

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Carla Moreira Leal

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO DERIVADO N-
ACILIDRAZÔNICO LASSBio-1027 EM MODELOS DE
HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA E
HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR**

Rio de Janeiro

Agosto/2014



AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO DERIVADO N- ACILIDRAZÔNICO LASSBio-1027 EM MODELOS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA E HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

Carla Moreira Leal



Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Orientadores: Prof^a. Dra. Gisele Zapata-Sudo
Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo

Rio de Janeiro

Agosto/2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Leal, Carla Moreira.

Avaliação farmacológica do derivado *N*-acilidrazônico LASSBio-1027 em modelos de hipertensão arterial sistêmica e hipertensão arterial pulmonar/ Carla Moreira Leal. – Rio de Janeiro: UFRJ/ ICB, 2014.

xv, 89f.: il

Orientadores: Gisele Zapata-Sudo e Roberto Takashi Sudo.

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, 2014.

Referências Bibliográficas: f. 93-104.

1. Receptor A_{2A} de adenosina. 2. Efeito vasodilatador. 3. Hipertensão arterial. 4. Hipertensão pulmonar. I. Zapata-Sudo, Gisele. II. Sudo, Roberto Takashi. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal. IV. Título.

**“Avaliação farmacológica do derivado N-acilidrazônico
LASSBio-1027 em modelos de hipertensão arterial sistêmica e
hipertensão arterial pulmonar”**

Carla Moreira Leal

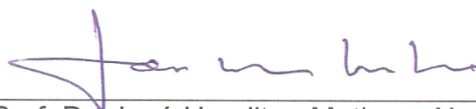
Orientadores:

Prof.^a Dr.^a Gisele Zapata Sudo

Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia).

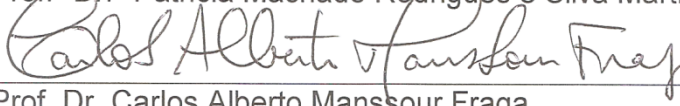
Aprovada por:



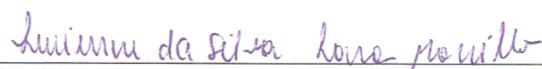
Prof. Dr. José Hamilton Matheus Nascimento



Prof.ª Dr.ª Patricia Machado Rodrigues e Silva Martins



Prof. Dr. Carlos Alberto Manssour Fraga



Prof.ª Dr.ª Lucienne da Silva Lara Morcillo (Revisora)



Prof.ª Dr.ª Gisele Zapata Sudo (orientadora)



Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo (orientador)

Rio de Janeiro
01 de agosto de 2014

Ao meu bom Deus,
por ser a luz da minha vida.

Aos meus pais e irmãs,
por todo amor e apoio incondicionais.

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Gisele e Takashi, pela oportunidade, incentivo e confiança.

Aos professores Eliezer de Jesus Barreiro, Carlos Alberto Manssour Fraga (Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas) por terem colaborado com este projeto ao ceder a substância em estudo.

A todos os amigos do laboratório pela amizade e companheirismo.

À técnica do Laboratório Marli de Souza, pela amizade, apoio e imenso carinho.

À Emanuelle Ferraz pela realização do ecocardiograma e a Roberta Tesch pela realização do *Docking*.

Ao técnico Tadeu pela ajuda com a histologia.

A revisora Profa. Dra. Lucienne Morcillo, pela revisão deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora Prof. Dr. José Hamilton Matheus Nascimento, Prof. Dr. Carlos Alberto Manssour Fraga, Profa. Dra. Patricia Machado Rodrigues e Silva Martins, pela participação e avaliação.

A FAPERJ, CAPES, CNPq, INCT, Pronex pelo apoio financeiro.

RESUMO

Avaliação farmacológica do derivado *N*-acilidrazônico heteroaromático LASSBio-1027 em modelos de hipertensão arterial sistêmica e hipertensão arterial pulmonar

Carla Moreira Leal

Orientadores: Prof^a. Dra. Gisele Zapata-Sudo
Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

A substância protótipo *N*-acilidrazônica, LASSBio-294, sintetizada a partir do safrol apresentou atividade vasodilatadora em anéis de aorta e efeito anti-hipertensivo. Sendo assim, derivados foram desenvolvidos para identificação de novos agentes vasodilatadores mais potentes e com menor efeitos colaterais. O derivado *N*-acilidrazônico heteroaromático, (*E*)-*N'*-(benzo [*d*] [1,3] dioxola -5- metileno) tiofeno-2-carbozihidrazida (LASSBio-1027) foi sintetizado e avaliado em modelos de hipertensão arterial (HA) e pulmonar (HAP). LASSBio-1027 promoveu relaxamento vascular em aorta de ratos com endotélio preservado, obtendo concentração inibitória média (CI₅₀) de $6,89 \pm 1,4 \mu\text{M}$, mediado pela ativação dos receptores de adenosina A_{2A}. Também promoveu relaxamento vascular em aorta de ratos sem endotélio, obtendo CI₅₀ de $154,7 \pm 17,4 \mu\text{M}$. A administração intraperitoneal por 14 dias de LASSBio-1027 (10 mg/kg/dia) promoveu efeito anti-hipertensivo em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Houve redução da pressão arterial média de $187,2 \pm 4,8$ para $103,3 \pm 3,1$ mm Hg ($p < 0,05$). Em ratos com HAP induzida pela monocrotalina, LASSBio-1027 (50 e 75 mg/kg/dia *p.o.*) reduziu a hipertrofia ventricular direita, a disfunção endotelial da artéria pulmonar, e reverteu, as alterações do fluxo vascular pulmonar demonstrado através da ecocardiografia. LASSBio-1027 demonstrou um potente efeito vasodilatador e anti-hipertensivo, com potencial terapêutico para o tratamento da HA e da HAP.

