

# Efeito Anti-Hipertensivo de Novos Agonistas do Receptor de Adenosina em Ratos Espontaneamente Hipertensos

Original Article Antihypertensive Effect of New Agonist of Adenosine Receptor in Spontaneously Hypertensive Rats

Bruna de Souza Rocha,<sup>1</sup> Jaqueline Soares da Silva,<sup>1</sup> Júlia Galvez Bulhões Pedreira,<sup>1</sup> Tadeu Lima Montagnoli,<sup>1</sup> Eliezer Jesus Barreiro,<sup>1</sup> Gisele Zapata-Sudo<sup>1</sup>

Universidade Federal do Rio de Janeiro,<sup>1</sup> Rio de Janeiro, RJ – Brasil

## Resumo

**Fundamento:** A hipertensão arterial sistêmica é um fator de risco para disfunções cardíacas, renais e metabólicas. A busca por novas estratégias para prevenir e tratar doenças cardiovasculares levou à síntese de novas *N*-acilidrazonas para produzir efeito anti-hipertensivo. Os receptores de adenosina são um alvo alternativo para reduzir a pressão arterial devido à sua ação vasodilatadora e propriedades antioxidantes, que podem reduzir o estresse oxidativo característico da hipertensão arterial sistêmica.

**Objetivo:** Avaliar o perfil anti-hipertensivo de novos compostos contendo selênio desenvolvidos para melhorar sua interação com os receptores de adenosina.

**Métodos:** Foi avaliada a reatividade vascular, registrando-se a tensão isométrica da aorta torácica pré-contraída de ratos Wistar machos após exposição a concentrações crescentes de cada derivado (0,1 a 100  $\mu$ M). Para investigar o efeito anti-hipertensivo em ratos espontaneamente hipertensos, foram determinadas a pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média e a frequência cardíaca após administração intravenosa de 10 e 30  $\mu$ mol/kg do composto selecionado LASSBio-2062.

**Resultados:** Os compostos denominados LASSBio-2062, LASSBio-2063, LASSBio-2075, LASSBio-2076, LASSBio-2084, LASSBio-430, LASSBio-2092 e LASSBio-2093 promoveram vasodilatação com concentrações efetivas médias de  $15,5 \pm 6,5$ ;  $14,6 \pm 2,9$ ;  $18,7 \pm 9,6$ ;  $6,7 \pm 4,1$ ;  $> 100$ ;  $6,0 \pm 3,6$ ;  $37,8 \pm 11,8$ ; e  $15,9 \pm 5,7$   $\mu$ M, respectivamente. O LASSBio-2062 (30  $\mu$ mol/kg) reduziu a pressão arterial média em ratos espontaneamente hipertensos de  $124,6 \pm 8,6$  para  $72,0 \pm 12,3$  mmHg ( $p < 0,05$ ). A ativação do receptor de adenosina subtipo  $A_3$  e dos canais de potássio parece estar envolvida no efeito anti-hipertensivo do LASSBio-2062.

**Conclusões:** O novo agonista do receptor de adenosina e ativador dos canais de potássio é um potencial agente terapêutico para o tratamento da hipertensão arterial sistêmica.

**Palavras-chave:** Hipertensão; Vasodilatação; Canais de Cálcio; Receptores Purinérgicos P1.

## Abstract

**Background:** Systemic arterial hypertension is a risk factor for cardiac, renal, and metabolic dysfunction. The search for new strategies to prevent and treat cardiovascular diseases led to the synthesis of new *N*-acylhydrazones to produce antihypertensive effect. Adenosine receptors are an alternative target to reduce blood pressure because of their vasodilatory action and antioxidant properties, which may reduce oxidative stress characteristic of systemic arterial hypertension.

**Objective:** To evaluate the antihypertensive profile of novel selenium-containing compounds designed to improve their interaction with adenosine receptors.

**Methods:** Vascular reactivity was evaluated by recording the isometric tension of pre-contracted thoracic aorta of male Wistar rats after exposure to increasing concentrations of each derivative (0.1 to 100  $\mu$ M). To investigate the antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats, systolic, diastolic, and mean arterial pressure and heart rate were determined after intravenous administration of 10 and 30  $\mu$ mol/kg of the selected compound LASSBio-2062.

**Results:** Compounds named LASSBio-2062, LASSBio-2063, LASSBio-2075, LASSBio-2076, LASSBio-2084, LASSBio-430, LASSBio-2092, and LASSBio-2093 promoted vasodilation with mean effective concentrations of  $15.5 \pm 6.5$ ;  $14.6 \pm 2.9$ ;  $18.7 \pm 9.6$ ;  $6.7 \pm 4.1$ ;  $> 100$ ;  $6.0 \pm 3.6$ ;

**Correspondência:** Gisele Zapata-Sudo •

Universidade Federal do Rio de Janeiro – Av. Carlos Chagas Filho, 373. CEP 21941-901, Rio de Janeiro, RJ – Brasil

E-mail: gsudo@icb.ufrj.br, gzsudo@gmail.com

Artigo recebido em 20/06/2023, revisado em 17/10/2023, aceito em 14/11/2023

Editor responsável pela revisão: Marina Okoshi

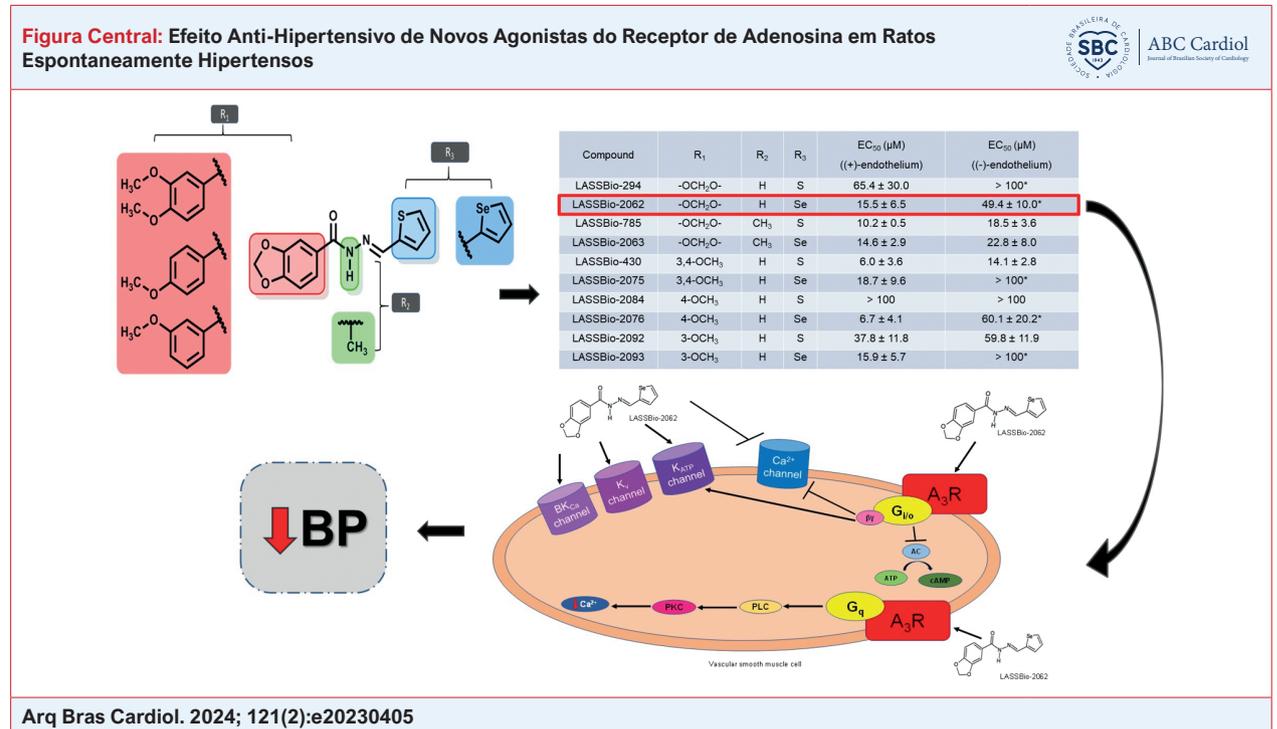
DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20230405>

37.8 ± 11.8; and 15.9 ± 5.7 μM, respectively. LASSBio-2062 (30 μmol/kg) reduced mean arterial pressure in spontaneously hypertensive rats from 124.6 ± 8.6 to 72.0 ± 12.3 mmHg (p < 0.05). Activation of adenosine receptor subtype A<sub>3</sub> and potassium channels seem to be involved in the antihypertensive effect of LASSBio-2062.

**Conclusions:** The new agonist of adenosine receptor and activator of potassium channels is a potential therapeutic agent to treat systemic arterial hypertension.

