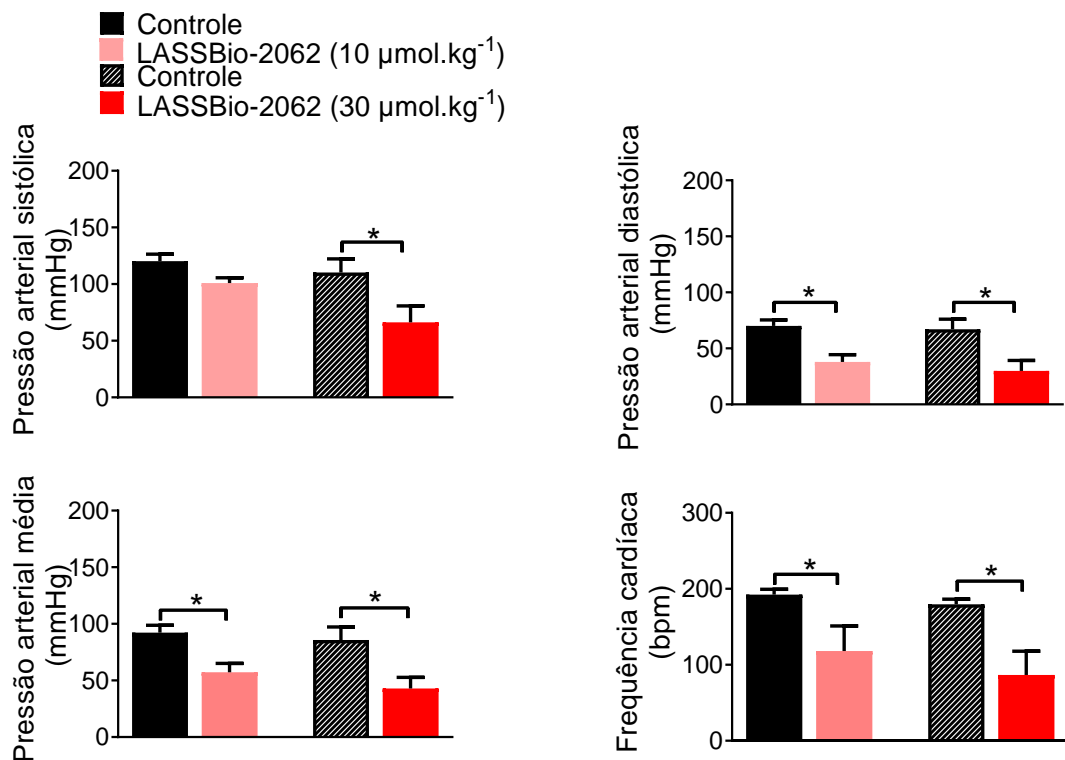


Figura 21. Parâmetros hemodinâmicos observados em animais normotensos antes e após administração intravenosa de LASSBio-2062. Pressão sistólica, diastólica e média e frequência cardíaca medidas nos grupos controle e LASSBio-2062 - 10 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ (n= 3) e 30 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ (n= 3). Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs grupo controle. Análise por teste *t* de Student.

Quando LASSBio-2062 foi administrado em SHR, a PAS reduziu de $155,1 \pm 10,1$ e de $151,1 \pm 10,0$ mmHg (grupo controle) para $110,6 \pm 8,0$ e $109,4 \pm 13,8$ mmHg nas doses de 10 e 30 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$, respectivamente (Figura 22). Quanto à PAD, o LASSBio-2062 reduziu de $111,0 \pm 9,1$ e $100,2 \pm 7,8$ mmHg (grupo controle) para $63,9 \pm 14,7$ (10 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$) e $54,0 \pm 10,4$ mmHg (30 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$). Note que a PAM reduziu de $132,0 \pm 9,2$ e $124,6 \pm 8,6$ mmHg (grupo controle) para $82,1 \pm 12,6$ ($p < 0,05$) e $72,0 \pm 12,3$ mmHg ($p < 0,05$) após injeção i.v. de 10 e 30 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ de LASSBio-2062 no SHR. A FC também foi alterada de $248,1 \pm 12,1$ e $228,4 \pm 11,3$ bpm (grupo controle) para $146,5 \pm 21,0$ ($p < 0,05$) e $109,8 \pm 21,4$ bpm ($p < 0,05$) com as doses de 10 e 30 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ (Figura 22).

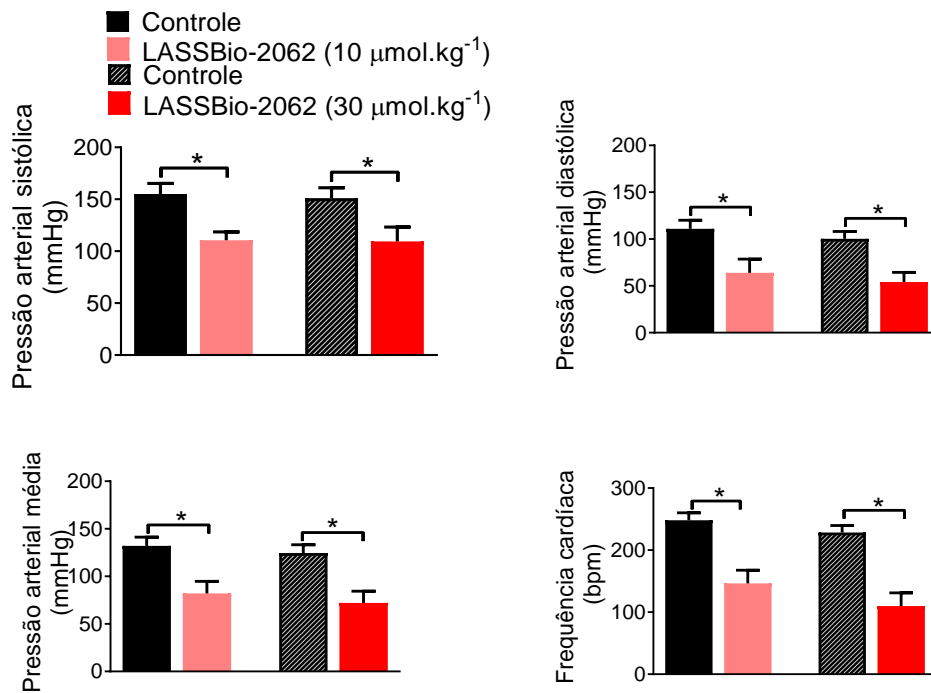


Figura 22. Parâmetros hemodinâmicos observados em SHR antes e após administração intravenosa de LASSBio-2062. Pressão sistólica, diastólica e média e frequência cardíaca medidas nos grupos controle e LASSBio-2062 - 10 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ (n= 5) e 30 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ (n= 4). Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs grupo controle. Análise por teste *t* de Student.

5.5 Investigação dos mecanismos envolvidos na ação vasodilatadora do composto LASSBio-2063.

5.5.1 Via dos receptores de adenosina

5.5.1.1 Via dos receptores de adenosina do subtipo A_{2A}

Resultados semelhantes aos do LASSBio-2062 foram observados com LASSBio-2063, devido ao fato de a ausência de alteração do efeito vasodilatador quando na presença de ZM-241385 (Figura 23). As curvas de concentração-resposta vascular se sobrepõem na ausência ou presença do antagonista de receptor de adenosina A_{2A} .

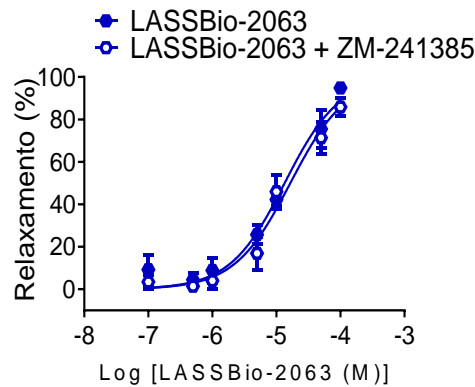


Figura 23. Curvas de concentração-resposta vascular do composto LASSBio-2063 em anéis de aorta com endotélio na ausência (n= 5) ou presença do ZM-241385 (0,1 μ M) (n= 5), um antagonista de receptor de adenosina A_{2A} . Dados expressos como média \pm EPM. Análise por *two-way* ANOVA seguido pelo *post-test* Tukey.

5.5.1.2 Via dos receptores de adenosina do subtipo A_3

Em contraste, nota-se um deslocamento significativo da curva de relaxamento induzido pelo LASSBio-2063 na presença deste inibidor do receptor de adenosina A_3 , MRE 3008F20 (Figura 24). CE_{50} foi $75,8 \pm 12,4 \mu$ M, valor maior em relação ao LASSBio-2063 isoladamente.

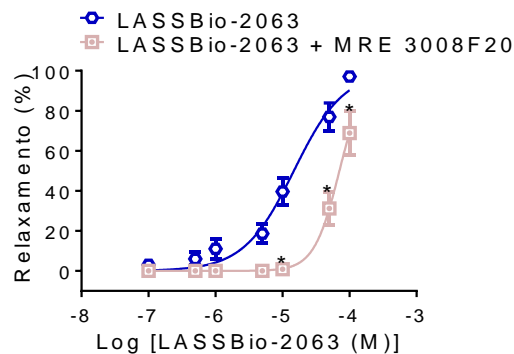


Figura 24. Curvas de concentração-resposta da administração da substância em anéis de aorta sem endotélio (n= 7). E, em comparação, temos a curva de concentração-resposta da administração do mesmo composto em anéis de aorta sem endotélio pré-incubados (20 minutos antes) com MRE 3008F20 (0,1 μ M) (antagonista de receptor de adenosina A_3) (n= 4). Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs LASSBio-2063. Análise por *two-way* ANOVA seguido pelo *post-test* Tukey.