Palavras-chave: Receptor A_{2A} de adenosina, efeito vasodilatador, hipertensão arterial, hipertensão pulmonar.

Rio de Janeiro
Agosto/2014

ABSTRACT

Pharmacological evaluation of the *N*-acylhydrazone derivative LASSBio-1027 in systemic arterial hypertension and pulmonary arterial hypertension models.

Carla Moreira Leal

Orientadores: Profa. Dra. Gisele Zapata-Sudo

Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

The prototype *N*-acylhydrazone substance, LASSBio-294 synthesized from safrole previously have been found to promote vasodilation in aortic rings and antihypertensive. Accordingly, derivatives were developed to identify new more potent vasodilators with less side effects. The *N*-acylhydrazone derivative, (*E*)-*N*-(benzo [d][1,3] dioxole-5-methylene) thiophen -2-carbohydrazide (LASSBio-1027) was synthesized and evaluated in models of arterial and pulmonary hypertension (PAH). LASSBio-1027-induced vascular relaxation of aortic rings from Wistar rats. In aorta with preserved endothelium the mean inhibitory concentration (IC₅₀) of LASSBio-1027 was $6,89 \pm 1,4 \mu\text{M}$, mediated by activation of adenosine A_{2A} receptors. However, in endothelium-denuded aorta, the IC₅₀ was $154,7 \pm 17,4 \mu\text{M}$. Intraperitoneal administration for 14 days of LASSBio-1027 (10 mg / kg / day) produced an antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats (SHR). There was a reduction in mean arterial pressure from 187.2 ± 4.8 to 103.3 ± 3.1 mmHg ($p < 0.05$). In rats with monocrotaline-induced PAH, LASSBio-1027 (50 and 75 mg / kg / day *p.o.*) reduced right ventricular hypertrophy, endothelial dysfunction of the pulmonary artery, and reversed the changes in pulmonary vascular flow demonstrated by echocardiography. LASSBio-1027 demonstrated a potent vasodilator and antihypertensive effects with potential therapeutic for the treatment of hypertension and the PAH.

Keywords: adenosine A_{2A} receptor, vasodilator effect, arterial hypertension, pulmonary hypertension.

Rio de Janeiro
Agosto/2014

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A _{2A}	- receptor de adenosina do tipo 2A
ADP	- difosfato de adenosina
Ae	- área externa
Ai	- área interna
ALK1	- quinase tipo receptor de ativina tipo 1
AMP _c	- adenosina monofosfato cíclico
ATP	- trifosfato de adenosina
AVE	- acidente vascular encefálico
BMPR2	- receptor da proteína morfogenética óssea tipo 2
bpm	- batimentos por minuto
Ca _L	- canal de cálcio tipo L voltagem-dependente
CHO	- <i>Chinese hamster ovary</i>
DAG	- diacilglicerol
DIC	- doença isquêmica do coração
DMSO	- sulfóxido de dimetil
DPOC	- doença pulmonar obstrutiva crônica
DVOP	- doença veno-oclusiva pulmonar
ECA	- enzima conversora de angiotensina
ECG	- eletrocardiograma
E _m	- potencial de membrana
eNOS	- óxido nítrico sintase endotelial
EPN	- endopeptidase neutra
ET-1	- endotelina-1
ET _A /ET _B	- receptores de endotelina-1
EUA	- Estados Unidos da América
FC	- frequência cardíaca

FCDP	- fator de crescimento derivado de plaqueta
FCEV	- fator de crescimento do endotélio vascular
FCF	- fator de crescimento de fibroblasto
GCs	- guanilato ciclase solúvel
GMP _c	- guanosina monofosfato cíclico
H ₁	- receptor de histamina do tipo 1
HAS	- hipertensão arterial sistêmica
HAP	- hipertensão arterial pulmonar
HEK-293	- <i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i>
HCP	- hemangiomatose capilar pulmonar
H&E	- hematoxilina e eosina
HIV	- vírus da imunodeficiência humana
5-HT	- 5-hidroxitriptamina ou serotonina
5-HTT	- transportador de 5-hidroxitriptamina
I _{Kv}	- corrente de potássio voltagem-dependente
IP ₃	- inositol trifosfato
i.p.	- intraperitoneal
IP ₃ R	- receptor de inositol trifosfato
i.v.	- intravenoso
K _{ATP}	- canal de potássio dependente de ATP
K _v	- canal de potássio voltagem-dependente
LASSBio [®]	- Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
MAPK	- proteína quinase ativada por mitógeno
MCT	- monocrotalina
MCTP	- monocrotalina pirrol
min	- minuto
mmHg	- milímetros de mercúrio
MS	- Ministério da Saúde
NAH	- <i>N</i> -acilidrazona
<i>p.o.</i>	- per os
PA	- pressão arterial
PAD	- pressão arterial diastólica