**Keywords:** Hypertension; Vasodilation; Calcium Channels; Purinergic P1 Receptors.

Full texts in English - <https://abccardiol.org/en/>



## Introdução

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde, a morte de aproximadamente 23,6 milhões de pessoas ocorrerá até 2030 em decorrência de doenças cardiovasculares.<sup>1</sup> Mesmo com a grande variedade de tratamentos existentes, a hipertensão arterial continua a ser a principal causa de morte cardíaca em todo o mundo, sendo responsável por 10,4 milhões de mortes por ano, com o maior número de indivíduos afetados pela hipertensão em países de baixa e média renda.<sup>2-5</sup>

Embora existam diversas terapias modernas para o tratamento da hipertensão, ela continua sendo a principal causa de doenças cardiovasculares, como cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral, agravadas pelo envelhecimento populacional.<sup>6-9</sup>

Devido ao caráter assintomático, a hipertensão arterial sistêmica pode evoluir com alterações estruturais e/ou funcionais em órgãos-alvo (coração, cérebro, rins e vasos).<sup>10</sup> É importante buscar novas estratégias para a prevenção e o tratamento da hipertensão; dessa maneira, foram projetadas novas N-aciclidrazonas, sintetizadas a partir da

3,4-metilenodioxibenzoil-2-tienilhidrazona (LASSBio-294) para testar a atividade vasodilatadora. O LASSBio-294, caracterizado como agente inotrópico cardíaco positivo com atividade vasodilatadora, preveniu a disfunção cardíaca induzida por infarto do miocárdio em ratos normotensos e hipertensos, possivelmente devido à ativação de receptores de adenosina A<sub>2A</sub>.<sup>11-16</sup> Para melhorar a interação entre a molécula e seu sítio de ação, os novos compostos possuem o átomo de enxofre (-S) em vez de selênio (-Se), o que confere uma conformação restrita, levando a uma melhor interação composto-receptor<sup>17</sup> e, conseqüentemente, aumentando a potência vasodilatadora. Algumas alterações na estrutura molecular poderiam gerar compostos com mecanismos de ação multialvos, favorecendo a adesão dos pacientes à terapia, uma vez que a polifarmácia é comum para o controle da hipertensão arterial na maioria dos pacientes.<sup>18</sup> A busca por novas terapias para hipertensão é uma tentativa de aumentar a adesão dos pacientes ao tratamento, pois este é um grande desafio para os cardiologistas, devido ao uso de múltiplos medicamentos e/ou administrações, alta incidência de efeitos adversos e doença primária não diagnosticada.<sup>19,20</sup>

O principal objetivo deste estudo foi identificar uma nova N-aciclidrazona, na qual a substituição do átomo de enxofre pelo selênio pudesse aumentar a atividade vasodilatadora e produzir um efeito anti-hipertensivo. Com base nos resultados, foi selecionado o LASSBio-2062, que foi um vasodilatador potente através da ativação dos receptores de adenosina  $A_3$  e dos canais K. O LASSBio-2062 poderia ser uma nova abordagem à monoterapia para hipertensão, uma vez que promoveu a normalização da pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

### Métodos

Os experimentos estavam de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio de Janeiro (017/19). Os animais incluídos neste estudo foram divididos aleatoriamente, com base no peso e/ou idade. Cinco ratos Wistar machos (220 a 250 g) ou quatro SHR machos (12 a 15 semanas e 220 a 250 g) foram utilizados para cada protocolo conduzido em experimentos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Os SHR foram tratados com injeção intravenosa de dose única de LASSBio-2062 e foram eutanasiados com administração intraperitoneal (IP) de tiopental (120 mg/kg) imediatamente após a medição da pressão arterial.<sup>21</sup> Todos os animais foram mantidos sob controle de temperatura e ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso a água e alimentos *ad libitum*.

### Compostos

Os derivados (Figura 1) foram sintetizados e fornecidos pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio<sup>®</sup>) da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O protótipo, 3,4-metilenodioxibenzoil-2-tienilhidrazona e seus análogos foram denominados LASSBio-294, LASSBio-2062, LASSBio-2063, LASSBio-430, LASSBio-2075, LASSBio-2084, LASSBio-2076, LASSBio-2092 e LASSBio-2093.

### Experimentos *in vitro*

#### Reatividade vascular

A aorta torácica de ratos Wistar machos foi removida e cortada em anéis de 2 a 3 mm, os quais foram posicionados em câmaras experimentais contendo 20 mL de solução de Tyrode modificada composta por (em mM): 123 NaCl; 4,7 KCl; 15,5 NaHCO<sub>3</sub>; 1,2 CaCl<sub>2</sub>; 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,2 MgCl<sub>2</sub>; e

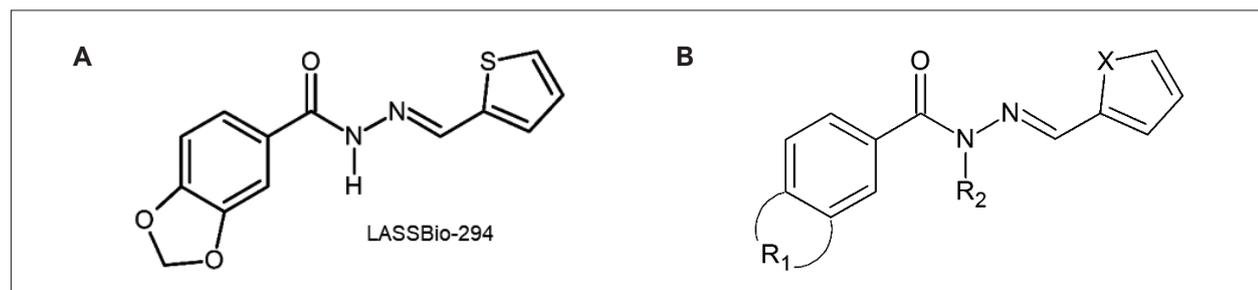
11,5 glicose. Foram oxigenados com mistura de carbogênio a 37 °C e pH 7,4. Após 2 horas de equilíbrio e sob 1 g de tensão inicial, os anéis aórticos foram inicialmente expostos a 10  $\mu$ M de fenilefrina para promover a contração máxima registrada por meio de um transdutor de força (MLT884, ADInstruments, Austrália), conectado a um sistema de aquisição (Powerlab, ADInstruments, Austrália), utilizando o programa Lab Chart (versão 7.0, ADInstruments, Austrália). Os anéis pré-contraídos foram expostos a 10  $\mu$ M de acetilcolina para promover relaxamento que, quando igual ou superior a 80%, determinou a presença de endotélio intacto. Em contrapartida, quando os anéis aórticos submetidos à remoção mecânica do endotélio produziram menos de 10% de relaxamento, houve falta de endotélio funcional. Concentrações crescentes (0,1 a 100  $\mu$ M) de todos os análogos (LASSBio-2062, LASSBio-2063, LASSBio-430, LASSBio-2075, LASSBio-2084, LASSBio-2076, LASSBio-2092, LASSBio-2093) foram adicionadas às câmaras contendo os anéis aórticos contraídos com fenilefrina para obter as curvas de concentração-resposta de relaxamento.<sup>22</sup>

Investigamos os mecanismos envolvidos no relaxamento vascular induzido pelo composto selecionado, LASSBio-2062, com pré-exposição de anéis aórticos com endotélio intacto a um antagonista do receptor de adenosina  $A_{2A}$ , ZM-241385 (0,1  $\mu$ M). Anéis aórticos sem endotélio foram pré-incubados com um dos seguintes: um antagonista do receptor de adenosina  $A_3$  (MRE 3008F20, 0,1  $\mu$ M); um antagonista dos canais de potássio sensível a ATP (glibenclamida, 10  $\mu$ M); um bloqueador do canal de potássio voltagem-dependente (4-aminopiridina, 3 mM); ou um bloqueador do canal de potássio cálcio-dependente de alta condutância (cloreto de tetraetilamônio, 3 mM).

### Experimentos *in vivo*

#### Medição da pressão arterial

Os SHR sob anestesia com cetamina (80 mg/kg, IP) e xilazina (15 mg/kg, IP) foram submetidos ao cateterismo, utilizando um cateter preenchido com solução salina e heparina, conectado a um transdutor de pressão (MLT884, ADInstruments, Austrália). Esse procedimento possibilitou o registro das pressões arteriais sistólica e diastólica e da frequência cardíaca durante a injeção intravenosa de LASSBio-2062 (10 e 30  $\mu$ mol/kg) pela veia jugular esquerda. Os parâmetros foram obtidos utilizando um sistema de



**Figura 1** – (A) Estrutura química do LASSBio-294. (B) Estrutura indicando os pontos de mudança na molécula que originou os seguintes análogos: X = S ou Se; R1 = -OCH<sub>2</sub>O- ou -3,4-OCH<sub>3</sub> ou -3-OCH<sub>3</sub> ou -4-OCH<sub>3</sub> e R2 = -H ou -CH<sub>3</sub>.

aquisição (Powerlab, ADInstruments, Austrália) e o software Lab Chart (versão 7.0, ADInstruments, Austrália).

### Análise estatística

Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Para cada substância testada, calculamos a concentração que causou metade do efeito máximo de relaxamento ( $EC_{50}$ ). Foi utilizada a análise ANOVA bidirecional seguida de pós-teste de Tukey para avaliar dados de experimentos *in vitro*. Foi realizada a análise pelo teste t de Student em dados de experimentos *in vivo*. A diferença entre os grupos experimentais foi considerada estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ . Foram considerados poder estatístico ( $\beta$ ) de 80% e taxa de falsos positivos ( $\alpha$ ) de 5%. Para identificar alterações com poder estatístico ( $\beta$ ) de 80% e taxa de falsos positivos ( $\alpha$ ) de 5%, foi necessário um número experimental de 5 animais para o protocolo *in vitro*. Dessa maneira, o teste estatístico diferencia as respostas com variação de pelo menos 15% e desvio padrão médio de 8,0%, em percentuais relativos à média do grupo controle. Quanto aos protocolos *in vivo*, o desvio padrão médio foi de 7,0% em relação ao grupo controle, com número experimental de 4 animais para cada grupo. Foi utilizado o software <http://powerandsamplesize.com/Calculators> para calcular o tamanho da amostra.