5.5.2 Participação dos canais de potássio na ação vasodilatadora dos derivados LASSBio-2063

A curva concentração-resposta vascular do LASSBio-2063 na presença de glibenclamida apresentou CE_{50} de $18,2 \pm 4,2 \mu$ M, e relaxamento máximo de $95,7 \pm 2,7\%$ (Figura 25), não sendo diferente significativamente da resposta obtida com a substância isolada, indicando a não participação dos canais de K para sua ação.

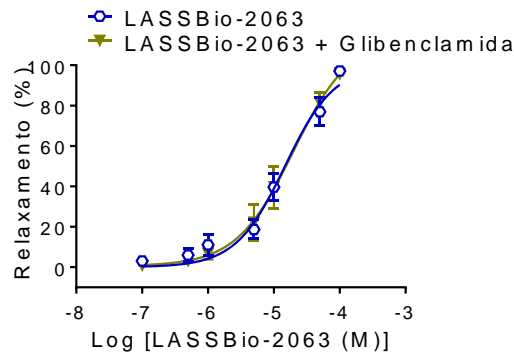


Figura 25. Curva de concentração-resposta da administração das substâncias em anéis de aorta sem endotélio (n= 7). E, em comparação, temos a curva de concentração-resposta da administração do mesmo composto em anéis de aorta sem endotélio pré-incubados (20 minutos antes) com glibenclamida (10 μ M) (bloqueador de canal de potássio sensível a ATP – K_{ATP}) (n= 8). Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs LASSBio-2063. Análise por *two-way ANOVA* seguido pelo *post-test Tukey*.

5.5.3 Influência do influxo de cálcio na ação do LASSBio-2063

A curva da reatividade vascular em função da concentração de cálcio foi deslocada para a direita na presença do LASSBio-2063. CE_{50} foi de $0,16 \pm 0,05$ mM e $0,86 \pm 0,17$ mM na ausência e presença de LASSBio-2063 ($p < 0,05$) (Figura 26).

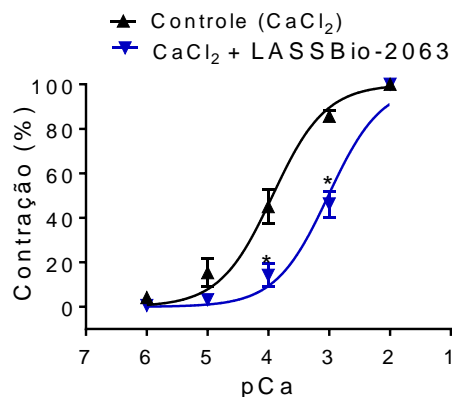


Figura 26. Curva de concentração-resposta da administração de $CaCl_2$ em anéis de aorta sem endotélio pré-incubados (n= 6) ou não (20 minutos antes) com LASSBio-2063 (50 μ M) (n= 5). Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs controle ($CaCl_2$). Análise por *two-way ANOVA* seguido pelo *post-test Tukey*.

5.6 Avaliação da ação do derivado LASSBio-2063 no músculo cardíaco

Ao realizar a exposição do músculo papilar a concentrações crescentes do LASSBio-2063, não ocorreu alteração da contratilidade (Figura 27), sugerindo ausência de efeito direto no coração.

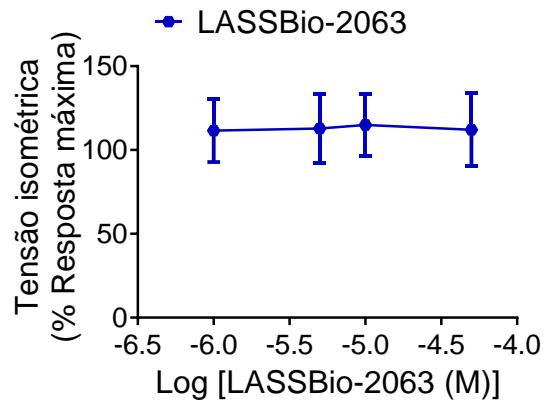


Figura 27. Curvas de concentração-resposta referentes ao efeito da substância LASSBio-2063 na contratilidade do músculo papilar (n= 4). Dados expressos como média \pm EPM. Análise por *two-way* ANOVA seguido pelo *post-test* Tukey.

5.7 Efeito anti-hipertensivo de LASSBio-2063

A administração i.v. de LASSBio-2063 ($10 \mu\text{mol.kg}^{-1}$) em ratos WKY (normotensos) promoveu a redução de forma significativa tanto da PAD e PAM. No entanto, não houve alteração na FC em ambas as doses testadas (Figura 28).

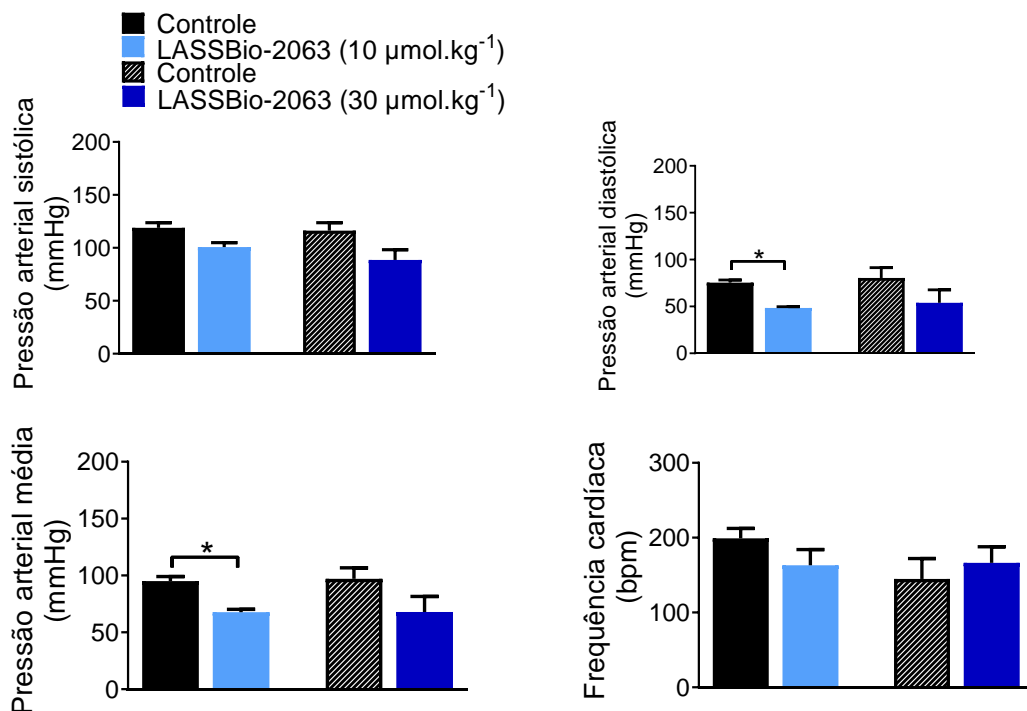


Figura 28. Parâmetros hemodinâmicos observados em animais normotensos antes e após administração intravenosa de LASSBio-2063. Pressão sistólica, diastólica e média e frequência cardíaca medidas nos grupos controle e LASSBio-2063 - $10 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ (n= 3) e $30 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ (n= 3). Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs grupo controle. Análise por teste *t* de Student.

A ação anti-hipertensiva de LASSBio-2063 foi confirmada quando foi administrado em SHR, apresentando redução da PAS de $152,1 \pm 4,9$ e $142,3 \pm 2,0$ mmHg (grupo controle) para $120,4 \pm 12,2$ mmHg ($p < 0,05$) e $124,3 \pm 5,4$ mmHg ($p < 0,05$), nas doses de $10 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ e $30 \mu\text{mol.kg}^{-1}$. PAD, foi reduzida de $108,1 \pm 4,7$ e $87,5 \pm 3,4$ mmHg (grupo controle) para $75,6 \pm 15,2$ mmHg e $61,2 \pm 4,8$ mmHg ($p < 0,05$), alterando a PAM de $129,7 \pm 4,5$ mmHg (grupo controle) para $96,0 \pm 14,6$ mmHg e $114,2 \pm 2,3$ para $87,4 \pm 7,5$ ($p < 0,05$) sem interferir com a FC (Figura 29).

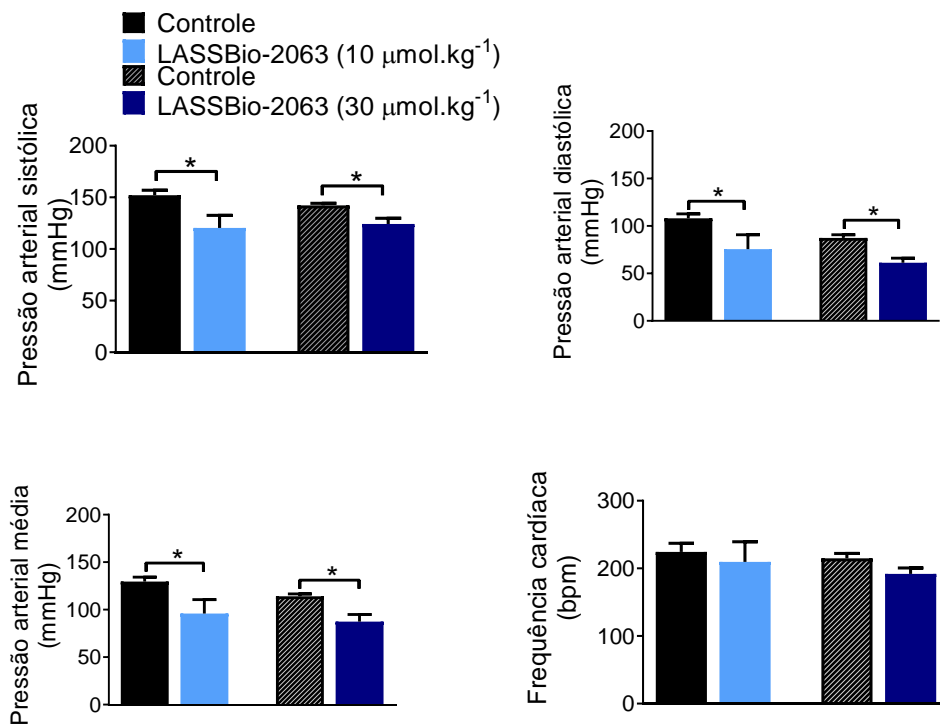


Figura 29. Parâmetros hemodinâmicos observados em SHR antes e após administração intravenosa de LASSBio-2063. Pressão sistólica, diastólica e média e frequência cardíaca medidas nos grupos controle e LASSBio-2063 - $10 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ ($n = 5$) e $30 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ ($n = 4$). Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs grupo controle. Análise por teste *t* de Student.