PAM	- pressão arterial média
PAS	- pressão arterial sistólica
PDE	- fosfodiesterase
PGI ₂	- prostaciclina
PIP ₂	- fosfatidilinositoldifosfato
PKA	- proteína quinase A
PKC	- proteína quinase C
PKG	- proteína quinase G
PLC	- fosfolipase C
PMCA	- Ca ²⁺ -ATPase da membrana plasmática
PSVD	- pressão sistólica ventricular direita
RNA _m	- RNA mensageiro
ROC	- <i>receptor-operated calcium channel</i>
ROCK	- Rho-quinase
ROS	- espécies reativas oxigenadas
RPN	- receptor de peptídeos natriuréticos
RS	- retículo sarcoplasmático
RTK	- receptor tirosina quinase
RVP	- resistência vascular periférica
RyR	- receptor de rianodina
SERCA	- bomba Ca ²⁺ - ATPase do retículo sarcoplasmático
SHR	- <i>spontaneously hypertensive rats</i>
SOC	- <i>store-operated calcium channel</i>
SRAA	- sistema renina-angiotensina-aldosterona
TonEBP	Proteína ligadora do realçador responsivo a tonicidade (Tonicity-responsive enhancer binding protein)
VD	- ventrículo direito
VD/VE + S	- relação entre o peso do VD e o peso de VE+S
VE	- ventrículo esquerdo
VE + S	- ventrículo esquerdo + septo interventricular
v.o.	- via oral
ZM241385	-4-(2-[7-Amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol
WKY	- Wistar-Kyoto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Hipertensão arterial sistêmica (HAS)	15
1.1.1 Fisiopatologia da HAS	18
1.1.2 Medidas não-medicamentosas e medicamentos anti-hipertensivos	22
.1.2 Hipertensão arterial pulmonar (HAP)	28
1.2.1 Classificação da HAP	29
1.2.2 Fisiopatologia da HAP	31
1.2.2.1 <i>Remodelagem da parede arteriolar</i>	31
1.2.2.2 <i>Vasoconstrição</i>	35
1.2.3 Tratamento farmacológico da HAP	36
1.2.4 Novas estratégias terapêuticas para o tratamento da HAP	38
1.3 Desenvolvimento do derivado N-acilidrazônico heteroaromático	41
1.4 JUSTIFICATIVA	44
1.5 OBJETIVOS	45
1.5.1 Objetivo geral	45
1.5.2 Objetivos específicos	45
2 MATERIAIS E MÉTODOS	47
2.1 Animais	47
2.2 Substâncias	47
2.3 Registro de tensão isométrica do músculo liso vascular	47
2.4 Avaliação do efeito anti-hipertensivo durante tratamento prolongado	49
2.5 Ensaio de competição com radioligantes	50
2.6 Modelo animal de hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina	50
2.6.1 Medida de pressão sistólica do ventrículo direito	51
2.6.2 Registro de tensão isométrica de artérias pulmonares	52
2.6.3 Análise morfométrica das arteríolas pulmonares	52
2.6.3.1 <i>Coloração de hematoxilina-eosina</i>	52
2.6.3.2 <i>Coloração de Gomori</i>	53
2.7 Ecocardiograma	55

2.8 Análise estatística	56
3 RESULTADOS	58
3.1 Efeito do LASSBio-1027 no músculo liso arterial	58
3.2 Efeito do LASSBio-1027 durante tratamento prolongado	61
3.3 Ensaio de competição com radioligantes	64
3.4 Hipertensão arterial pulmonar	65
3.4.1 Tratamento terapêutico por 14 dias com LASSBio-1027 através da via intraperitoneal	65
3.4.2 Análise morfométrica das arteríolas pulmonares após tratamento terapêutico por 14 dias com LASSBio-1027 através da via intraperitoneal	68
3.4.3 Tratamento terapêutico por 14 dias com LASSBio-1027 através da via oral	69
3.4.4 Análise morfométrica das arteríolas pulmonares após tratamento terapêutico por 14 dias com LASSBio-1027 através da via oral	73
3.5 Ecocardiograma	74
4 DISCUSSÃO	80
4.1 Hipertensão arterial sistêmica	80
4.2 Hipertensão arterial pulmonar	85
5 CONCLUSÕES	91
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS)

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2012) um a cada três indivíduos no mundo sofre de HAS que é uma doença crônica, de origem multifatorial.

De acordo com a classificação do III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 1998) a hipertensão arterial (HA) ocorre quando o paciente apresenta pressão arterial sistólica (PAS) maior ou igual a 140 mm Hg e uma pressão arterial diastólica (PAD) maior ou igual a 90 mm Hg naqueles que não façam uso de medicação anti-hipertensiva.

A medida da pressão arterial (PA) é o elemento chave para o estabelecimento do diagnóstico da HAS. De acordo com as normativas da VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010), a classificação da HA em pacientes com mais de 18 anos mostra como limítrofe PAS 130 a 139 mm Hg ou PAD 85 a 89 mm Hg (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação da PA segundo valores da PAS e da PAD de acordo com as V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial

Classificação da pressão arterial	Pressão arterial sistólica (mmHg)		Pressão arterial diastólica (mmHg)
Ótima	< 120	e	< 80
Normal	< 130	e	< 85
Limítrofe	130 a 139	ou	85 a 89
Estágio 1	140 a 159	ou	90 a 99
Estágio 2	160 a 179	ou	100 a 109
Estágio 3	≥ 180	ou	≥ 110
Hipertensão sistólica isolada	> 140	e	< 90

Fonte: VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

A publicação do VII *Joint National Committee* (JNC) em 2004 forneceu uma nova classificação da HAS e introduziu o conceito de pré-hipertensão, em que pacientes com PA limítrofe possuem um maior risco de eventos cardiovasculares que pacientes normotensos (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação da PA segundo os valores de PAS e da PAD de acordo com o VII *Joint National Committee*

Classificação da pressão arterial	Pressão arterial sistólica (mmHg)		Pressão arterial diastólica (mmHg)
Normal	< 120	e	< 80
Pré-hipertensão	120 a 139	ou	80 a 89
Hipertensão estágio 1	140 a 159	ou	90 a 99
Hipertensão estágio 2	≥ 160	ou	≥ 100

Fonte: NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2004

Na tabela 3, encontra-se definição e classificação da PA (em mm Hg) nas medidas de consultório, segundo o “Guideline” das Sociedades Europeias de Cardiologia e Hipertensão Arterial, publicado em 2013.