## Resultados

### Reatividade vascular em anéis aórticos com ou sem endotélio intacto

As N-acildrazonas foram avaliadas quanto ao potencial de produzir vasodilatação em comparação ao protótipo (LASSBio-294). Cada derivado foi testado em anéis aórticos com e sem endotélio intacto, que foram expostos a concentrações crescentes (0,1 a 100  $\mu$ M). A Tabela 1 inclui os valores de  $EC_{50}$  nos anéis aórticos. As curvas de concentração-relaxamento vascular para todos os análogos testados são exibidas na Figura 2. A remoção mecânica do endotélio aumentou a  $EC_{50}$  de 15,5  $\pm$  6,5 para 49,4  $\pm$  10,0  $\mu$ M para o LASSBio-2062, indicando que o seu efeito é parcialmente dependente da integridade funcional do endotélio vascular (Figura 2A). Os valores de  $EC_{50}$  para o LASSBio-2063 foram 14,6  $\pm$  2,9 e 22,8  $\pm$  8,0  $\mu$ M em anéis com e sem endotélio, respectivamente, sugerindo que não depende da integridade endotelial (Figura 2B).

O *design* e a síntese do LASSBio-430 basearam-se na abertura do anel 1,3-benzodioxol, cujos resultados indicam que essa alteração estrutural pode levar ao aumento da eficácia e da potência da vasodilatação, com relaxamento máximo independente do endotélio de 99,2%  $\pm$  0,8 % e  $EC_{50}$  de 6,0  $\pm$  3,6  $\mu$ M.

Em contrapartida, o LASSBio-2075, que possui presença adicional do anel selenofênico no lugar do anel tiofênico, possui  $EC_{50}$  de 18,7  $\pm$  9,6 e o relaxamento vascular é dependente da integridade do endotélio, porque o valor passou a ser  $> 100 \mu$ M quando o endotélio foi removido. O LASSBio-2084 não apresentou melhora na potência indicando que a metoxilação não interfere na reatividade vascular.

**Tabela 1 –  $EC_{50}$  de análogos para relaxamento vascular em anéis aórticos de ratos**

Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	X	$EC_{50}$ ( $\mu$ M) (com endotélio)	$EC_{50}$ ( $\mu$ M) (sem endotélio)
LASSBio-294	-OCH <sub>2</sub> O-	H	S	65,4 $\pm$ 30,0	$> 100^*$
LASSBio-2062	-OCH <sub>2</sub> O-	H	Se	15,5 $\pm$ 6,5	49,4 $\pm$ 10,0*
LASSBio-785	-OCH <sub>2</sub> O-	CH <sub>3</sub>	S	10,2 $\pm$ 0,5	18,5 $\pm$ 3,6
LASSBio-2063	-OCH <sub>2</sub> O-	CH <sub>3</sub>	Se	14,6 $\pm$ 2,9	22,8 $\pm$ 8,0
LASSBio-430	3,4-OCH <sub>3</sub>	H	S	6,0 $\pm$ 3,6	14,1 $\pm$ 2,8
LASSBio-2075	3,4-OCH <sub>3</sub>	H	Se	18,7 $\pm$ 9,6	$> 100^*$
LASSBio-2084	4-OCH <sub>3</sub>	H	S	$> 100$	$> 100$
LASSBio-2076	4-OCH <sub>3</sub>	H	Se	6,7 $\pm$ 4,1	60,1 $\pm$ 20,2*
LASSBio-2092	3-OCH <sub>3</sub>	H	S	37,8 $\pm$ 11,8	59,8 $\pm$ 11,9
LASSBio-2093	3-OCH <sub>3</sub>	H	Se	15,9 $\pm$ 5,7	$> 100^*$

\* $p < 0,05$ , em comparação com os dados com endotélio intacto usando análise ANOVA bidirecional.  $EC_{50}$ : concentração que produziu metade do efeito máximo; R<sub>1</sub>: radical 1; R<sub>2</sub>: radical 2.

Da mesma forma, o relaxamento vascular induzido pelo LASSBio-2093 foi dependente da integridade do endotélio, uma vez que a  $EC_{50}$  aumentou de 15,9  $\pm$  5,7 para  $> 100 \mu$ M.

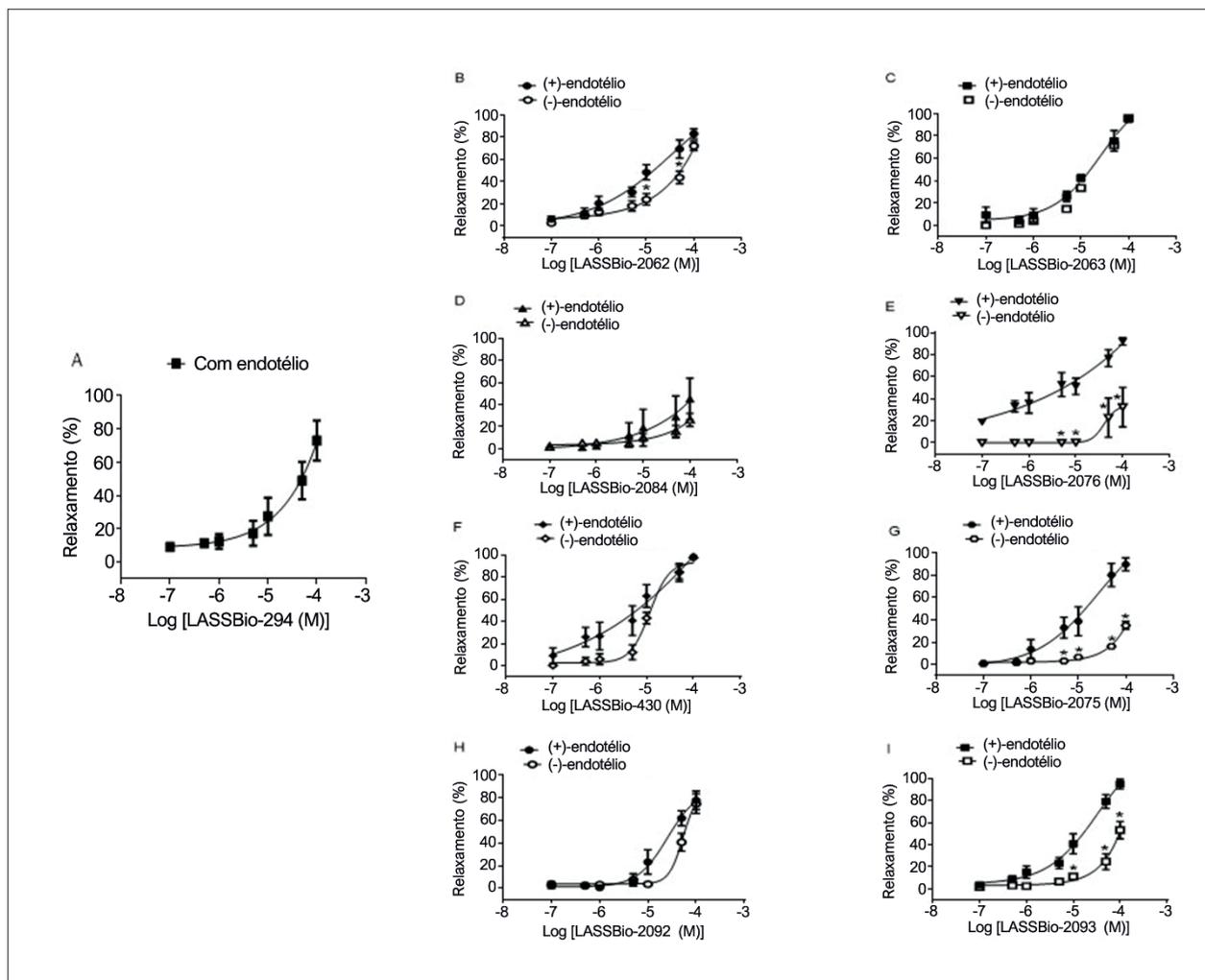
A dependência da integridade vascular para a ação vasodilatadora do LASSBio-2076 foi confirmada pelo aumento da  $EC_{50}$  de 6,7  $\pm$  4,1 para 60,1  $\pm$  20,2  $\mu$ M. Assim, a metoxilação somada à presença do anel selenofênico promoveu um aumento na potência do LASSBio-2076 em anéis aórticos com endotélio íntegro. O análogo LASSBio-2092 apresentou valores de  $EC_{50}$  de 37,8  $\pm$  11,8 e 59,8  $\pm$  11,9  $\mu$ M em anéis aórticos com e sem endotélio, respectivamente.

O LASSBio-2062 foi selecionado para investigação dos mecanismos envolvidos no relaxamento vascular, devido à grande semelhança estrutural com o composto original.

### Investigação dos mecanismos envolvidos na ação vasodilatadora do LASSBio-2062

#### Via do receptor de adenosina

Não houve alteração no relaxamento vascular promovido pelo LASSBio-2062 na presença de um antagonista do receptor de adenosina A<sub>2A</sub>, ZM-241385 (Figura 3A). Porém, quando os anéis aórticos foram pré-incubados com o antagonista do receptor de adenosina A<sub>3</sub>, MRE 3008F20, a curva de concentração-resposta apresentou desvio para a direita (Figura 3B). Além disso, o relaxamento máximo induzido pelo LASSBio-2062 alterou de 72,1%  $\pm$  4,0% para 23,6%  $\pm$  7,7% na presença do MRE 3008F20. Esses dados indicam que o composto promove vasodilatação pela ativação do receptor de adenosina tipo A<sub>3</sub>, mas não do receptor de adenosina tipo A<sub>2A</sub>.



**Figura 2** – Curvas de concentração-resposta vascular para (A) LASSBio-294; (B) LASSBio-2062; (C) LASSBio-2063; (D) LASSBio-2084; (E) LASSBio-2076; (F) LASSBio-430; (G) LASSBio-2075; (H) LASSBio-2092; e (I) LASSBio-2093 em anéis aórticos com ou sem endotélio funcional. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  comparado ao endotélio intacto. Análise por ANOVA bidirecional seguida de pós-teste de Tukey.