6 DISCUSSÃO

A similaridade nas propriedades químicas do enxofre e do selênio tem estimulado a síntese e pesquisa comparativa de uma grande variedade de selenomoléculas, derivadas de compostos que contenham enxofre. No entanto, existem diferenças nas propriedades físico-químicas entre substâncias que contêm enxofre ou selênio em suas estruturas, as quais constituem as bases para a promoção de efeitos biológicos específicos. Dentre as várias funções biológicas apresentadas pelo selênio, a ação antioxidante pode ser considerada a mais importante (MEOTTI; NOGUEIRA, 2003).

Este trabalho avaliou uma série de compostos *N*-acilidrazônicos quanto à possibilidade de identificar agentes anti-hipertensivos que poderiam, além de reduzir a pressão sanguínea, interferir com a condição de estresse oxidativo característico da hipertensão arterial.

Inicialmente, eficácia e potência da atividade na reatividade vascular dos novos derivados *N*-acilidrazônicos foram comparadas com o protótipo LASSBio-294. A substituição do anel tiofeno pelo selenofeno ocorrida para LASSBio-2062 promoveu o aumento da potência do efeito de relaxamento vascular dependente da integridade funcional do endotélio. A *N*-metilação, característica do LASSBio-2063, proporcionou o aumento da potência da ação vasodilatadora e a ausência de dependência da integridade do endotélio vascular, de forma semelhante ao observado para o LASSBio-785, que apresenta a *N*-metilação em sua estrutura, porém com átomo de enxofre (KÜMMERLE *et al.*, 2009). Portanto, a *N*-metilação parece estar envolvida com o aumento da potência, possivelmente, pelo fato de o grupo metila, ligado à ligação amida da *N*-acilidrazona, induzir alterações na conformação da estrutura molecular da substância, sendo importante para sua atividade vasodilatadora. Assim, a avaliação destes novos derivados reafirma que as modificações estruturais introduzidas pelo grupo metila são essenciais para que ocorra tanto o aumento da eficácia e potência vasodilatadora como alterações das vias envolvidas para efeito vascular (KÜMMERLE *et al.*, 2009).

A abertura do anel benzodioxola, acrescida com a substituição do átomo de enxofre pelo selênio, conferiu ao LASSBio-2075 a característica de produzir relaxamento vascular dependente da integridade endotelial, ao contrário do LASSBio-430, que apresenta em sua estrutura átomo de enxofre.

Dentre os derivados testados, somente o LASSBio-2084 não apresentou melhora na potência, se comparada ao LASSBio-294, indicando que a *para*-metoxilação reduziu tanto a potência como a eficácia da substância para o efeito de relaxamento vascular, características revertidas pela presença do átomo de selênio de LASSBio-2076, também *para*-metoxilado.

Derivados metoxilados na posição *meta* contendo átomo de enxofre (LASSBio-2092) ou selênio (LASSBio-2093) não apresentaram alteração significativa da potência, indicando que a metoxilação, independentemente da posição, faz com que o efeito seja parcialmente dependente do endotélio.

De forma resumida, a substituição do anel tiofeno pelo anel selenofeno proporcionou o aumento ou manutenção da potência das substâncias em relação ao relaxamento vascular. Com exceção do LASSBio-2063, que possui átomo de selênio e metilação no nitrogênio em sua estrutura, todos os derivados com anel selenofeno provocaram ação vasodilatadora mediada por ativação de receptores presentes no endotélio vascular. Isso indica que a *N*-metilação proporciona que o relaxamento vascular esteja diretamente relacionado à ação da substância no músculo liso vascular, assim como observado para o LASSBio-785, que é *N*-metilado, com átomo de enxofre (KÜMMERLE *et al.*, 2009). A ação direta no músculo liso vascular produzida pelas substâncias LASSBio-2063, LASSBio-430 e LASSBio-2092 pode ser vantajosa devido ao fato de ocorrer disfunção endotelial e remodelamento vascular na hipertensão arterial, o que poderia prejudicar a vasodilatação dependente do endotélio (BROWN *et al.*, 2018).

A Figura 30 apresenta a descrição das modificações estruturais e os respectivos principais resultados quanto às alterações de potência dos derivados *N*-acilidrazônicos avaliados neste trabalho.

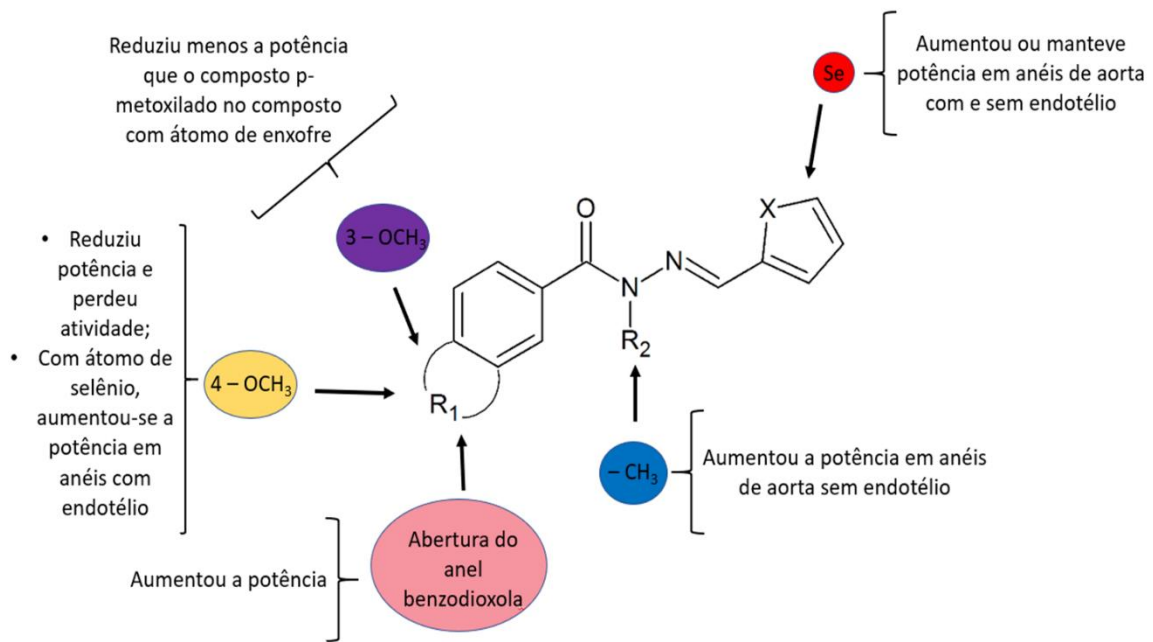


Figura 30. Relação das modificações estruturais e respectivos resultados relativos à reatividade vascular (Imagem elaboradora por Tadeu L. Montagnoli).

Os seguintes fatores foram utilizados para fundamentar a seleção de LASSBio-2062 e LASSBio-2063, a serem avaliados quanto ao potencial anti-hipertensivo: 1. Semelhança da estrutura química entre LASSBio-2062 e o protótipo LASSBio-294; diferenciando-se apenas pela substituição do anel de tiofeno pelo selenofeno; 2. LASSBio-2062 apresentou maior potência da atividade vasodilatadora com ação no endotélio e MLV; 3. LASSBio-2063, que apresenta a substituição do átomo de enxofre (presente na estrutura de LASSBio-294) pelo átomo de selênio, proporcionou aumento da potência da ação vasodilatadora independente da integridade endotelial, o que poderia ser benéfico para tratamento de pacientes hipertensos que já apresentem disfunção e/ou lesão do endotélio vascular; 4. A introdução do grupamento metila aumentou a potência do efeito de relaxamento vascular, possivelmente por maior seletividade aos biorreceptores, proteção ao metabolismo enzimático e lipofilicidade (BARREIRO *et al.*, 2011, BAZZINI; WERMUTH, 2008). Tanto LASSBio-2062 como LASSBio-2063 apresentaram potência cerca de 4 vezes maior que o protótipo LASSBio-294 (SILVA *et al.*, 2002) em promover relaxamento vascular.

Ação vasodilatadora, possivelmente em decorrência da ativação de receptores de adenosina do subtipo A_{2A}, localizados tanto na musculatura lisa vascular como no endotélio, foi previamente descrita para inúmeros derivados *N*-acilidrazônicos (SILVA *et al.*, 2002, da SILVA *et al.*, 2017, RAY; MARSHALL, 2006). Desta forma, foi

investigado, inicialmente, o envolvimento de receptores de adenosina A_{2A} para o relaxamento vascular induzido tanto pelo LASSBio-2062 como LASSBio-2063. A eficácia e potência de ambas as substâncias não foram alteradas na presença do antagonista de receptor de adenosina A_{2A}, pelo fato de se manter inalterada a relação concentração-relaxamento vascular, sugerindo a não participação de ativação destes receptores no tecido vascular.