Tabela 3. Classificação da PA segundo os valores de PAS e PAD de acordo com “Guideline” das Sociedades Europeias de Cardiologia e Hipertensão Arterial

Categoria	Sistólica		Diastólica
Ótima	< 120	e	< 80
Normal	120 – 129	e/ou	80 – 84
Normal Alta	130 – 139	e/ou	85 – 89
Grau 1	140 – 159	e/ou	90 – 99
Grau 2	160 – 179	e/ou	100 – 109
Grau 3	≥ 180	e/ou	≥ 110
Sistólica Isolada	≥ 140	e	< 90

Fonte: ESH/ESC GUIDELINES FOR THE MANAGEMENT OF ARTERIAL HYPERTENSION, 2013

A HA é dividida em dois grandes grupos: hipertensão primária e hipertensão secundária. A hipertensão primária caracteriza-se pela elevada pressão sanguínea na qual causas secundárias não estão presentes (KAPLAN, 2006).

Apesar de não apresentar causa definida, sabe-se que a hipertensão primária é multifatorial, ou seja, diferentes fatores, isolados ou não, podem

contribuir para seu desenvolvimento. Dentre os fatores contribuintes para o desenvolvimento da hipertensão primária estão: caráter hereditário, retenção renal de sódio, estresse, obesidade, diabetes, fumo, idade, raça (KAPLAN, 2006).

Diferentemente, a hipertensão secundária tem causa conhecida e pode ser prevenida. Algumas causas para o desenvolvimento da hipertensão secundária são a doença renal crônica, aldosteronismo primário, síndrome de *Cushing*, tratamento crônico com glicocorticóides. No entanto, esta forma de hipertensão acomete cerca de 5 a 10 % dos pacientes (KAPLAN, 2006).

De acordo com levantamento da *American Heart Association* (2009), cerca de 80 milhões de adultos nos EUA são acometidos por doenças cardiovasculares, e quase 30 % das mortes de crianças norte-americanas por defeitos congênitos ocorrem devido a doenças cardiovasculares. Em 2009, o custo do tratamento dessas doenças nos EUA ultrapassou 300 bilhões de dólares, considerando despesas médicas e perda da produtividade no país (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2009).

Estima-se, a partir de dados do Ministério de Saúde (BRASIL, 2006), que a HA atinja aproximadamente 22,3% a 43,9 % da população brasileira acima de vinte anos, e é um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e renais, sendo responsável por pelo menos 40% das mortes por acidente vascular cerebral, por 25% das mortes por doença arterial coronariana e, em combinação com o diabete, 50% dos casos de insuficiência renal terminal. Ainda estimou que 65% dos idosos sejam hipertensos e que nesta faixa etária prevalece a hipertensão sistólica isolada. Uma das limitações do tratamento da HA nos idosos está relacionada com a disfunção gradativa e inespecífica dos órgãos o que exige ajuste cuidadoso das doses dos medicamentos, redução gradativa da PA e acompanhamento adequado para identificação de reações adversas e interações farmacológicas (BRASIL, 2006)

Nos negros, a prevalência e a gravidade da hipertensão são maiores, o que pode estar relacionado a fatores étnicos e/ou socioeconômicos. No país, predominam os miscigenados, que podem diferir dos negros quanto às características da hipertensão (BRASIL, 2006).

No Brasil, projeções da Organização das Nações Unidas (ONU, 2002) indicam que a mediana da idade populacional passará, de 25,4 anos em 2000 a 38,2 anos em 2050. Então, ao associar o crescimento da população idosa e a idade, que é um fator de risco para a HAS, há uma preocupação adicional no controle da HA. Sendo assim, o aumento da prevalência da HA pode ser consequência do envelhecimento populacional.

Além disso, a relação entre PA e risco de eventos cardiovasculares é consistente e independente de outros fatores de risco. Quanto mais alta a PA, maior a chance de falência cardíaca, acidente vascular encefálico e doença renal (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2004). A presença de fatores de risco adicionais como inatividade física, colesterol plasmático elevado, obesidade, diabetes, fumo e álcool, aumenta a chance de complicações cardiovasculares em hipertensos (WHO, 2012; AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2009).

Portanto, o diagnóstico precoce possibilita uma melhor qualidade de vida além de reduzir os riscos cardiovasculares nos pacientes hipertensos. Estima-se que 40% dos acidentes vasculares encefálicos e em torno de 25% dos infartos ocorridos em pacientes hipertensos poderiam ser prevenidos com terapia anti-hipertensiva adequada (FUCHS et al, 1997).

1.1.1 Fisiopatologia da HAS

A HA é uma síndrome poligênica produzida pela combinação de múltiplos fatores tais como aspectos genéticos, ambientais, vasculares, hormonais, renais e neurais. Assim, é caracterizada por diversas alterações moleculares e estruturais, que associadas, contribuem para o desenvolvimento da doença (DENG, 2007; RAFIQ, ANAND e ROBERTS 2010; MARQUES e MORRIS, 2012; GONZÁLEZ e VALLS, 2014).