### Envolvimento de canais de potássio

Quando os anéis aórticos foram pré-incubados com glibenclâmida ( $10 \mu\text{M}$ ), que é um bloqueador do canal de potássio sensível a ATP, a resposta de concentrações crescentes de LASSBio-2062 foi alterada (Figura 4A). Quando na presença de 4-aminopiridina (Figura 4B) ou cloreto de tetraetilamônio (Figura 4C), a curva concentração-relaxamento do LASSBio-2062 se deslocou para a direita, indicando que a vasodilatação induzida pelo LASSBio-2062 pode ser consequente à ativação do canal de potássio sensível a ATP, do canal de potássio voltagem-dependente e do canal de potássio cálcio-dependente (Figura 4).

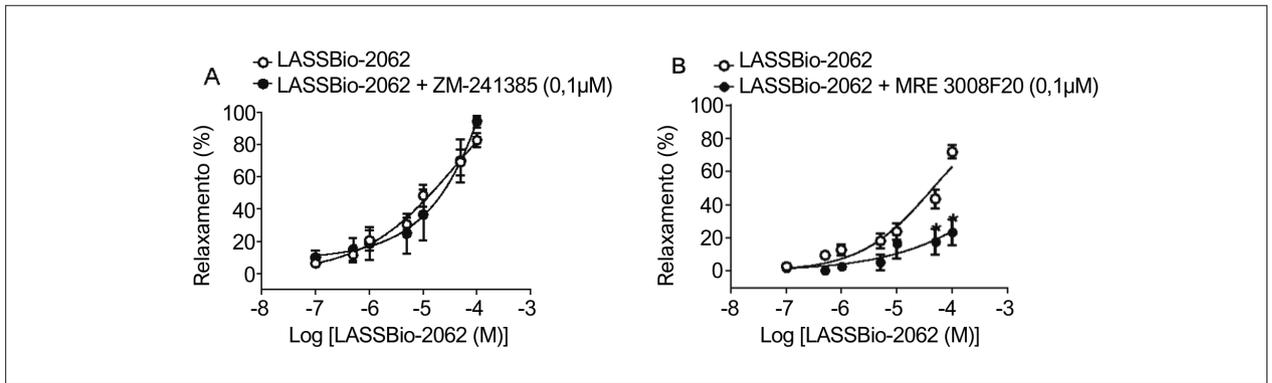
### Influência do influxo de cálcio na ação das N-acildrazonas

Para verificar se o LASSBio-2062 induzia vasodilatação através de uma interferência adicional na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , anéis aórticos sem endotélio foram expostos a concentrações crescentes de  $\text{CaCl}_2$  (1 a  $1000 \mu\text{M}$ ),

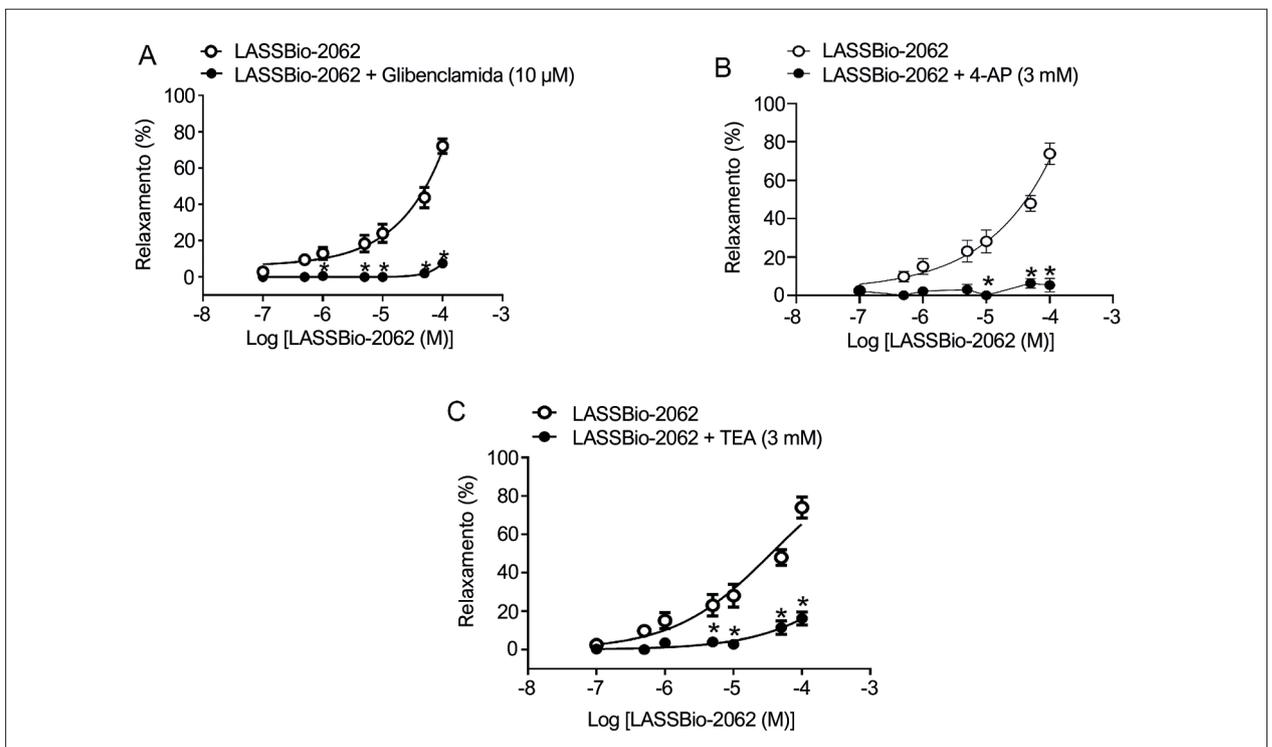
na ausência ou presença do análogo ( $50 \mu\text{M}$ ) (Figura 5). A curva concentração-resposta se deslocou para a direita com a exposição ao LASSBio-2062, com aumento da  $\text{EC}_{50}$  de  $157,6 \pm 51,3$  para  $420,0 \pm 11,0 \mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ).

### Efeito anti-hipertensivo do LASSBio-2062

Após administração intravenosa do LASSBio-2062, a pressão sistólica dos SHR reduziu de  $155,1 \pm 10,1$  para  $110,6 \pm 8,0$  e de  $151,1 \pm 10,0$  para  $109,4 \pm 13,8$  mmHg nas doses de 10 e  $30 \mu\text{mol/kg}$ , respectivamente. A pressão diastólica também foi reduzida com a administração de LASSBio-2062 de  $111,0 \pm 9,1$  para  $63,9 \pm 14,7$  ( $10 \mu\text{mol/kg}$ ) e de  $100,2 \pm 7,8$  para  $54,0 \pm 10,4$  mmHg ( $30 \mu\text{mol/kg}$ ). A pressão arterial média diminuiu 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 intravenosa de 10 e  $30 \mu\text{mol/kg}$  de LASSBio-2062 nos SHR. A frequência cardíaca alterou-se de  $248,1 \pm 12,1$  para  $146,5 \pm 21,0$  e de



**Figura 3** – Curvas concentração-relaxamento vascular do LASSBio-2062 em anéis aórticos com endotélio: (A) na ausência ou presença de ZM-241385 (0,1 μM), antagonista do receptor A<sub>2A</sub> da adenosina; e (B) na presença de MRE 3008F20 (0,1 μM), um antagonista do receptor A<sub>3</sub> de adenosina. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. \**p* < 0,05 comparado ao endotélio intacto. Análise por ANOVA dois fatores seguida de pós-teste de Tukey.



**Figura 4** – Curvas de concentração-relaxamento vascular do LASSBio-2062 em anéis aórticos sem endotélio na ausência ou presença de: (A) glibenclamida (10 μM), um bloqueador do canal de potássio sensível a ATP; (B) 4-aminopiridina (4-AP, 3 mM), um bloqueador do canal de potássio voltagem-dependente; e (C) cloreto de tetraetilamônio (TEA, 3 mM), um bloqueador do canal de potássio cálcio-dependente de alta condutância. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média. \**p* < 0,05 comparado ao controle. Análise por ANOVA bidirecional seguida de pós-teste de Tukey.

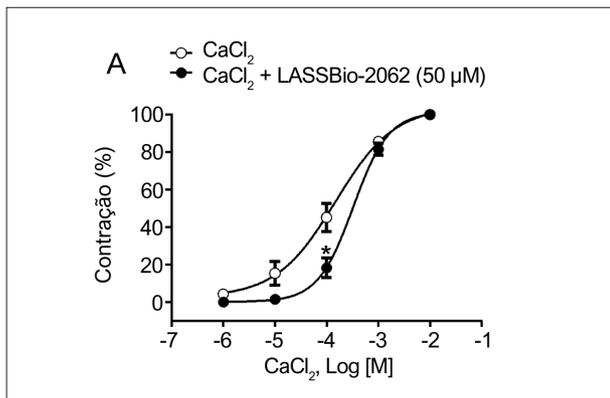
228,4 ± 11,3 para 109,8 ± 21,4 bpm com doses diferentes de LASSBio-2062 (Figura 6).

## Discussão

A semelhança nas propriedades químicas do enxofre e do selênio incentivou o *design*, a síntese e a avaliação comparativa de uma ampla variedade de moléculas contendo selênio. Porém, existem diferenças nas propriedades físico-químicas entre substâncias que contêm enxofre ou selênio

em suas estruturas, que constituem a base para a promoção de efeitos biológicos específicos. Entre as diversas funções biológicas promovidas pelo selênio, tem sido descrita a ação antioxidante.<sup>23</sup>

As novas N-acildrazonas testadas visaram identificar novos agentes anti-hipertensivos que pudessem, além de reduzir a pressão arterial, interferir no estresse oxidativo, que é uma condição comum na hipertensão arterial. A comparação entre os compostos demonstrou aumento da potência do relaxamento vascular independente do



**Figura 5** – Curvas de concentração-resposta de  $\text{CaCl}_2$  na ausência ou presença do LASSBio-2062 em anéis aórticos sem endotélio. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  comparado ao controle. Análise por ANOVA bidirecional seguida de pós-teste de Tukey.