Relaxamento vascular também pode ocorrer após ativação de receptores de adenosina do subtipo A₃ (FOZARD; HANNON, 1994), já que agonistas tais como N⁶-(3-iodobenzil)-adenosina-5'-N-metiluronamida (IB-MECA) e 2-cloro-N⁶-(3-iodobenzil)adenosina-5'-N-metilcarboxamida (CI-IB-MECA) produzem vasodilatação coronariana em coração de ratos (LASLEY *et al.*, 1999). Em modelos experimentais, foi demonstrado que a ação cardioprotetora provocada pelos agonistas do receptor de adenosina do subtipo A₃ foi abolida pela glibenclamida, um bloqueador de canais K_{ATP}, indicando que este receptor pode interferir com a ativação destes canais, resultando em sua abertura (ZUCCHI *et al.*, 2001, THOURANI *et al.*, 1999, TRACEY *et al.*, 1998) e consequente hiperpolarização celular. Receptores de adenosina também são encontrados em humanos; e o subtipo A₃AR está envolvido em várias funções citoprotetoras, enquanto sua ativação tem sido relacionada aos efeitos anti-inflamatório, anticancerígeno e cardioprotetor (CIANCETTA; JACOBSON, 2017).

A resposta relaxante vascular máxima e potência de LASSBio-2062 e LASSBio-2063 foram reduzidas na presença do antagonista do receptor de adenosina A₃, MRE 3008F20, indicando a participação da ativação destes receptores para a vasodilatação induzida por estes derivados. Em comparação aos agonistas seletivos de receptor A₃, namodenoson/CI-IB-MECA – tanto o LASSBio-2062 quanto o LASSBio-2063 demonstraram ser mais potentes, uma vez que o CI-IB-MECA induz relaxamento vascular em concentrações elevadas (100 µM) (HO *et al.*, 2016, TAWFIK *et al.*, 2005). O namodenoson apresenta efeitos anti-inflamatório, antifibrótico e antiesteatose, pois demonstrou resultado promissor em estudo de fase III para o tratamento de câncer de fígado e em estudo de fase II para o tratamento de esteato-hepatite não alcoólica. Possivelmente, o namodenoson atua por ativação de receptores de adenosina A₃, inibindo a produção de citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral α (TNF-α), interleucina (IL)-12, interferon-γ, IL-17 e IL-23 e regulando negativamente NF-κB (FISHMAN, 2022).

A ativação de receptores A_3 influencia a atividade dos canais de K^+ , especialmente os canais K_{ATP} , podendo induzir sua abertura (PROCOPIO *et al.*, 2021, LI *et al.*, 1995), o que resulta em hiperpolarização, com conseqüente bloqueio de canais de Ca^{2+} , e assim com o menor influxo de cálcio, levar a menor concentração de cálcio intracelular e resultando na vasodilatação (PROCOPIO *et al.*, 2021) (Figura 31).

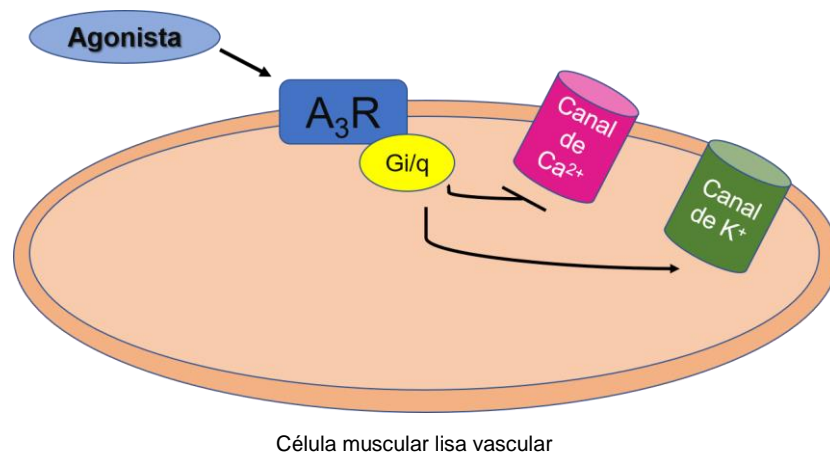


Figura 31. Ativação do receptor de adenosina do subtipo A_3 . A ativação deste receptor pode resultar no bloqueio de canais de cálcio e/ou na ativação e abertura de canais de potássio (Adaptado de PROCOPIO *et al.*, 2021).

Considerando-se estes fatores e em continuidade à investigação dos mecanismos envolvidos na ação vascular dos derivados *N*-acilindrazônicos LASSBio-2062 e LASSBio-2063, realizou-se inicialmente a pré-incubação dos anéis de aorta desprovidos de endotélio funcional com glibenclamida, bloqueador do canal de K_{ATP} . Estes canais são expressos no músculo liso vascular, cuja ativação leva à hiperpolarização da membrana da célula do músculo vascular, promovendo vasodilatação (BRAYDEN, 2002). Verificou-se que, na presença da glibenclamida, não ocorreu relaxamento vascular induzido pelo LASSBio-2062, o que não foi observado com LASSBio-2063, levando-se a inferir que LASSBio-2062, mas não LASSBio-2063 promoveu vasodilatação através da ativação e abertura de canais de K_{ATP} . Apesar de ser um vasodilatador que age independente da integridade endotelial, LASSBio-2063 manteve a potência e o relaxamento máximo na presença da glibenclamida, o que sugere o não envolvimento destes canais de K_{ATP} .

Assim, a ativação do receptor de adenosina A_3 promove a inibição da adenilato ciclase (AC) via proteína G_i e, em conseqüência, leva a redução da produção de

cAMP, que levaria à vasoconstricção, correspondendo a uma limitação da ativação deste subtipo de receptor. Tal receptor também está acoplado à proteína Gq, que ativa a proteína cinase C (PKC), que interage com os canais de cálcio no retículo sarcoplasmático e os canais K_{ATP} para promover a vasodilatação (HO *et al.*, 2016, JENNER; ROSE'MEYER, 2006, ZUCCHI *et al.*, 2001, TABRIZCHI; BEDI, 2001). Desse modo, a ativação de canais K_{ATP} pelo LASSBio-2062 poderia ocorrer diretamente neste canal ou como resultado da ativação do receptor de adenosina A_3 .

A ativação de canais de potássio pelo LASSBio-2062 não se restringe aos K_{ATP} , porque o efeito vasodilatador foi também inibido pelos antagonistas de canais de K_{Ca} e K_v . O fato de existirem de 1.000 a 10.000 canais K_{Ca} e K_v em células do músculo liso vascular (NELSON; QUAYKE, 1995, de SORDI, 2009) pode confirmar a importância da ativação destes canais como alvo farmacológico alternativo ao tratamento da hipertensão arterial. O maior efluxo de potássio, através de diferentes canais de K ativados pelo LASSBio-2062, resultaria na hiperpolarização das células musculares lisas, o que poderia levar ao fechamento de canais de cálcio e consequente redução da concentração de cálcio intracelular e vasodilatação. LASSBio-2062 provocou um pequeno deslocamento para a direita da curva de resposta contrátil vascular em função da concentração de cálcio. Este fato poderia estar relacionado tanto ao menor influxo de cálcio, em decorrência da ativação de receptores de adenosina A_3 , como também pelo bloqueio direto no canal de cálcio do tipo L.

Resultado semelhante foi observado com LASSBio-2063, que provocou redução da contração vascular em resposta as concentrações de cálcio, mas não interferiu com a ativação de canais de potássio, sugerindo que LASSBio-2063 atue diretamente no canal de cálcio tipo L cujo bloqueio poderia contribuir com a vasodilatação (Figura 32).

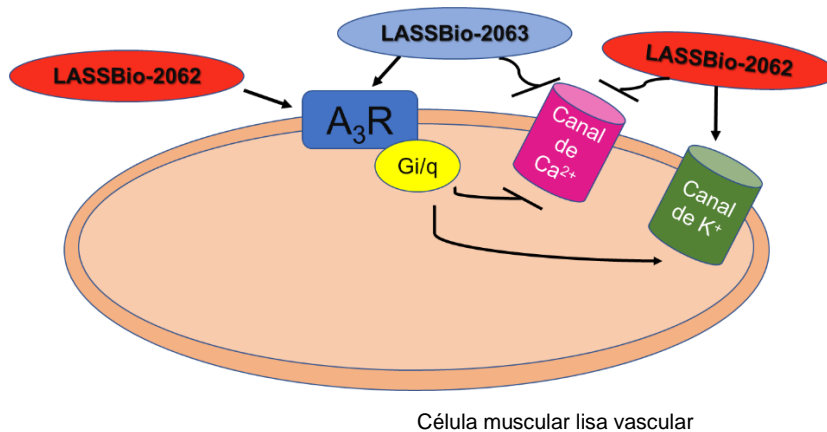


Figura 32. Esquema das vias envolvidas para ação vascular de LASSBio-2062 e LASSBio-2063.

LASSBio-2062 e LASSBio-2063 não proporcionaram alterações na contratilidade do músculo papilar, indicando que ambas as substâncias não promovem ação direta no coração, diferentemente do LASSBio-294, que apresentava efeito inotrópico positivo (SUDO *et al.*, 2001).