Fatores Genéticos: a hereditariedade desempenha papel fundamental na gênese da hipertensão. A hipertensão arterial é, pois, quantitativa, complexa e poligênica sendo o resultante final da influência dos fatores ambientais sobre a expressão de certos genes.

Fatores Ambientais: o ambiente influi de forma considerável, visto que mudanças de hábitos alteram o comportamento da pressão arterial. Um

exemplo é a ingestão de sal. O sal tem importância na gênese da HAS em indivíduos geneticamente predispostos. O excesso de sal na alimentação e a incapacidade dos rins de excretar a sobrecarga de sódio induzem hipertensão por aumento do volume plasmático, da pré-carga e, conseqüentemente, do débito cardíaco (TAKAHASHI et al, 2011). Titze e colaboradores encontraram novas evidências da contribuição do sal para a gênese da HA ao descrever que um outro órgão - a pele - contribui para o controle da pressão arterial (MACHNIK et al, 2009; WIIG et al, 2013; TITZE et al, 2014). Eles descreveram que o organismo é capaz de armazenar sódio na pele e que as células do sistema imunológico e capilares linfáticos (vasos do sistema linfático) regulam o balanço de sódio e pressão arterial. Em ratos submetidos a uma dieta com alto teor de sal, grande quantidade de sódio acumula-se na pele. Sendo assim, células do sistema imunológico (sistema mononuclear fagocitário) são sensibilizadas pelo acúmulo de sódio e ativam uma proteína chamada proteína ligadora do realçador responsivo a tonicidade (*tonEBP*). Esta proteína aumenta a expressão do fator de crescimento derivado do endotélio (VEGF-C) por células do sistema imunológico, o que permite a formação de vasos linfáticos cutâneo promovendo o *clearance* de sódio e cloreto. Titze e colaboradores mostraram que a eliminação do gene *tonEBP* em células do sistema mononuclear fagocitário impediu a resposta do VEGF-C a uma dieta com alto teor de sal, aumentando a pressão sanguínea. Sendo assim, demonstrou que a sinalização *TonEBP-VEGF-C* em células do sistema mononuclear fagocitário é um dos principais determinantes do volume extracelular e homeostase da pressão arterial e que alterações nessa via desencadeiam a hipertensão induzida por sal (MACHNIK et al, 2009; WIIG et al, 2013; TITZE et al, 2014).

Fatores Vasculares: Segundo os conceitos clássicos da hemodinâmica, a pressão arterial é determinada pelo débito cardíaco (DC) multiplicado pela resistência vascular periférica total (RVP). Esses determinantes dependem da interação de uma série de fatores. Sendo assim, alterações no DC e/ou RVP podem resultar na HA.

A disfunção endotelial tem também participação na gênese da hipertensão arterial. Sabendo que o endotélio atua na regulação do tônus vascular e da resistência vascular periférica, a disfunção endotelial promove o desbalanço entre a produção e a disponibilidade de fatores endoteliais

constritores e relaxantes. Dentre os fatores que poderiam promover relaxamento do músculo liso vascular pode-se citar a prostaciclina (PGI_2) e o óxido nítrico (NO), enquanto que a endotelina-1 é considerada o vasoconstritor endógeno mais potente (ARTINANO e GONZALEZ, 1999). Esse desbalanço ocorre devido ao aumento da produção e liberação de radicais livres ou espécies reativas oxigenadas (ROS) pelo endotélio vascular disfuncional, especialmente o ânion superóxido (TOROK, 2008). Esse radical livre é formado quando a hipoxantina é convertida à xantina, e quando esta é convertida em ácido úrico, pela ação da enzima xantina oxidase. Em condições fisiológicas, baixas concentrações do radical superóxido são neutralizadas pela atividade da enzima superóxido dismutase. Entretanto, em condições patológicas, como a HAS, ocorre aumento da produção desses radicais ou deficiência da enzima superóxido dismutase (ARTINANO e GONZALEZ, 1999). Conseqüentemente, o ânion superóxido, que está presente em altas concentrações na disfunção do endotélio vascular, reage com o NO e diminui sua disponibilidade (TOROK, 2008). Além disso, o ânion superóxido também estimula a síntese e a liberação de fatores vasoconstritores pelo endotélio (ARTINANO e GONZALEZ, 1999; TOROK, 2008). Esse desbalanço reduz a resposta vasodilatadora mediada pelo endotélio e um aumento da resposta vasoconstritora, o aumenta a RVP e a PA.

Rins: A participação dos rins no processo hipertensivo foi evidenciada através de estudos de transplante-cruzado de rins de animais geneticamente hipertensos e seus controles normotensos, e observou-se que a PA nos animais transplantados refletia as características genéticas dos doadores ao invés das características dos transplantados (KOPF, WALDHEER e RETTING 1993).

Sendo assim, um dos mecanismos propostos para a participação dos rins na gênese da HA seria o balanço de sódio. A regulação em longo prazo da PA está intimamente associada com a homeostase do volume do fluido extracelular, o qual por sua vez é determinado pelo conteúdo de sódio. O balanço de sódio, isto é, o equilíbrio entre o que é ingerido e o que é eliminado, é crítico para o volume do fluido extracelular, e os rins, como a principal rota através da qual o sódio é eliminado do corpo, são fundamentais para a estabilidade da pressão arterial a longo prazo (MULLINS, BAILEY e MULLINS,

2006). Desta forma, uma elevação da pressão arterial ou da pressão de perfusão na artéria renal resulta em um rápido aumento da excreção renal de água e sódio pelos rins, denominada natriurese pressórica. Com isso, reduz o débito cardíaco, baixando a PA e retomando a taxa de excreção renal de sódio ao nível basal (ZATZ, 2002).