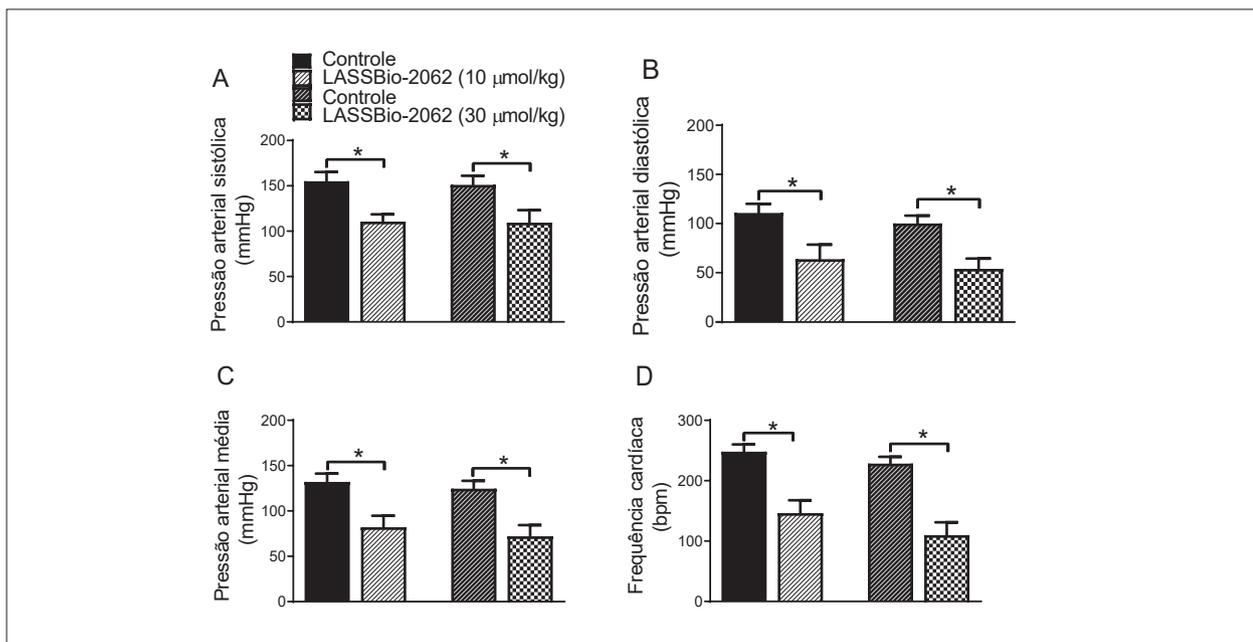
endotélio induzido pelo LASSBio-2062, que teve substituição do anel tiofênico pelo anel selenofênico. A N-metilação observada no LASSBio-2063 proporcionou não somente o aumento da potência da ação vasodilatadora, mas também a independência da integridade do endotélio vascular, semelhantemente ao observado para o LASSBio-785, que apresenta N-metilação em sua estrutura, mas com átomo de enxofre.<sup>24</sup> A N-metilação parece estar envolvida com o aumento da potência, possivelmente porque o grupo metil, ligado à ligação amida da N-acildirazona, é capaz de induzir alteração na conformação da estrutura molecular da substância. Assim, a avaliação desses novos derivados reafirma que as modificações estruturais introduzidas pelo grupo metil

são essenciais tanto para o aumento da eficácia e da potência vasodilatadora quanto para alterações nas vias envolvidas para o efeito vascular.<sup>24</sup> A abertura do anel benzodioxol, além da substituição do átomo de enxofre pelo selênio (LASSBio-2075) resultou em relaxamento vascular dependente da integridade endotelial, diferentemente do LASSBio-430, que possui um átomo de enxofre em sua estrutura.

Dentre todos os derivados testados, apenas o LASSBio-2084 não apresentou melhora na potência em comparação ao protótipo LASSBio-294, indicando que a para-metoxilação reduziu tanto a potência quanto a eficácia da substância para relaxamento vascular, características revertidas pela presença do átomo de selênio (LASSBio-2076). Os derivados metoxilados na meta-posição contendo átomo de enxofre (LASSBio-2092) ou selênio (LASSBio-2093) não apresentaram alteração significativa da potência.

A substituição do anel tiofênico pelo anel selenofênico proporcionou aumento ou manutenção da potência de relaxamento vascular, que foi mediada pela ativação de receptores presentes no endotélio vascular. Assim, a N-metilação proporciona relaxamento vascular diretamente relacionado à ação na musculatura lisa vascular, de forma semelhante ao LASSBio-785, que é N-metilado, com átomo de enxofre.<sup>24</sup> A ação direta na musculatura lisa vascular produzida pelo LASSBio-2063, LASSBio-430 e LASSBio-2092 pode ser vantajosa devido ao fato de que a disfunção endotelial e o remodelamento vascular que ocorrem na hipertensão arterial podem prejudicar a vasodilatação dependente do endotélio.<sup>25</sup>

As modificações estruturais e os respectivos resultados principais quanto às alterações de potência dos derivados N-acildirazônicos avaliados neste estudo estão resumidos na Figura 7.



**Figura 6** – Parâmetros hemodinâmicos observados em ratos espontaneamente hipertensos antes (controle) e após administração intravenosa de LASSBio-2062. (A) Pressão sistólica; (B) pressão diastólica; (C) pressão média; e (D) frequência cardíaca, medidas antes e após a administração de 10  $\mu\text{mol/kg}$  ( $n = 4$ ) e 30  $\mu\text{mol/kg}$  ( $n = 4$ ) de LASSBio-2062. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  versus controle. Análise pelo teste t de Student.

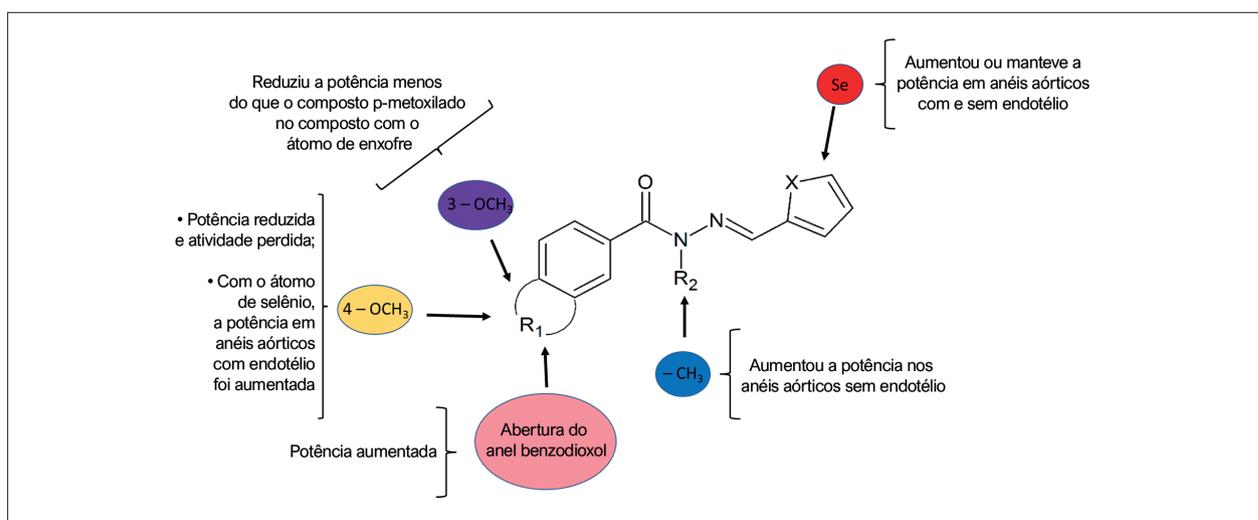


Figura 7 – Lista de modificações estruturais e respectivos resultados relacionados à reatividade vascular (Imagem criada por Tadeu L. Montagnoli).

Os mecanismos envolvidos na ação vasodilatadora e no efeito anti-hipertensivo induzidos pelo LASSBio-2062 foram investigados pelos seguintes motivos: (1) sua semelhança com a estrutura química do LASSBio-294 (protótipo) diferia apenas pela substituição do anel tiofênico pelo anel selenofênico; e (2) apresentou potência 4 vezes maior que o protótipo<sup>26</sup> em promover relaxamento vascular com ação no endotélio e na musculatura lisa vascular.