Alterações estruturais dos receptores de adenosina A₃ ou modificações nas diferentes etapas da via de sinalização poderiam ter relação com o desenvolvimento da hipertensão arterial essencial. Existe uma regulação negativa da expressão do receptor de adenosina A₃ em corações de animais hipertensos, que pode estar relacionada à atenuação de suas respostas vasodilatadoras em artérias coronárias (HO *et al.*, 2016). Assim, estes receptores foram descritos como potencial alvo farmacológico, através da interferência na sua atividade vasomotora pelo uso de agonistas do receptor de adenosina A₃. Pelo fato de os receptores de adenosina A₃ mediar a vasodilatação induzida pelo LASSBio-2062 e LASSBio-2063, foi investigado o possível efeito anti-hipertensivo através da administração venosa em SHR.

LASSBio-2062 e LASSBio-2063 reduziram a PAM em ambas as doses utilizadas, 10 e 30 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ (equivalentes a 3 e 10 mg.kg^{-1}) em SHR, demonstrando efeito anti-hipertensivo *in vivo*. A ação anti-hipertensiva destes agonistas de receptores de adenosina A₃ foi comparável a descrição de que a administração venosa de 10 mg.kg^{-1} de losartana normaliza a PA em ratos hipertensos (SIEGL *et al.*, 1995). Em contrapartida, a inibição dos efeitos da angiotensina I pelo inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), o enalapril, ocorre com 8,2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ i.v. em ratos (GROSS *et al.*, 1981). A administração intravenosa de hidralazina, um vasodilatador

direto (0,1 ou 0,25 mg.kg⁻¹) reduz a pressão arterial em ratos com hipertensão renal (CRISCIONE *et al.*, 1986).

A bradicardia observada após a administração venosa de LASSBio-2062 pode ser decorrente da redução de liberação de neurotransmissores adrenérgicos a nível central através da ativação de receptores de adenosina (ALVES *et al.*, 2000). Essa redução na frequência cardíaca poderia beneficiar pacientes que, além da pressão arterial elevada, apresentem taquicardia. Por outro lado, a ausência de alteração na FC após a administração de LASSBio-2063 poderia ser benéfica, se comparada às ações de agentes vasodilatadores disponíveis no mercado e utilizados na terapia anti-hipertensiva. Os vasodilatadores que atuam diretamente no músculo liso vascular provocam como principal efeito adverso a taquicardia reflexa (VII DBHA, 2016), apresentando como contraindicação o uso em monoterapia (III CONSENSO BRASILEIRO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 1998, DBHA 2021).

Em decorrência da ativação de canais de K_{ATP} induzida pelo LASSBio-2062, poderia se prever o surgimento de efeito colateral adverso, como a hiperglicemia, pelo fato de a ativação destes canais presentes nas células beta pancreáticas reduzir a liberação de insulina (de SORDI, 2009, SEINO; MIKI, 2003). No entanto, existe diferença entre as subunidades que compõem os canais de K_{ATP} nos diversos tecidos onde são expressos, que incluem pâncreas, cérebro, músculo cardíaco, liso e esquelético (RODRIGO; STANDEN, 2005). Portanto, o uso de LASSBio-2062 como agente anti-hipertensivo não levaria prejuízo aos pacientes diabéticos, porque os canais de K_{ATP} presente nos vasos ativados pelo LASSBio-2062 são diferentes daqueles localizados no pâncreas.

Finalmente, este trabalho demonstra que as *N*-acilidrazonas LASSBio-2062 e LASSBio-2063 podem representar alternativa terapêutica ao tratamento de hipertensão arterial, tendo como alvo farmacológico o receptor de adenosina A₃, com o benefício de se reduzir a necessidade da polifarmácia e aumentar a adesão dos pacientes. Isso porque, tanto LASSBio-2062 como LASSBio-2063, parecem atuar em múltiplos alvos, o que poderia facilitar o uso em esquema terapêutico de monoterapia. Em uma projeção futura, poderiam, até mesmo, ser combinados com outros princípios ativos, proporcionando uma interação medicamentosa benéfica, com o objetivo de reduzir a dose a ser administrada e em consequência minimizar o surgimento de efeitos adversos, assim como melhorar o controle de pacientes com diagnóstico de hipertensão arterial (PÓVOA *et al.*, 2014).

7 CONCLUSÃO

Com exceção da substância LASSBio-2084, os outros derivados *N*-acilidrazônicos avaliados demonstraram ação vasodilatadora mais potente que o protótipo LASSBio-294. A substituição do anel tiofeno pelo selenofeno promoveu, na maioria dos casos, aumento da potência dos derivados *N*-acilidrazônicos, indicando possível melhora na interação substância-alvo molecular, devido a uma provável restrição conformacional maior durante a tal interação, semelhante àquela decorrente da metilação (BARREIRO, 2021).

O relaxamento vascular induzido pelo LASSBio-2062 poderia ser decorrente da ativação de receptores de adenosina A_3 e da ativação direta/indireta dos canais de K. Entretanto, a ação vasodilatadora de LASSBio-2063 além de apresentar o envolvimento de receptores de adenosina A_3 , também poderiam bloquear canais de cálcio tipo L.

LASSBio-2062 e LASSBio-2063 apresentaram efeito anti-hipertensivo quando administrados por via intravenosa em SHR, com atuação em alvo farmacológico inovador, como o receptor de adenosina A_3 , para o tratamento da hipertensão arterial.

REFERÊNCIAS

ALVES, T.C.A.; BRAZ, J.R.C.; VIANNA, P.T.G. α_2 -agonistas em anestesiologia: aspectos clínicos e farmacológicos. **Ver. Bras. Anesthesiol.**, v. 50, n. 5, p. 396-404, set./out. 2000. Disponível em: <https://bjan-sba.org/article/5e498c3b0aec5119028b49df/pdf/rba-50-5-396.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2023.

BARREIRO, Eliezer Jesus. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1172-1180, dez. 2002. DOI: 10.1590/S0100-40422002000700018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/26352570_Estrategia_de_simplificacao_molecular_no_planejamento_racional_de_farmacos_A_descoberta_de_novo_agente_cardioativo. Acesso em: 08 abr. 2023.

BARREIRO, Eliezer Jesus. **12º Webinar INCT-INOVAR on-line**, 2021. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=GM6ZWzlbjg>. Acesso em: 04 jan. 2023.

BARREIRO, E.J.; KÜMMERLE, A.E.; FRAGA, C.A.M. The methylation effect in medicinal chemistry. **Chem. Rev.**, v. 111, n. 9, p. 5215-5246, set. 2011. DOI: 10.1021/cr200060g. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21631125/>. Acesso em: 03 mar. 2023.

BAZZINI, P.; WERMUTH, C. G. **In the practice of medicinal chemistry**. Academic Press: San Diego, 2008. p 431-463.

BRANDÃO, A.A.; NOGUEIRA, A.R. **Manual de hipertensão arterial**. Rio de Janeiro: SOCERJ, 2018. Disponível em: <https://socerj.org.br/wp-content/uploads/2022/09/Manual-de-Hipertensao-Arterial.-Editores-Andrea-Araujo-Brandao-Armando-da-Rocha-Noqueira.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2023.

BRAYDEN, Joseph E. Functional roles of K_{ATP} channels in vascular smooth muscle. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 29, n. 4, p. 312-316, abr. 2002. DOI: 10.1046/j.1440-1681.2002.03650.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11985542/>. Acesso em: 04 jan. 2023.

BROWN, I.A.M.; DIEDERICH, L.; GOOD, M.E.; DeLALIO, L.J.; MURPHY, S.A.; CORTESE-KROTT, M.M.; HALL, J.L.; LE, T.H.; ISAKSON, B.E. Vascular smooth muscle remodeling in conductive and resistance arteries in hypertension. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 38, n. 9, p. 1969-1985, set. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311229>. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/epub/10.1161/ATVBAHA.118.311229>. Acesso em: 02 mai. 2023.

CAREY, R.M.; MORAN, A.E.; WHELTON, P.K. Treatment of hypertension – a review. **JAMA**, v. 328, n. 18, p. 1849-1861, nov. 2022. DOI: 10.1001/jama.2022.19590. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36346411/>. Acesso em: 04 jan. 2023.

CIANCETTA, A.; JACOBSON, K.A. Structural probing and molecular modeling of the A₃ adenosine receptor: a focus on agonist binding. **Molecules**, v. 22, n. 3, 449, mar. 2017. DOI: 10.3390/molecules22030449. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/3/449>. Acesso em: 16 abr. 2023.

III CONSENSO BRASILEIRO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. Kohlmann Jr. *et al.* Consensos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 43, n. 4, ago. 1999. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-27301999000400004>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abem/a/DqgfTzHLDkR4ZxXTp5V6bKv/>. Acesso em: 12 jun. 2023.

COSTA, D.G.; da SILVA, J.S.; KÜMMERLE, A.E.; SUDO, R.T.; LANDGRAF, S.S.; CARUSO-NEVES, C.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.L.; ZAPATA-SUDO, G. LASSBio-294, a compound with inotropic and lusitropic activity, decreases cardiac remodeling and improves Ca²⁺ influx into sarcoplasmic reticulum after myocardial infarction. **Am. J. Hypertension**, v. 23, n. 11, p. 1220-1227, nov. 2010. DOI: 10.1038/ajh.2010.157. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20671720/>. Acesso em: 16 abr. 2023.

CRISCIONE, L.; EICHENBERGER, K.; HEDWALL, P.R.; SCHMID, K. Hydralazine and its metabolites: in vitro and in vivo activity in the rat. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 8, n. 2, p. 420-427, mar./abr. 1986. DOI: 10.1097/00005344-198603000-00028. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2422484/>. Acesso em: 24 mai. 2023.

DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL – 2020. Barroso *et al.* **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 116, n. 3, p. 516-658. 2021. DOI: 10.36660/abc.20201238. Disponível em: <http://departamentos.cardiol.br/sbc-dha/profissional/pdf/Diretriz-HAS-2020.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2023.