Guyton e Coleman demonstraram em 1967 que os rins têm importância primária na regulação da PA. Eles observaram que uma vasoconstrição sistêmica não poderia induzir aumentos sustentados na PA se a função renal estivesse normal (GUYTON e COLEMAN, 1967). Sendo assim, a função renal alterada poderia contribuir para a elevação da PA ou mesmo fazer com que os níveis de PA não retornassem a valores normais após um aumento sustentado da mesma. Nesse sentido, tem-se que a HA pode resultar de uma redução da capacidade de eliminar sódio em resposta ao aumento da ingestão ou da falta da habilidade dos rins em promover natriurese pressórica (MULLINS, BAILEY e MULLINS 2006). Essa hipótese é corroborada pela ação dos anti-hipertensivos que promovem excreção de sódio e água, resultando em controle da PA.

Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA): A renina é uma enzima que, sob a ação de alterações na pressão da arteríola aferente renal e concentração de sódio na mácula densa, é liberada do aparelho justaglomerular e, ao interagir com seu substrato plasmático angiotensinogênio, transforma-se em angiotensina I. A angiotensina I, é uma substância inativa do ponto de vista vascular. No entanto, principalmente sob a ação de uma enzima conversora, nos pulmões, transforma-se em angiotensina II, essa com forte ação sobre os vasos. A angiotensina II promove vasoconstrição, aumenta o tônus simpático, estimula a secreção de aldosterona, estimula a reabsorção de sódio e água, contribuindo para o desenvolvimento da HA (RITTER, 2011).

Sistema nervoso simpático: Há fortes evidências de que o sistema nervoso simpático desempenhe um papel importante por meio de sua atividade aumentada na gênese e na sustentação da HAS (REIS, 1984). A hiperatividade simpática pode ser ocasionada, em parte, pela redução da disponibilidade de NO, o que leva ao aumento da concentração de noradrenalina pós-sináptica e promove dessensibilização de receptores beta-adrenérgicos e redução da produção de AMP_c intracelular (MICHAEL, BRODDE e INSEL, 1990). O aumento da atividade simpática também pode ser decorrente do aumento da

ativação do SRAA. Isso porque a angiotensina II, além de estimular a secreção de adrenalina pela glândula adrenal e aumentar a liberação de noradrenalina de terminais simpáticos periféricos, também apresenta ações neurogênicas mediadas pela ativação de seus receptores no bulbo, como a regulação central da atividade de barorreceptores, controle do tônus simpático, controle do fluxo sanguíneo renal e da excreção urinária de Na^+ , regulando a PA por longo prazo. Dessa forma, a angiotensina II regula a atividade de neurônios vasomotores bulbares que comandam o tônus eferente simpático (FERRARIO, 1990).

1.1.2 Medidas não-farmacológicas e fármacos anti-hipertensivos

O objetivo principal do tratamento anti-hipertensivo é prevenir a morbidade e reduzir a mortalidade cardiovascular associadas à HA. Deve-se considerar, portanto, mudanças no estilo de vida (tratamento não-farmacológico) e terapia anti-hipertensiva.

Na hipertensão leve ou de estágio 1, não há necessidade do emprego de medicamentos, mas sim, mudança no estilo de vida e monitoramento regular da PA. As seguintes metas devem ser seguidas: controle do peso corporal, atividade física regular, restrição ao sal (ingesta diária < 2,4 g), maior ingestão de alimentos ricos em potássio, redução do consumo de álcool e abandono do tabagismo (SASAKI, ZHANG e KESTELLOT 1995).

No entanto, a HA moderada e grave de estágios 2 e 3 respectivamente, deve ser tratada com o uso de anti-hipertensivos associada à mudança no estilo de vida. Porém, para a tomada da decisão terapêutica é necessária a confirmação diagnóstica, seguindo-se a estratificação de risco (Tabela 4), que levará em conta, além dos valores da PA, a presença de fatores de risco cardiovasculares (Tabela 5), as lesões em órgãos-alvo e as doenças cardiovasculares (Tabela 6) e, finalmente, a meta mínima de valores da PA, que deverá ser atingida com o tratamento (Tabela 7).

Tabela 4. Estratificação do risco individual do paciente hipertenso: risco cardiovascular adicional de acordo com os níveis da pressão arterial e a presença de fatores de risco, lesões de órgãos-alvo e doença cardiovascular

Fatores de risco	Pressão arterial				
	Normal	Limitrofe	Hipertensão estágio 1	Hipertensão estágio 2	Hipertensão estágio 3
Sem fator de risco	Sem risco adicional		Risco baixo	Risco médio	Risco alto
1 a 2 fatores de risco	Risco baixo	Risco baixo	Risco médio	Risco médio	Risco muito alto
3 ou mais fatores de risco ou lesão de órgãos-alvo ou diabetes melito	Risco médio	Risco alto	Risco alto	Risco alto	Risco muito alto
Doença cardiovascular	Risco alto	Risco muito alto	Risco muito alto	Risco muito alto	Risco muito alto

Fonte: VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

Tabela 5. Identificação de fatores do risco cardiovascular

Fatores de risco maiores
Tabagismo
Dislipidemias
Diabetes melito
Nefropatia
Idade acima de 60 anos
História familiar de doença cardiovascular em: <ul style="list-style-type: none"> Mulheres com menos de 65 anos Homens com menos de 55 anos
Outros fatores
Relação cintura/quadril aumentada
Circunferência da cintura aumentada
Microalbuminúria
Tolerância à glicose diminuída/glicemia de jejum alterada
Hiperuricemia
PCR ultra-sensível aumentada ^{62,63}