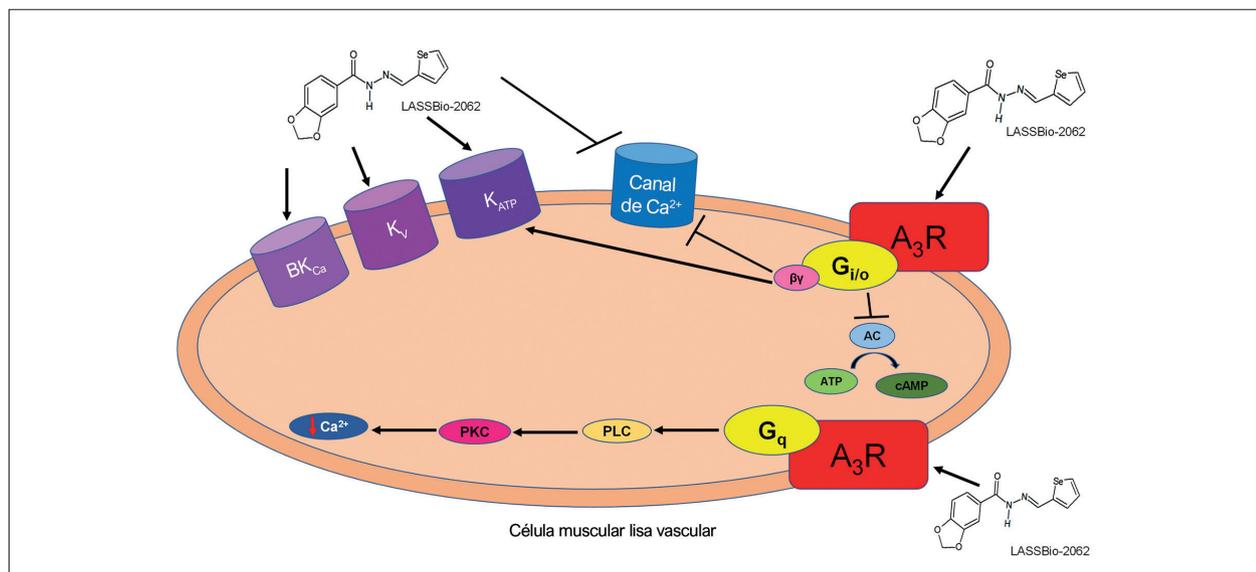
A ação vasodilatadora devido à ativação de receptores de adenosina subtipo A<sub>2A</sub>, localizados tanto na musculatura lisa vascular quanto no endotélio, já foi demonstrada anteriormente para muitos derivados N-acildrazônicos.<sup>16,26,27</sup> Assim, foi inicialmente investigado o envolvimento de receptores de adenosina A<sub>2A</sub> para relaxamento vascular induzido pelo LASSBio-2062. A eficácia e a potência não foram alteradas na presença de um antagonista do receptor de adenosina A<sub>2A</sub> devido ao fato de que a relação entre a concentração e o relaxamento vascular permaneceu inalterada, sugerindo a não participação da ativação desses receptores no tecido vascular (Figura 3A).

Visto que a ativação dos receptores de adenosina A<sub>3</sub> também desempenha um papel importante no processo de relaxamento vascular,<sup>28</sup> a ação do LASSBio-2062 foi avaliada na presença do antagonista MRE 3008F20. A potência e a resposta máxima de relaxamento vascular foram reduzidas na presença do antagonista do receptor de adenosina A<sub>3</sub>, indicando a participação da ativação desses receptores na vasodilatação induzida por esses derivados (Figura 3B). Nas artérias coronárias de ratos, a ativação de receptores de adenosina do subtipo A<sub>3</sub> pelos agonistas N<sub>6</sub>-(3-iodobenzil)-adenosina-5'-N-metiluronamida (IB-MECA) e 2-cloro-N<sub>6</sub>-(3-iodobenzil)-adenosina-5'-N-metilcarboxamida (Cl-IB-MECA) produz vasodilatação coronária.<sup>30</sup>

A cardioproteção ocorre com a ativação dos receptores de adenosina A<sub>3</sub>, que é abolida pela glibenclamida, um bloqueador do canal de potássio sensível a ATP, indicando que esse receptor pode interferir na ativação desses canais, resultando na sua abertura<sup>31-33</sup> e hiperpolarização celular.

Não foi observado relaxamento vascular induzido pelo LASSBio-2062 após pré-incubação com glibenclamida em anéis aórticos sem endotélio funcional (Figura 4A). A ativação de canais de potássio sensíveis a ATP expressos na musculatura lisa vascular leva à hiperpolarização da membrana celular do músculo vascular, promovendo vasodilatação.<sup>34</sup> A ativação dos receptores de adenosina A<sub>3</sub> influencia a atividade dos canais de K<sup>+</sup>, especialmente dos canais de potássio sensíveis a ATP, podendo induzir sua abertura,<sup>35,36</sup> o que resulta em hiperpolarização e consequente bloqueio dos canais de Ca<sup>2+</sup>. A redução do influxo de cálcio leva à menor concentração intracelular de cálcio e resulta em vasodilatação<sup>34</sup> (Figura 8).

Dessa maneira, a ativação do receptor de adenosina A<sub>3</sub> promove a inibição da adenilato ciclase via proteína Gi e, consequentemente, leva à redução da produção de adenosina monofosfato cíclico. O receptor de adenosina A<sub>3</sub> também está acoplado à proteína Gq, que ativa a proteína quinase C, que interage com canais de cálcio no retículo sarcoplasmático e canais de potássio sensíveis a ATP para promover vasodilatação.<sup>28,31,37,38</sup> Além disso, através da ativação de proteínas Gi/o, via subunidades Gβγ, resulta na ativação de canais de potássio sensíveis a ATP e na redução da entrada de cálcio no ambiente intracelular.<sup>39</sup> A ativação de canais de potássio sensíveis a ATP pelo LASSBio-2062 pode ocorrer diretamente neste canal e/ou através da ativação do receptor de adenosina A<sub>3</sub>. A ativação dos canais de potássio pelo LASSBio-2062 não se restringe ao canal de potássio sensível a ATP, uma vez que a vasodilatação foi inibida pela exposição aos antagonistas dos canais de potássio voltagem-dependentes e cálcio-dependentes (Figura 4B e 4C, respectivamente).<sup>40,41</sup> A ativação desses canais pode ser um alvo farmacológico alternativo ao tratamento da hipertensão arterial. O maior efluxo de potássio, através de diferentes canais de potássio ativados pelo LASSBio-2062, resultaria em hiperpolarização das células musculares lisas, o que poderia levar ao fechamento dos canais de cálcio e à consequente redução da concentração intracelular de cálcio e vasodilatação. De acordo com os resultados obtidos,



**Figura 8** – Possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos do LASSBio-2062. A ativação do receptor de adenosina A<sub>3</sub> pelo LASSBio-2062 pode promover a inibição da AC através da proteína Gi e, conseqüentemente, levar à redução na produção da AMPc. A subunidade Gβγ pode promover a ativação da PLC, bem como a ativação dos canais de K<sup>+</sup> e o bloqueio dos canais de Ca<sup>2+</sup>. O receptor de adenosina também está acoplado à proteína Gq, que ativa a PKC e a PLC para promover a vasodilatação. A ativação dos canais K<sub>ATP</sub> e o bloqueio dos canais de Ca<sup>2+</sup> tipo L pelo LASSBio-2062 podem ocorrer diretamente neste canal ou como resultado da ativação do receptor de adenosina A<sub>3</sub>. A ativação dos canais de potássio pelo LASSBio-2062 não se restringe ao K<sub>ATP</sub>, pois os antagonistas dos canais K<sub>Ca</sub> e K<sub>v</sub> reduziram a vasodilatação. A<sub>3</sub>R: receptor de adenosina subtipo A<sub>3</sub>; AC: adenilato ciclase; AMPc: adenosina monofosfato cíclico; ATP: trifosfato de adenosina; βγ: subunidade βγ; BK<sub>Ca</sub>: canal de potássio cálcio-dependente de alta condutância; Gi/o: proteína Gi/o; Gq: proteína Gq; K: canal de potássio sensível a ATP; K<sub>v</sub>: canal de potássio voltagem-dependente; PKC: proteína quinase C; PLC: fosfolipase C.

o LASSBio-2062 pode promover vasodilatação ativando o receptor de adenosina A<sub>3</sub> e os canais de K<sup>+</sup> e bloqueando diretamente os canais de Ca<sup>2+</sup>, conforme indicado na Figura 8.

Alterações estruturais dos receptores de adenosina A<sub>3</sub> ou alterações nos diferentes estágios da via de sinalização interferem no desenvolvimento da hipertensão arterial essencial. Os receptores de adenosina A<sub>3</sub> encontrados em humanos estão envolvidos em várias funções citoprotetoras, enquanto sua ativação está ligada a efeitos anti-inflamatórios e cardioprotetores.<sup>42</sup> O agonista do receptor de adenosina A<sub>3</sub>, namodenoson, tem efeitos anti-inflamatórios, antifibróticos e de anti-esteatose, uma vez que mostrou resultados promissores em um estudo de fase III para o tratamento do câncer de fígado e em um estudo de fase II para o tratamento da esteatohepatite não alcoólica. A namodenoson atua ativando os receptores de adenosina A<sub>3</sub>, 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 o NF-κB.<sup>43</sup> Existe uma regulação negativa da expressão do receptor de adenosina A<sub>3</sub> no coração de animais hipertensos,<sup>28</sup> indicando que esses receptores são potenciais alvos farmacológicos para o tratamento da hipertensão arterial. O efeito vasodilatador do LASSBio-2062 pode ser mediado pela ativação do receptor de adenosina A<sub>3</sub> e sua administração intravenosa em SHR reduziu a pressão arterial média nas duas doses utilizadas, 10 e 30 μmol/kg (3 e 10 mg/kg). Quando comparamos o efeito anti-hipertensivo do LASSBio-2062 com alguns medicamentos clinicamente disponíveis, identificamos que a inibição dos efeitos da angiotensina II pelo inibidor da

enzima conversora de angiotensina enalapril ocorre com a administração intravenosa de 8,2 μg/kg em ratos.<sup>44</sup> Em contrapartida, a ação anti-hipertensiva desse agonista do receptor de adenosina A<sub>3</sub> foi comparável à descrição da administração intravenosa em ratos hipertensos do anti-hipertensivo losartana (10 mg/kg de antagonista do receptor da angiotensina II).<sup>45</sup>

A ocorrência de bradicardia após administração intravenosa de LASSBio-2062 pode ser benéfica devido à ausência das características de taquicardia reflexa de muitos medicamentos vasodilatadores.<sup>46</sup>

Devido à ativação dos canais de potássio sensíveis a ATP induzida pelo LASSBio-2062, seria esperado o surgimento de efeitos colaterais adversos, como hiperglicemia, por causa da possível redução da liberação de insulina nas células beta pancreáticas.<sup>41,47</sup> Entretanto, há uma diferença entre as subunidades dos canais de potássio sensíveis a ATP nos vários tecidos onde são expressos, que incluem pâncreas, cérebro, coração e músculo liso e esquelético.<sup>48</sup> O LASSBio-2062 usado como agente anti-hipertensivo provavelmente não afetaria pacientes com diabetes, pois os canais de potássio sensíveis a ATP presentes nos vasos são diferentes daqueles localizados no pâncreas. A ausência de alteração no nível de glicose plasmática após injeção intravenosa de LASSBio-2062 reforça a falta de interferência nos distúrbios metabólicos. A glicemia foi de 139,5 ± 5,0 e 127,0 ± 11,0 mg/dL 10 e 30 minutos após a injeção intravenosa do veículo. O tratamento com LASSBio-2062 (30 μmol/kg, intravenoso) não alterou significativamente esse parâmetro com 172,0 ± 24,0 e 149,5 ± 24,0 mg/dL.