DPHIL, P.F.; SEAR, J.W. Hypertension: pathophysiology and treatment. **Critical Care & Pain**, v. 4, n. 3, p. 71-75, jun. 2004. DOI: 10.1093/bjaceaccp/mkh020. Disponível em: <https://academic.oup.com/bjaed/article/4/3/71/292146>. Acesso em: 04 jan. 2023.

FISHMAN, Pnina. Drugs targeting the A₃ adenosine receptor: human clinical study data. **Molecules**, v. 27, n. 12, 3680, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27123680>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/12/3680>. Acesso em: 16 abr. 2023.

FOZARD, J.R.; HANNON, J.P. BW-A522 blocks adenosine A₃ receptor-mediated hypotensive responses in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 252, n. 2, p. R5-6, fev.

1994. DOI: 10.1016/0014-2999(94)90604-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8157050/>. Acesso em: 01 mai. 2023.

GELDSETZER, P. *et al.* The state of hypertension care in 44 low-income and middle-income countries: a cross-sectional study of nationally representative individual-level data from 1.1 million adults. **Lancet**, v. 394, n. 10199, p. 652-662, ago. 2019. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)30955-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31327566/>. Acesso em: 16 abr. 2023.

GIERUS, Martin. Fontes orgânicas e inorgânicas de selênio na nutrição de vacas leiteiras: digestão, absorção, metabolismo e exigências. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1212-1220, jul./ago. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000400052>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/XXY7fB7sDk6gM9858dY75TM/?lang=pt>. Acesso em: 04 jan. 2023.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE (GBD) (2016). Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. **Lancet**, v. 390, n. 10100, p. 1151-1210, set. 2017. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32152-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28919116/>. Acesso em: 04 jan. 2023.

GOLAN, D.E.; TASHJIAN JR, A.H.; ARMSTRONG, E.J.; ARMSTRONG, A. W. **Princípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. Disponível em: <https://farmatecaunicatolica.files.wordpress.com/2017/12/a-base-fisiopatologica-da-farmacologia-golan-3c2aa-ed.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2023.

GROSS, D.M.; SWEET, C.S.; ULM, E.H.; BACKLUND, E.P.; MORRIS, A.A.; WEITZ, D.; BOHN, D.L.; WENGER, H.C.; VASSIL, T.C.; STONE, C.A. Effect of N-[(S)-1-carboxy-3-phenylpropyl]-L-Ala-L-Pro and its ethyl ester (MK-421) on angiotensin converting enzyme in vitro and angiotensin I pressor responses *in vivo*. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 216, n. 3, p. 552-557, mar. 1981. PMID: 6259322. Disponível em: <https://jpet.aspetjournals.org/content/216/3/552.long>. Acesso em: 16 abr. 2023.

HARRISON, D.G.; COFFMAN, T.M.; WILCOX, C.S. Pathophysiology of hypertension – the mosaic theory and beyond. **Circulation Research**, v. 128, n. 7, p. 847–863, abr. 2021. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318082. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33793328/>. Acesso em: 04 jan.2023.

HO, M-F.; LOW, L.M.; ROSE'MEYER, R.B. Pharmacology of the adenosine a3 receptor in the vasculature and essential hypertension. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0150021, fev. 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0150021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26907173/>. Acesso em: 05 mar. 2023.

JENNER, T.L.; ROSEMEYER, R.B. Adenosine A₃ receptor mediated coronary vasodilation in the rat heart: changes that occur with maturation. **Mech. Ageing Dev.**, v. 127, n. 3, p. 264-273, mar. 2006. DOI: 10.1016/j.mad.2005.10.005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16309733/>. Acesso em: 05 mar. 2023.

KANEL, W.B.; LARSON, M. Long term epidemiologic prediction of coronary disease. The Framingham Experience. **Cardiology**, v. 82, n. 2-3, p. 137-152, 1993. DOI: 10.1159/000175864. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8324776/>. Acesso em: 04 jan. 2023.

KÜMMERLE, A.E.; RAIMUNDO, J.M.; LEAL, C.M.; da SILVA, G.S.; BALLIANO, T.L.; PEREIRA, M.A.; de SIMONE, C.A.; SUDO, R.T.; ZAPATA-SUDO, G.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Studies towards the identification of putative bioactive conformation of potente vasodilator arylidene *N*-acylhydrazone derivatives. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 44, n. 10, p. 4004-4009, mai. 2009. DOI: 10.1016/j.ejmech.2009.04.044. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/19500884>. Acesso em: 04 jan. 2023.

LASLEY, R.D.; NARAYAN, P.; JAHANIA, M.S.; PARTIN, E.L.; KRAFT, K.R.; MENTZER JR, R.M. Species-dependent hemodynamic effects of adenosine A₃-receptor agonists IB-MECA and CI-IB-MECA. **Am. J. Physiol.**, v. 276, n. 6, p. H2076-2084, jun. 1999. DOI: 10.1152/ajpheart.1999.276.6.H2076. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10362690/>. Acesso em: 01 mai. 2023.

LEAL, Carla Moreira. **Avaliação farmacológica do derivado *N*-acilidrazônico LASSBio-1027 em modelos de hipertensão arterial sistêmica e hipertensão arterial pulmonar.** Rio de Janeiro, 2014. 89 f. Dissertação de mestrado. – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: https://farmacologia.icb.ufri.br/posgraduacao/Doc_Pat/Defesas/2014/M2014CarlaMoreiraLeal.pdf. Acesso em: 04 jan. 2023.

LEAL, C.M.; PEREIRA, S.L.; KÜMMERLE, A.E.; LEAL, D.M.; TESCH, R.; de SANT'ANNA, C.M.R.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; SUDO, R.T.; ZAPATA-SUDO, G. Antihypertensive profile of 2-thienyl-3,4-methylenedioxybenzoylhydrazone is mediated by activation of the A_{2A} adenosine receptor. **Eur. j. med. chem.**, v. 55, [s.n.], p. 49-57, set. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.06.056>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523412004084?via%3Dihub>. Acesso em: 16 abr. 2023.

LEONETTI, G.; EGAN, C.G. Use of carvedilol in hypertension: an update. **Vasc. Health Risk Manag.**, v. 8, [s.n.], p. 307-322, 2012. DOI: 10.2147/VHRM.S31578. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22661898/>. Acesso em: 16 abr. 2023.

LI, J.M.; FENTON, R.A.; CUTLER, B.S.; DOBSON JR, J.G. Adenosine enhances nitric oxide production by vascular endothelial cells. **Am. J. Physiol.**, v. 269, n. 2 (pt 1), p. C519–C523, ago. 1995. DOI: 10.1152/ajpcell.1995.269.2.C519. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7653535/>. Acesso em: 05 jan. 2023.

LIMA, L.M.; BARREIRO, E.J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23-49. 2005. DOI: 10.2174/0929867053363540. Disponível em: http://lassbio.icb.ufrj.br/download/cursos_semin/2015/bioisosterism2015.pdf. Acesso em: 04 jan. 2023.

MEOTTI, F.C.; NOGUEIRA, C.W. Ações biológicas de compostos de selênio e telúrio: efeitos tóxicos sobre o sistema nervoso central. **Ciência & Natura**, Santa Maria, v. 25, p. 163-187, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). DATASUS. **Mortalidade – Brasil**. 2021. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>. Acesso em: 05 de abr. 2023.

de MIRANDA, Amanda Silva. O efeito da metilação na Química Medicinal. **Rev. Virtual. Quim.**, v. 3, n. 3, p. 228-232, jul. 2011. DOI: 10.5935/1984-6835.20110028. Disponível em: <http://static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/v3n3a10.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2023.

NELSON, M.T.; QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am J Physiol.**, v. 268, n. 4 Pt 1, p. C799-822, abr. 1995. DOI: 10.1152/ajpcell.1995.268.4.C799. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7733230/>. Acesso em: 16 fev. 2023.

NISHAT, S.; KHAN, L.A.; ANSARI, Z.M.; BASIR, S.F. Adenosine A₃ receptor: a promising therapeutic target in cardiovascular disease. **Current Cardiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 18-26, 2016. DOI: 10.2174/1573403x12666160111125116. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26750723/>. Acesso em: 05 abr. 2023.

NOBRE, F.; COELHO, E.B.; LOPES, P.C.; GELEILETE, T.J.M. Hipertensão arterial sistêmica primária. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 46, n. 3, p. 256-72, set. 2013. DOI: <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v46i3p256-272>. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/69136>. Acesso em: 04 jan. 2023.

de OLIVEIRA, E.F.P.; de MELO NETO, A.Q.; RODRIGUES, M.T.P.; MASCARENHAS, M.D.M. Internamentos por hipertensão arterial e cobertura da Estratégia Saúde da Família: Brasil, 2010 a 2019. **Revista de Enfermagem Referência**, série 6, n. 1, e21085, 2022. DOI: <https://doi.org/10.12707/RV21085>. Disponível em: <https://revistas.rcaap.pt/referencia/article/view/27868>. Acesso em: 04 jan. 2023.

OPARIL, S.; ACELAJADO, M.C.; BAKRIS, G.L.; BERLOWITZ, D.R.; CÍFKOVÁ, R.; DOMINICZAK, A.F.; GRASSI, G.; JORDAN, J.; POULTER, N.R.; RODGERS, A.; WHELTON, P.K. Hypertension. **Nat. Rev. Dis. Primers.**, v. 4, n. 18014, mar. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.14>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrdp201814>. Acesso em: 04 jan. 2023.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Diretriz para o tratamento farmacológico da hipertensão arterial em adultos**. Brasília, DF: OPAS, 2022. DOI: <https://doi.org/10.37774/9789275726266>. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/56500>. Acesso em: 04 jan. 2023.

OUR WORD IN DATA. RITCHIE, H.; SPOONER, F.; ROSER, M. (IHME, Global Burden of Disease). **Causes of death**. 2018-2019. Disponível em: <https://ourworldindata.org/causes-of-death>. Acesso em: 13 jan. 2023.

PEREIRA, S.L.; KÜMMERLE, A.E.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; SUDO, R.T.; ZAPATA-SUDO, G. Vasodilator and antihypertensive effects of a novel *N*-acylhydrazone derivative mediated by the inhibition of L-type Ca²⁺ channels. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 29-41, fev. 2014. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2012.01076.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22958093/>. Acesso em: 04 jan. 2023.

PICON, R.V.; DIAS-DA-COSTA, J.S.; FUCHS, F.D.; OLINTO, M.T.A.; CHOUDHRY, N.K.; FUCHS, S.C. Hypertension management in brazil: usual practice in primary care. a meta-analysis. **Int. J. Hypertens.**, v. 2017, ID. 1274168, jul. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/1274168>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28751987/>. Acesso em: 16 abr. 2023.

PONTES, L.B.; ANTUNES, F.; SUDO, R.T.; RAIMUNDO, J.M.; LIMA, L.M.; BARREIRO, E.J.; ZAPATA-SUDO, G. Vasodilatory activity and antihypertensive profile mediated by inhibition of phosphodiesterase type 1 induced by a novel sulfonamide compound. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 26, n. 6, p. 690-700, dez. 2012. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2011.00999.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22066694/>. Acesso em: 04 jan. 2023.

PÓVOA, R. *et al.* I Posicionamento brasileiro sobre combinação de fármacos anti-hipertensivos. Artigo Especial. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 102, n. 3, p. 203-210, mar. 2014. DOI: <https://doi.org/10.5935/abc.20140023>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abc/a/f5vmjYGcVcqxxv5QNDLg8TqK/?lang=pt>. Acesso em: 10 fev. 2023.

PROCOPIO, M.C.; LAURO, R.; NASSO, C.; CARERJ, S.; SQUADRITO, F.; BITTO, A.; Di BELLA, G.; MICARI, A.; IRRERA, N.; COSTA, F. Role of adenosine and purinergic receptors in myocardial infarction: focus on different signal transduction pathways. **Biomedicines**, v. 9, n. 2, p. 204, 2021. DOI:

<https://doi.org/10.3390/biomedicines9020204>. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7922652/>. Acesso em: 04 jan. 2023.

RADICO, F.; CICCHITTI, V.; ZIMARINO, M.; De CATERINA, R. Angina pectoris and myocardial ischemia in the absence of obstructive coronary artery disease: practical considerations for diagnostic tests. **JACC: Cardiovascular Interventions**, v. 7, n. 5, p. 453-463, mai. 2014. DOI: 10.1016/j.jcin.2014.01.157. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24746648/>. Acesso em: 04 jan. 2023.

RADOVANOVIC, C.A.T.; dos SANTOS, L.A.; CARVALHO, M.D.B.; MARCON, S.S. Hipertensão arterial e outros fatores de risco associados às doenças cardiovasculares em adultos. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v. 22, n. 4, p. 547-553, jul./ago. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/0104-1169.3345.2450>. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/rlae/a/98MYtgmnbdSm5rR4pGMgcRk/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 04 jan. 2023.

RAY, C.J.; MARSHALL, J.M. The cellular mechanisms by which adenosine evokes release of nitric oxide from rat aortic endothelium. **J. Physiol.**, v. 570, (pt 1), p. 85–96. jan. 2006. DOI: 10.1113/jphysiol.2005.099390. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1464284/>. Acesso em: 04 jan. 2023.

RICHER, C.; BOISSIER, J-R.; GIUDICELLI, J-F. Chronic atenolol treatment and hypertension development in spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 393-400, fev. 1978. DOI:
[https://doi.org/10.1016/0014-2999\(78\)90119-X](https://doi.org/10.1016/0014-2999(78)90119-X). Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/001429997890119X>. Acesso em: 16 abr. 2023.

RODRIGO, G.C.; STANDEN, N.B. ATP-Sensitive potassium channels. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 15, p. 1915-1940, 2005. DOI:
10.2174/1381612054021015. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15974968/>. Acesso em: 27 fev. 2023.

SEINO, S.; MIKI, T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. **Prog Biophys Mol Biol.**, v. 81, n. 2, p.133-176, 2003.

SHETH, S.; BRITO, R.; MUKHERJEA, D.; RYBAK, L.P.; RAMKUMAR, V. Adenosine receptors: expression, function and regulation. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, n. 2, p. 2024-2052, jan. 2014. DOI: 10.3390/ijms15022024. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24477263/>. Acesso em: 04 jan. 2023.

SIEGL, P.K.; KIVLIGHN, S.D.; BROTON, T.P. Pharmacology of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, in animal models of hypertension. **J. Hypertens. Suppl.**, v. 13, n. 1, p. S15-21, jul. 1995. DOI: 10.1097/00004872-199507001-00002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18800451/>. Acesso em: 16 abr. 2023.

SILVA, A.G.; ZAPATA-SUDO, G.; KÜMMERLE, A.E.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; SUDO, R.T. Synthesis and vasodilatory activity of new *N*-acylhydrazone derivatives, designed as LASSBio-294 analogues. **Bioorg. Med. Chem.**, v.13, ed. 10, p. 3431-3437, mai. 2005. DOI: 10.1016/J.BMC.2005.03.003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15848755/>. Acesso em: 04 jan. 2023.

SILVA, C.L.M.; NOEL, F.; BARREIRO, E.J. Cyclic GMP-dependent vasodilatory properties of LASSBio-294 in rat aorta. **Br. J. Pharmacol.**, v. 135, n. 1, p. 293-298, jan. 2002. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704473. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1573130/>. Acesso em: 07 abr. 2023.

da SILVA, J.S.; GABRIEL-COSTA, D.; SUDO, R.T.; WANG, H.; GROBAN, L. FERRAZ, E.B.; NASCIMENTO, J.H.M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; ZAPATA-SUDO, G. Adenosine A_{2A} receptor agonist prevents cardiac remodeling and dysfunction in spontaneously hypertensive male rats after myocardial infarction. **Drug Des Devel Ther.**, v. 11, [s.n.], p. 553–562, 2017. DOI: 10.2147/DDDT.S113289. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5345997/>. Acesso em: 16 abr. 2023.

da SILVA, J.S.; PEREIRA, S.L.; MAIA, R.C.; LANDGRAF, S.S.; CARUSO-NEVES, C.; KÜMMERLE, A.E.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; Sudo, R.T.; ZAPATA-SUDO, G. *N*-acylhydrazone improves exercise intolerance in rats submitted to myocardial infarction by the recovery of calcium homeostasis in skeletal muscle. **Life Sciences**, v. 94, n. 1, p. 30-36, jan. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.11.012>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002432051300711X?via%3Dihub>. Acesso em: 16 abr. 2023.

da SILVA, S.S.B.E.; de OLIVEIRA, S.F.S.B.; PIERIN, A.M.G. The control of hypertension in men and women: a comparative analysis. **Rev. Esc. Enferm. USP**, v. 50, n. 1, p. 50-58, fev. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0080-623420160000100007>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/reeusp/a/VKhjcBcGHFYdghKYXHrGqkj/abstract/?lang=en>. Acesso em: 05 jan. 2023.

da SILVA, Tiago Fernandes. **Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de uma nova série de derivados cicloalquil-*N*-acilidrazonas: análogos de LASSBio-294**. Rio de Janeiro, 2012. 280 f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

de SORDI, Regina. **Participação de canais de potássio no desenvolvimento do processo inflamatório e nas alterações cardiovasculares que ocorrem durante a sepse/choque séptico**. Florianópolis, 2009, 74 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Farmacologia). Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009. Disponível em:

<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/93261/262370.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10 fev. 2023.

SUDO, R.T.; ZAPATA-SUDO, G.; BARREIRO, E.J. The new compound, LASSBio-294, increases the contractility of intact and saponin-skinned cardiac muscle from Wistar rats. Nature Publishing Group. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 3, p. 603-613, out. 2001. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704291. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11588115/>. Acesso em: 04 jan. 2023.

TABRIZCHI, R.; BEDI, S. Pharmacology of adenosine receptors in the vasculature. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 91, n. 2, p. 133 – 147, ago. 2001. DOI: 10.1016/s0163-7258(01)00152-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11728606/>. Acesso em: 05 mar. 2023.

TAWFIK, H.E.; SCHNERMANN, J.; OLDENBURG, P.J.; MUSTAFA, S.J. Role of A1 adenosine receptors in regulation of vascular tone. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 288, n. 3, p. H1411-6, mar. 2005. DOI: 10.1152/ajpheart.00684.2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15539423/>. Acesso em: 09 abr. 2023.

THOURANI, V.H.; NAKAMURA, M.; RONSON, R.S.; JORDAN, J.E.; ZHAO, Z.Q.; LEVY, J.H.; SZLAM, F.; GUYTON, R.A.; VINTEN-JOHANSEN, J. Adenosine A(3)-receptor stimulation attenuates postischemic dysfunction through K(ATP) channels. **Am. J. Physiol.**, v. 277, n. 1, p. H228-35, jul. 1999. DOI: 10.1152/ajpheart.1999.277.1.H228. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10409201/>. Acesso em: 02 mai. 2023.