O novo agonista do receptor de adenosina  $A_3$ , LASSBio-2062, representa uma alternativa terapêutica para o tratamento da hipertensão arterial, indicando que o sistema de adenosina é um novo potencial alvo farmacológico. A ativação do receptor de adenosina  $A_3$  tem efeitos benéficos no sistema cardiovascular, pois atenua a condição aterosclerótica,<sup>49</sup> previne lesão de isquemia/reperfusão miocárdica<sup>50</sup> e induz vasodilatação coronariana.<sup>28</sup> Além disso, a ativação desses receptores expressos em neutrófilos, basófilos, eosinófilos e mastócitos reduz a resposta inflamatória.<sup>51-54</sup> Assim, a ativação dos receptores de adenosina  $A_3$  pode, além de produzir vasodilatação, reduzir o componente inflamatório da hipertensão arterial sistêmica, sugerindo múltiplos efeitos benéficos, que são fatores importantes, por se tratar de uma doença multifatorial. O LASSBio-2062 parece atuar em múltiplos alvos, o que poderia facilitar o uso em regime de monoterapia ou combinado com outros medicamentos, proporcionando interação medicamentosa ideal e reduzindo a dose utilizada. A combinação é capaz de reduzir os efeitos adversos e melhorar o controle da doença.<sup>55</sup>

## Conclusão

Com exceção do LASSBio-2084, todas as N-acildrazonas apresentaram ação vasodilatadora mais potente que o protótipo LASSBio-294, provavelmente devido à substituição do anel tiofênico pelo anel selenofênico. O aumento da potência indica melhora na interação alvo molecular-substância. O relaxamento vascular induzido pelo LASSBio-2062 pode ocorrer através da ativação dos receptores de adenosina  $A_3$  e da ativação direta/indireta dos canais de potássio. A administração intravenosa de LASSBio-2062 promoveu efeito anti-hipertensivo, sugerindo que o receptor de adenosina  $A_3$  é um alvo farmacológico inovador para o tratamento da hipertensão arterial.

## Referências

1. Radovanovic CA, Santos LA, Carvalho MD, Marcon SS. Arterial Hypertension and Other Risk Factors Associated with Cardiovascular Diseases among Adults. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2014;22(4):547-53. doi: 10.1590/0104-1169.3345.2450.
2. GBD 2017 Risk Factor Collaborators. Global, Regional, and National Comparative Risk Assessment of 84 Behavioural, Environmental and Occupational, and Metabolic Risks or Clusters of Risks for 195 Countries and Territories, 1990-2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1923-94. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32225-6.
3. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide Trends in Blood Pressure from 1975 to 2015: A Pooled Analysis of 1479 Population-Based Measurement Studies with 19.1 Million Participants. *Lancet*. 2017;389(10064):37-55. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31919-5.
4. Mills KT, Bundy JD, Kelly TN, Reed JE, Kearney PM, Reynolds K, et al. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-Based Studies from 90 Countries. *Circulation*. 2016;134(6):441-50. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018912.
5. Unger T, Borghi C, Charchar F, Khan NA, Poulter NR, Prabhakaran D, et al. 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines. *Hypertension*. 2020;75(6):1334-57. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15026.
6. Touyz RM. Hypertension 2022 Update: Focusing on the Future. *Hypertension*. 2022;79(8):1559-62. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.122.19564.
7. Muntner P, Hardy ST, Fine LJ, Jaeger BC, Wozniak G, Levitan EB, et al. Trends in Blood Pressure Control among US Adults with Hypertension, 1999-2000 to 2017-2018. *JAMA*. 2020;324(12):1190-200. doi: 10.1001/jama.2020.14545.
8. Leung AA, Williams JVA, McAlister FA, Campbell NRC, Padwal RS; Hypertension Canada's Research and Evaluation Committee. Worsening Hypertension Awareness, Treatment, and Control Rates in Canadian Women between 2007 and 2017. *Can J Cardiol*. 2020;36(5):732-9. doi: 10.1016/j.cjca.2020.02.092.
9. Zhou B, Perel P, Mensah GA, Ezzati M. Global Epidemiology, Health Burden and Effective Interventions for Elevated Blood Pressure and Hypertension. *Nat Rev Cardiol*. 2021;18(11):785-802. doi: 10.1038/s41569-021-00559-8.
10. Barroso WKS, Rodrigues CIS, Bortolotto LA, Mota-Gomes MA, Brandão AA, Feitosa ADM, et al. Brazilian Guidelines of Hypertension - 2020. *Arq Bras Cardiol*. 2021;116(3):516-658. doi: 10.36660/abc.20201238.
11. Barreiro EJ. Estratégia de Simplificação Molecular no Planejamento Racional de Fármacos: A Descoberta de Novo Agente Cardioativo. *Quim Nova*. 2002;25(6):1172-80. doi: 10.1590/S0100-40422002000700018.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Barreiro EJ, Zapata-Sudo G; Obtenção de dados: Rocha BS, Silva JS, Pedreira JGB, Montagnoli TL; Análise e interpretação dos dados: Rocha BS, Silva JS, Pedreira JGB, Montagnoli TL, Barreiro EJ, Zapata-Sudo G; Análise estatística: Rocha BS, Silva JS, Montagnoli TL; Obtenção de financiamento e Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Zapata-Sudo G; Redação do manuscrito: Rocha BS, Silva JS, Zapata-Sudo G.

## Potencial conflito de interesse

Não há conflito com o presente artigo

## Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela CAPES, CNPq, FAPERJ, INCT-INOVAR.

## Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de mestrado de Bruna de Souza Rocha pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

## Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob o número de protocolo 017/19. Todos os procedimentos envolvidos nesse estudo estão de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, atualizada em 2013.

12. Sudo RT, Zapata-Sudo G, Barreiro EJ. The New Compound, LASSBio 294, Increases the Contractility of Intact and Saponin-Skinned Cardiac Muscle from Wistar Rats. *Br J Pharmacol*. 2001;134(3):603-13. doi: 10.1038/sj.bjp.0704291.
13. Costa DG, Silva JS, Kümmerle AE, Sudo RT, Landgraf SS, Caruso-Neves C, et al. LASSBio-294, A Compound with Inotropic and Lusitropic Activity, Decreases Cardiac Remodeling and Improves Ca<sup>2+</sup>(+) Influx Into Sarcoplasmic Reticulum After Myocardial Infarction. *Am J Hypertens*. 2010;23(11):1220-7. doi: 10.1038/ajh.2010.157.
14. Silva TF. Planejamento, Síntese e Avaliação Farmacológica de uma Nova Série de Derivados Cicloalquil-N-acildrazonas: Análogos de LASSBio-294 [dissertation]. Rio de Janeiro: Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2012.
15. da Silva JS, Pereira SL, Maia Rdo C, Landgraf SS, Caruso-Neves C, Kümmerle AE, et al. N-Acylhydrazone Improves Exercise Intolerance in Rats Submitted to Myocardial Infarction by the Recovery of Calcium Homeostasis in Skeletal Muscle. *Life Sci*. 2014;94(1):30-6. doi: 10.1016/j.lfs.2013.11.012.
16. da Silva JS, Gabriel-Costa D, Sudo RT, Wang H, Groban L, Ferraz EB, et al. Adenosine A2A Receptor Agonist Prevents Cardiac Remodeling and Dysfunction in Spontaneously Hypertensive Male Rats after Myocardial Infarction. *Drug Des Dev Ther*. 2017;11:553-62. doi: 10.2147/DDDT.S113289.
17. Barreiro EJ. 12º Webinário INCT-INOVAR online. Rio Janeiro: INCT-INOVAR; 2021 [cited 2023 Jan 4]. Video 2h27 min. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=GM6ZWzlbjng>.
18. Barroso WKS, Rodrigues CIS, Bortolotto LA, Mota-Gomes MA, Brandão AA, Feitosa ADM, et al. Brazilian Guidelines of Hypertension - 2020. *Arq Bras Cardiol*. 2021;116(3):516-658. doi: 10.36660/abc.20201238.
19. Yugar-Toledo JC, Moreno Júnior H, Gus M, Rosito GBA, Scala LCN, Muxfeldt ES, et al. Brazilian Position Statement on Resistant Hypertension - 2020. *Arq Bras Cardiol*. 2020;114(3):576-96. doi: 10.36660/abc.20200198.
20. Pinheiro IM, Montes SS, Fraga HCJR, Souza RS, Pinheiro IM, Machado AO et al. Systemic Arterial Hypertension: Treatment with Integrative and Complementary Health Practices. *Res Soc Dev*. 2020;9(11):e45991110156. doi: 10.33448/rsd-v9i11.10156.
21. Silva MC, Fabiano LC, Salomão KCC, Freitas PLZ, Neves CQ, Borges SC, et al. A Rodent Model of Human-Dose-Equivalent 5-Fluorouracil: Toxicity in the Liver, Kidneys, and Lungs. *Antioxidants*. 2023;12(5):1005. doi: 10.3390/antiox12051005.
22. Pereira SL, Kummerle AE, Fraga CA, Barreiro EJ, Sudo RT, Zapata-Sudo C. Vasodilator and Antihypertensive Effects of a Novel N-Acylhydrazone Derivative Mediated by the Inhibition of L-type Ca<sup>2+</sup> Channels. *Fundam Clin Pharmacol*. 2014;28(1):29-41. doi: 10.1111/fjc.1472-8206.2012.01076.x.
23. Meotti FC, Nogueira CW. Ações Biológicas de Compostos de Selênio e Telúrio: Efeitos Tóxicos sobre o Sistema Nervoso Central. *Cienc Nat*. 2003;25(25):163-188. doi: 10.5902/2179460X27244.
24. Kümmerle AE, Raimundo JM, Leal CM, Silva GS, Balliano TL, Pereira MA, et al. Studies Towards the Identification of Putative Bioactive Conformation of Potent Vasodilator Arylidene N-Acylhydrazone Derivatives. *Eur J Med Chem*. 2009;44(10):4004-9. doi: 10.1016/j.ejmech.2009.04.044.
25. Brown IAM, Diederich L, Good ME, DeLalio LJ, Murphy SA, Cortese-Krott MM, et al. Vascular Smooth Muscle Remodeling in Conductive and Resistance Arteries in Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(9):1969-85. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311229.
26. Silva CL, Noël F, Barreiro EJ. Cyclic GMP-Dependent Vasodilatory Properties of LASSBio 294 in Rat Aorta. *Br J Pharmacol*. 2002;135(1):293-8. doi: 10.1038/sj.bjp.0704473.
27. Ray CJ, Marshall JM. The Cellular Mechanisms by Which Adenosine Evokes Release of Nitric Oxide from Rat Aortic Endothelium. *J Physiol*. 2006;570(1):85-96. doi: 10.1113/jphysiol.2005.099390.
28. Ho MF, Low LM, Rose/Meyer RB. Pharmacology of the Adenosine A3 Receptor in the Vasculature and Essential Hypertension. *PLoS One*. 2016;11(2):e0150021. doi: 10.1371/journal.pone.0150021.
29. Fozard JR, Hannon JP. BW-A522 Blocks Adenosine A3 Receptor-Mediated Hypotensive Responses in the Rat. *Eur J Pharmacol*. 1994;252(2):5-6. doi: 10.1016/0014-2999(94)90604-1.
30. Lasley RD, Narayan P, Jahania MS, Partin EL, Kraft KR, Mentzer RM Jr. Species-Dependent Hemodynamic Effects of Adenosine A3-Receptor Agonists IB-MECA and CI-IB-MECA. *Am J Physiol*. 1999;276(6):2076-84. doi: 10.1152/ajpheart.1999.276.6.H2076.
31. Zucchi R, Yu G, Ghelardoni S, Ronca F, Ronca-Testoni S. A3 Adenosine Receptor Stimulation Modulates Sarcoplasmic Reticulum Ca(2+) Release in Rat Heart. *Cardiovasc Res*. 2001;50(1):56-64. doi: 10.1016/s0008-6363(00)00318-7.
32. Thourani VH, Nakamura M, Ronson RS, Jordan JE, Zhao ZQ, Levy JH, et al. Adenosine A(3)-Receptor Stimulation Attenuates Posts ischemic Dysfunction Through K(ATP) Channels. *Am J Physiol*. 1999;277(1):228-35. doi: 10.1152/ajpheart.1999.277.1.H228.
33. Tracey WR, Magee W, Masamune H, Oleynek JJ, Hill RJ. Selective Activation of Adenosine A3 Receptors with N6-(3-chlorobenzyl)-5'-N-Methylcarboxamidoadenosine (CB-MECA) Provides Cardioprotection via KATP Channel Activation. *Cardiovasc Res*. 1998;40(1):138-45. doi: 10.1016/s0008-6363(98)00112-6.
34. Brayden JE. Functional Roles of KATP Channels in Vascular Smooth Muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29(4):312-6. doi: 10.1046/j.1440-1681.2002.03650.x.
35. Procopio MC, Lauro R, Nasso C, Carerj S, Squadrito F, Bitto A, et al. Role of Adenosine and Purinergic Receptors in Myocardial Infarction: Focus on Different Signal Transduction Pathways. *Biomedicines*. 2021;9(2):204. doi: 10.3390/biomedicines9020204.
36. Li JM, Fenton RA, Cutler BS, Dobson JG Jr. Adenosine Enhances Nitric Oxide Production by Vascular Endothelial Cells. *Am J Physiol*. 1995;269(21):519-23. doi: 10.1152/ajpcell.1995.269.2.C519.
37. Jenner TL, Rose'meyer RB. Adenosine A(3) Receptor Mediated Coronary Vasodilation in the Rat Heart: Changes that Occur with Maturation. *Mech Ageing Dev*. 2006;127(3):264-73. doi: 10.1016/j.mad.2005.10.005.
38. Tabrizchi R, Bedi S. Pharmacology of Adenosine Receptors in the Vasculature. *Pharmacol Ther*. 2001;91(2):133-47. doi: 10.1016/s0163-7258(01)00152-8.
39. Nishat S, Khan LA, Ansari ZM, Basir SF. Adenosine A3 Receptor: A Promising Therapeutic Target in Cardiovascular Disease. *Curr Cardiol Rev*. 2016;12(1):18-26. doi: 10.2174/1573403x1266616011125116.
40. Nelson MT, Quayle JM. Physiological Roles and Properties of Potassium Channels in Arterial Smooth Muscle. *Am J Physiol*. 1995;268(4):799-822. doi: 10.1152/ajpcell.1995.268.4.C799.
41. Sordi R. Participação de Canais de Potássio no Desenvolvimento do Processo Inflamatório e nas Alterações Cardiovasculares que ocorrem durante a Sepsis/Choque Séptico [dissertation]. Florianópolis: Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina; 2009.
42. Ciancetta A, Jacobson KA. Structural Probing and Molecular Modeling of the A<sub>3</sub> Adenosine Receptor: A Focus on Agonist Binding. *Molecules*. 2017;22(3):449. doi: 10.3390/molecules22030449.
43. Fishman P. Drugs Targeting the A3 Adenosine Receptor: Human Clinical Study Data. *Molecules*. 2022;27(12):3680. doi: 10.3390/molecules27123680.
44. Gross DM, Sweet CS, Ulm EH, Backlund EP, Morris AA, Weitz D, et al. 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. *J Pharmacol Exp Ther*. 1981;216(3):552-7.
45. Siegl PK, Kivlighn SD, Broten TP. Pharmacology of Losartan, an Angiotensin II Receptor Antagonist, in Animal Models of Hypertension. *J Hypertens Suppl*. 1995;13(1):S15-21. doi: 10.1097/00004872-199507001-00002.
46. Malachias MV, Souza WKS, Plavnik FL, Rodrigues CIS, Brandão AA, Neves MFT, et al. 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension:

- Presentation. *Arq Bras Cardiol.* 2016;107(3 Suppl 3):1-103. doi: 10.5935/abc.20160140.
47. Seino S, Miki T. Physiological and Pathophysiological Roles of ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channels. *Prog Biophys Mol Biol.* 2003;81(2):133-76. doi: 10.1016/s0079-6107(02)00053-6.
48. Rodrigo GC, Standen NB. ATP-Sensitive Potassium Channels. *Curr Pharm Des.* 2005;11(15):1915-40. doi: 10.2174/1381612054021015.
49. Park JG, Jeong SJ, Yu J, Kim G, Jeong LS, Oh GT. LJ-1888, a Selective Antagonist for the A<sub>3</sub> Adenosine Receptor, Ameliorates the Development of Atherosclerosis and Hypercholesterolemia in Apolipoprotein E knock-out Mice. *BMB Rep.* 2018;51(10):520-5. doi: 10.5483/BMBRep.2018.51.10.098.
50. Burnstock G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Front Pharmacol.* 2017;8:661. doi: 10.3389/fphar.2017.00661.
51. Antonioli L, Pacher P, Haskó G. Adenosine and Inflammation: It's Time to (re) solve the Problem. *Trends Pharmacol Sci.* 2022;43(1):43-55. doi: 10.1016/j.tips.2021.10.010.
52. Fisher CL, Fallot LB, Wan TC, Keyes RF, Suresh RR, Rothwell AC, et al. Characterization of Dual-Acting A<sub>3</sub> Adenosine Receptor Positive Allosteric Modulators that Preferentially Enhance Adenosine-Induced Gαi3 and GαoA Isoprotein Activation. *ACS Pharmacol Transl Sci.* 2022;5(8):625-41. doi: 10.1021/acspsci.2c00076.
53. Ge ZD, van der Hoeven D, Maas JE, Wan TC, Auchampach JA. A(3) Adenosine Receptor Activation During Reperfusion Reduces Infarct Size Through Actions on Bone Marrow-Derived Cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49(2):280-6. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.01.018.
54. Jordan JE, Thourani VH, Auchampach JA, Robinson JA, Wang NP, Vinten-Johansen J. A(3) Adenosine Receptor Activation Attenuates Neutrophil Function and Neutrophil-Mediated Reperfusion Injury. *Am J Physiol.* 1999;277(5):H1895-905. doi: 10.1152/ajpheart.1999.277.5.H1895.
55. Póvoa R, Barroso WS, Brandão AA, Jardim PC, Barroso O, Passarelli O Jr, et al. I Brazilian Position Paper on Antihypertensive Drug Combination. *Arq Bras Cardiol.* 2014;102(3):203-10. doi: 10.5935/abc.20140023.