TRACEY, W.R.; MAGEE, W.; MASAMUNE, H.; OLEYNEK, J.J.; HILL, R.J. Selective activation of adenosine A3 receptors with N6-(3-chlorobenzyl)-5'-N-methylcarboxamidoadenosine (CB-MECA) provides cardioprotection via KATP channel activation. **Cardiovasc. Res.**, v. 40, n. 1, p. 138-45, out. 1998. DOI: 10.1016/s0008-6363(98)00112-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9876326/>. Acesso em: 03 mai. 2023.

VII DIRETRIZ BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 107, n. 3, supl. 3, set. 2016. Disponível em: http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2016/05_HIPERTENSAO_ARTERIAL.pdf. Acesso em: 04 jan. 2023.

VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO. Sociedade Brasileira de Cardiologia/Sociedade Brasileira de Hipertensão/Sociedade Brasileira de Nefrologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, n. 95, supl.1, p. 1-51, 2010. Disponível em: http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2010/Diretriz_hipertensao_associados.pdf. Acesso em: 04 jan. 2023.

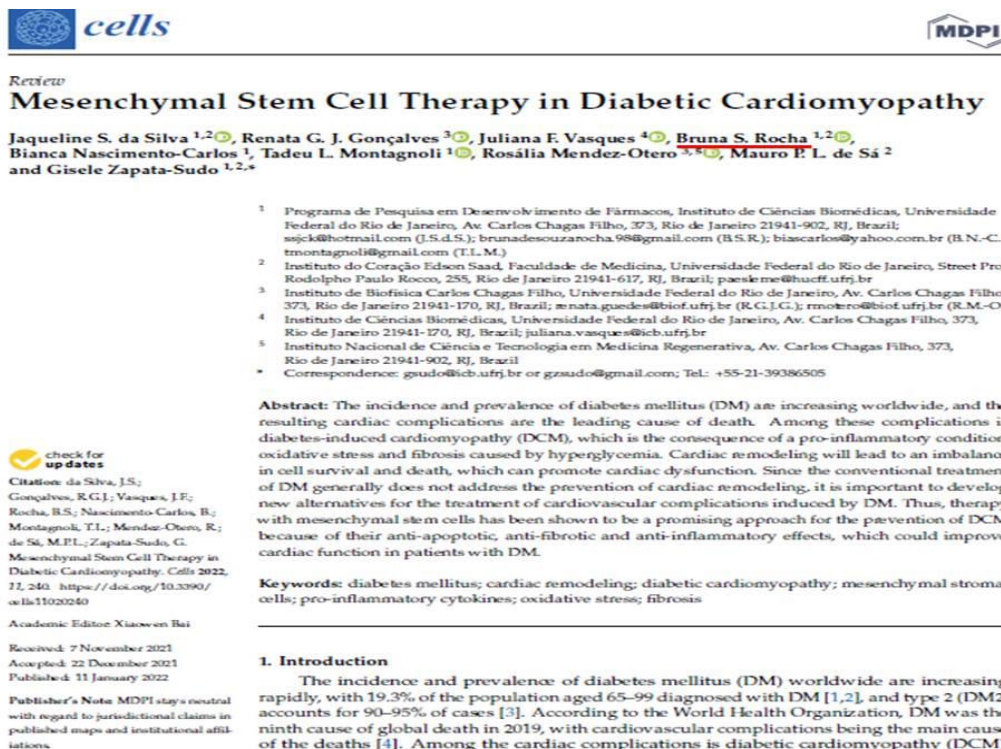
ZUCCHI, R.; YU, G.; GHELARDONI, S.; RONCA, F.; RONCA-TESTONI, S. A₃ adenosine receptor stimulation modulates sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in rat heart. **Cardiovasc. Res.**, v. 50, n. 1, p. 56-64, abr. 2001. DOI: 10.1016/s0008-6363(00)00318-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11282078/>. Acesso em: 05 mar. 2023.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado de participação em congressos



ANEXO B – Participação em publicação de artigo





Article

Novel p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor Reverses Hypoxia-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats

Grazielle Fernandes Silva ^{1,2}, Jaqueline Soares da Silva ^{1,2}, Allan Kardec Nogueira de Alencar ¹, Marina de Moraes Carvalho da Silva ^{1,3}, Tadeu Lima Montagnoli ^{1,3}, **Bruna de Souza Rocha** ^{1,2}, Rosana Helena Coimbra Nogueira de Freitas ¹, Roberto Takashi Sudo ^{1,5}, Carlos Alberto Manssour Fraga ^{1,3,*} and Gisele Zapata-Sudo ^{1,2,3,*}

- ¹ Programa de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, RJ, Brazil; graziellemed@gmail.com (G.F.S.); ssjck@hotmail.com (J.S.d.S.); allankdc@gmail.com (A.K.N.d.A.); marina-mcs@hotmail.com (M.d.M.C.d.S.); tmontagnoli@gmail.com (T.L.M.); brunadesouzarocha.98@gmail.com (B.d.S.R.); freitasrh@yahoo.com.br (R.H.C.N.d.F.); rtakashisudo@gmail.com or rsudo@icb.br (R.T.S.)
- ² Programa de Pós-Graduação em Cardiologia, Instituto do Coração Edson Saad, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-913, RJ, Brazil
- ³ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, RJ, Brazil
- * Correspondence: cmfraga@cesdecania.ufrj.br (C.A.M.F.); gzsudo@gmail.com or gsudo@icb.ufrj.br (G.Z.-S.); Tel./Fax: +55-21-39386478 (C.A.M.F.); +55-21-39386505 (G.Z.-S.)



Citation: Silva, G.F.; da Silva, J.S.; de Alencar, A.K.N.; de Moraes Carvalho da Silva, M.; Montagnoli, T.L.; de Souza Rocha, B.; de Freitas, R.H.C.N.; Sudo, R.T.; Fraga, C.A.M.; Zapata-Sudo, G. Novel p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor Reverses Hypoxia-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 900. <https://doi.org/10.3390/ph15070900>

Academic Editor: Gary J. Stephens

Received: 7 June 2022
Accepted: 16 July 2022
Published: 21 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Abstract: Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling is strongly implicated in cardiovascular remodeling in pulmonary hypertension (PH) and right ventricle (RV) failure. The effects of a newly designed p38 inhibitor, LASSBio-1824, were investigated in experimentally induced PH. Male Wistar rats were exposed to hypoxia and SU5416 (SuHx), and normoxic rats were used as controls. Oral treatment was performed for 14 days with either vehicle or LASSBio-1824 (50 mg/kg). Pulmonary vascular resistance and RV structure and function were assessed by echocardiography and catheterization. Histological, immunohistochemical and Western blot analysis of lung and RV were performed to investigate cardiovascular remodeling and inflammation. Treatment with LASSBio-1824 normalized vascular resistance by attenuating vessel muscularization and endothelial dysfunction. In the heart, treatment decreased RV systolic pressure, hypertrophy and collagen content, improving cardiac function. Protein content of TNF- α , iNOS, phosphorylated p38 and caspase-3 were reduced both in lung vessels and RV tissues after treatment and a reduced activation of transcription factor c-fos was found in cardiomyocytes of treated SuHx rats. Therefore, LASSBio-1824 represents a potential candidate for remodeling-targeted treatment of PH.

Keywords: pulmonary hypertension; right ventricle failure; MAPK inhibitor; SU5416/hypoxia; inflammation

1. Introduction



Review

Diabetes-Induced Cardiac Autonomic Neuropathy: Impact on Heart Function and Prognosis

Susumu Z. Sudo ¹, Tadeu L. Montagnoli ², **Bruna de S. Rocha** ^{2,3}, Aimeé D. Santos ^{4,5}, Mauro P. L. de Sá ⁵ and Gisele Zapata-Sudo ^{1,2,3,5,*}

- ¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina (Cirurgia Geral), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil
- ² Programa de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil
- ³ Programa de Pós-Graduação em Cardiologia, Instituto do Coração Edson Saad, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-913, Brazil
- ⁴ Faculdade de Enfermagem, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 22290-180, Brazil
- ⁵ Instituto do Coração Edson Saad, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-913, Brazil
- * Correspondence: gzsudo@icb.ufrj.br or gzsudo@gmail.com; Tel./Fax: +55-21-39386505

Abstract: Cardiovascular autonomic neuropathy (CAN) is a severe complication of the advance stage of diabetes. More than 50% of diabetic patients diagnosed with peripheral neuropathy will have CAN, with clinical manifestations including tachycardia, severe orthostatic hypotension, syncope, and physical exercise intolerance. Since the prevalence of diabetes is increasing, a concomitant increase in CAN is expected and will reduce quality of life and increase mortality. Autonomic dysfunction is associated with reduced baroreflex sensitivity and impairment of sympathetic and parasympathetic modulation. Various autonomic function tests are used to diagnose CAN, a condition without adequate treatment. It is important to consider the control of glucose level and blood pressure as key factors for preventing CAN progression. However, altered biomarkers of inflammatory and endothelial function, increased purinergic receptor expression, and exacerbated oxidative stress lead to possible targets for the treatment of CAN. The present review describes the molecular alterations seen in CAN, diagnosis, and possible alternative treatments.

Keywords: cardiac autonomic neuropathy; diabetes; oxidative stress; inflammation; endothelium dysfunction

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) has become one of the leading causes of premature death



Citation: Sudo, S.Z.; Montagnoli, T.L.; Rocha, B.S.; Santos, A.D.; de Sá, M.P.L.; Zapata-Sudo, G. Diabetes-Induced Cardiac Autonomic Neuropathy: Impact on Heart Function and Prognosis. *Biomedicines* **2022**, *10*, 3258. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10123258>

Academic Editors: Alfredo Caturano and Raffaele Galiero

Received: 17 November 2022
Accepted: 8 December 2022
Published: 15 December 2022