Fonte: VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

Tabela 6. Identificação de lesões de órgãos-alvo e doenças cardiovasculares

Hipertrofia do ventrículo esquerdo
Angina do peito ou infarto agudo do miocárdio prévio
Revascularização miocárdica prévia
Insuficiência cardíaca
Acidente vascular cerebral
Isquemia cerebral transitória
Alterações cognitivas ou demência vascular
Nefropatia
Doença vascular arterial de extremidades
Retinopatia hipertensiva
Para pacientes com três ou mais fatores de risco cardiovascular considerar marca dores mais precoces da lesão de órgãos-alvo, como:
Microalbuminúria (índice albumina/creatinina em amostra isolada de urina)
Parâmetros ecocardiográficos: remodelação ventricular, função sistólica e diastólica
Espessura do complexo íntima-média da carótida (ultra-som vascular)
Rigidez arterial
Função endotelial

Fonte: VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010)

Tabela 7. Metas de valores da pressão arterial a serem obtidas com o tratamento

Categorias	Meta (no mínimo)*
Hipertensos estágio 1 e 2 com risco cardiovascular baixo e médio	< 140/90 mmHg
Hipertensos e limitófes com risco cardiovascular alto	< 130/85 mmHg
Hipertensos e limitófes com risco cardiovascular muito alto	< 130/80 mmHg
Hipertensos nefropatas com proteinúria > 1,0 g/l	< 125/75 mmHg

* Se o paciente tolerar, recomenda-se atingir com o tratamento valores de pressão arterial menores que os indicados como metas mínimas, alcançando, se possível, os níveis da pressão arterial considerada ótima ($\leq 120/80$ mmHg).

Fonte: VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

A estratégia terapêutica deverá ser individualizada de acordo com a estratificação de risco e a meta do nível de pressão arterial a ser alcançado (Tabela 7). Preconizam-se mudanças dos hábitos alimentares e do estilo de

vida (tratamento não-farmacológico) para todos os pacientes, independentemente do risco cardiovascular.

O tratamento medicamentoso da HA consiste na utilização de diferentes classes de fármacos como: diuréticos, substâncias que alteram a função do sistema nervoso simpático (agentes simpatomiméticos de ação central, bloqueadores dos neurônios adrenérgicos, antagonistas dos receptores α e β adrenérgicos), bloqueadores dos canais de cálcio, inibidores da angiotensina (inibidores da enzima conversora de angiotensina, agentes bloqueadores dos receptores de angiotensina) e vasodilatadores de ação direta (COWLEY, 2006; BENOWITZ, 2004; SMITH e ASHIYA, 2007).

Diuréticos: aumentam a excreção renal de sódio e água, o que reduz a volemia e conseqüentemente, a PA. Esta classe de anti-hipertensivos é a mais antiga e mais estudada. Os principais efeitos colaterais consistem em diurese intensa e depleção de íons potássio e magnésio, comprometimento da tolerância à glicose e aumento das concentrações séricas de lipídios (SMITH e ASHIYA, 2007) Os diuréticos mais utilizados incluem: diuréticos de alça (furosemida), tiazídicos (hidroclorotiazida, indapamida), poupadores de potássio (espironolactona).

Simpatomiméticos de ação central: atuam estimulando os receptores α_2 -adrenérgicos pré-sinápticos (metildopa, clonidina e guanabenz) e/ou os receptores imidazolidínicos (moxonidina) no sistema nervoso central, reduzindo a descarga simpática. A eficácia anti-hipertensiva desse grupo de medicamentos como monoterapia é, em geral, discreta. Os fármacos que reduzem a pressão arterial através de suas ações sobre o sistema nervoso central podem causar sonolência, sedação, boca seca, fadiga, hipotensão postural, impotência e distúrbio do sono com pesadelos (SMITH e ASHIYA, 2007).

Bloqueadores β -adrenérgicos: o mecanismo anti-hipertensivo envolve a redução do débito cardíaco e a diminuição da secreção de renina. São eficazes como monoterapia, e constituem a primeira opção na hipertensão arterial associada a doença coronariana ou arritmias cardíacas. Entre as reações indesejáveis desta classe de anti-hipertensivos destacam-se: broncoespasmo, bradicardia intensa (inferior a 50 batimentos/min), distúrbios da condução atrioventricular, depressão miocárdica, vasoconstrição periférica, insônia,

pesadelos, astenia e disfunção sexual (impotência) (HOFFMAN e LEFKOWITZ 1996). Os principais fármacos utilizados são: propranolol, atenolol, e metoprolol.

Bloqueadores α_1 -adrenérgicos: apresentam baixa eficácia como monoterapia, devendo ser utilizados em associação com outros anti-hipertensivos. Podem induzir o aparecimento de tolerância farmacológica, que leva ao ajuste crescente de doses. Têm a vantagem de propiciar discreta melhora do metabolismo lipídico e dos sintomas da hipertrofia prostática (SMITH e ASHIYA, 2007). Os efeitos indesejáveis mais comuns são: hipotensão postural (mais evidente com início do tratamento), palpitação e, eventualmente, astenia. Dentre os fármacos utilizados estão: doxazosina, prazosina, terazosina.

Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA): o mecanismo de ação dessas substâncias é fundamentalmente dependente da inibição da enzima conversora de angiotensina, bloqueando, assim, a clivagem do decapeptídeo, angiotensina I em angiotensina II (octapeptídeo) no sangue e nos tecidos, levando a vasodilatação das arteríolas. São eficazes como monoterapia no tratamento da HA (RITTER, 2011). Entre os efeitos indesejáveis, destaca-se tosse seca (aproximadamente 10% dos pacientes), alteração do paladar e reações de hipersensibilidade (erupção cutânea). O angioedema constitui um efeito adverso raro, porém grave e potencialmente fatal. Seu uso é contra-indicado na gravidez porque pode provocar malformações fetais. Assim, o emprego deve ser evitado em adolescentes e mulheres jovens em idade fértil e que não façam uso de método anticoncepcional (RITTER, 2011). Entre alguns inibidores da ECA estão disponíveis para o tratamento da HA: captopril; enalapril; lisinopril e ramipril.

Antagonistas do receptor da angiotensina II: esses fármacos antagonizam a ação da angiotensina II por meio do bloqueio específico de seus receptores AT_1 . São eficazes como monoterapia no tratamento do paciente hipertenso. Apresentam bom perfil de tolerabilidade e os efeitos colaterais relatados são tontura e, raramente, reação de hipersensibilidade cutânea. As precauções para seu uso são semelhantes às descritas para os inibidores da ECA. Dentre as principais preparações disponíveis para uso clínico incluem-se: losartan, valsartan, irbersartan e candesartan.

Bloqueadores de canais de cálcio: inibem o influxo de cálcio nas células musculares lisas arteriais. Diltiazem e verapamil atuam como bloqueadores de canais de cálcio levando a redução do inotropismo cardíaco. Estes fármacos também produzem vasodilatação reduzindo a resistência vascular e conseqüentemente diminuem a pressão arterial. Os novos bloqueadores de cálcio (nicardipina, nisoldipina, felodipina e idradipina) não apresentam efeitos cardíacos e provocam apenas a vasodilatação. Este grupo de anti-hipertensivos apresenta efeitos colaterais importantes como cefaléia, edema em membros inferiores e constipação em idosos (SONKUSARE, 2006).

Vasodilatadores de ação direta: hidralazina, minoxidil, nitroprussiato de sódio e diazóxido são exemplos de fármacos desta classe. Podem ser utilizados na terapia ambulatorial ou em emergências hipertensivas. Atuam sob a musculatura da parede vascular, promovendo relaxamento muscular com conseqüente vasodilatação e redução da resistência vascular periférica. Em conseqüência da vasodilatação arterial direta, promove retenção hídrica e taquicardia reflexa, o que contra-indica o uso destes fármacos como monoterapia, devendo ser utilizada associada a diuréticos e/ou betabloqueadores.

Contudo, os vasodilatadores de ação direta são os medicamentos de escolha nas emergências hipertensivas. Na emergência hipertensiva, a crise é acompanhada de sinais que indicam lesões em órgãos-alvo em progressão, tais como encefalopatia hipertensiva, acidente vascular encefálico, edema agudo de pulmão, infarto do miocárdio e evidências de hipertensão maligna ou de dissecação aguda da aorta. Nesses casos, há risco iminente de vida ou de lesão orgânica irreversível, e os pacientes devem ser hospitalizados e submetidos a tratamento com vasodilatadores de uso endovenoso, tais como nitroprussiato de sódio ou hidralazina. Depois de obtida a redução imediata dos níveis de pressão, deve-se iniciar a terapia anti-hipertensiva de manutenção e interromper a medicação parenteral (ZAMPAGLIONE et al, 1996).

Então, os vasodilatadores diretos disponíveis atuam promovendo o relaxamento da musculatura lisa arteriolar, diminuindo assim a resistência vascular sistêmica. Porém, a diminuição da resistência arterial e da PA média

evocam respostas compensatórias mediadas por barorreceptores, pelo sistema nervoso simpático e pelo SRAA o que contra-indica o uso em monoterapia (III CONSENSO BRASILEIRO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL).

Sendo assim, ainda há interesse na investigação e desenvolvimento de novos vasodilatadores diretos que apresentem efeitos benéficos em monoterapia e reduza os efeitos adversos inerentes desta classe de fármacos disponíveis hoje no mercado.

1.2 Hipertensão arterial pulmonar (HAP)

A HAP é uma doença grave das artérias pulmonares. A medida que se desenvolve, reduz o fluxo sanguíneo através das mesmas e o lado direito do coração é mantido sob pressão crescente. Esta situação conduz a maioria dos sintomas da HAP - falta de ar, desconforto torácico, capacidade de exercício limitada e fadiga (RUBIN, 1997).

A HAP, então, é uma síndrome caracterizada pelo aumento progressivo da resistência vascular pulmonar que leva a sobrecarga ventricular direita e, eventualmente, a falência ventricular direita e morte prematura (GAINÉ e RUBIN, 1998). O aumento da resistência vascular pulmonar está relacionado com alterações progressivas nas arteríolas pulmonares devido a vasoconstrição e o remodelamento obstrutivo da parede dos vasos pulmonares pela proliferação nas várias camadas da parede dos vasos sanguíneos (FIRTH, MANDEL e YUAN 2010).

As características histológicas principais incluem hipertrofia da túnica média, espessamento da túnica íntima, espessamento da adventícia, lesões plexiformes e trombose in-situ (Figura 1). A lesão plexiforme representa uma proliferação focal das células musculares lisas e do endotélio e é um sinal patognomônico da HAP.

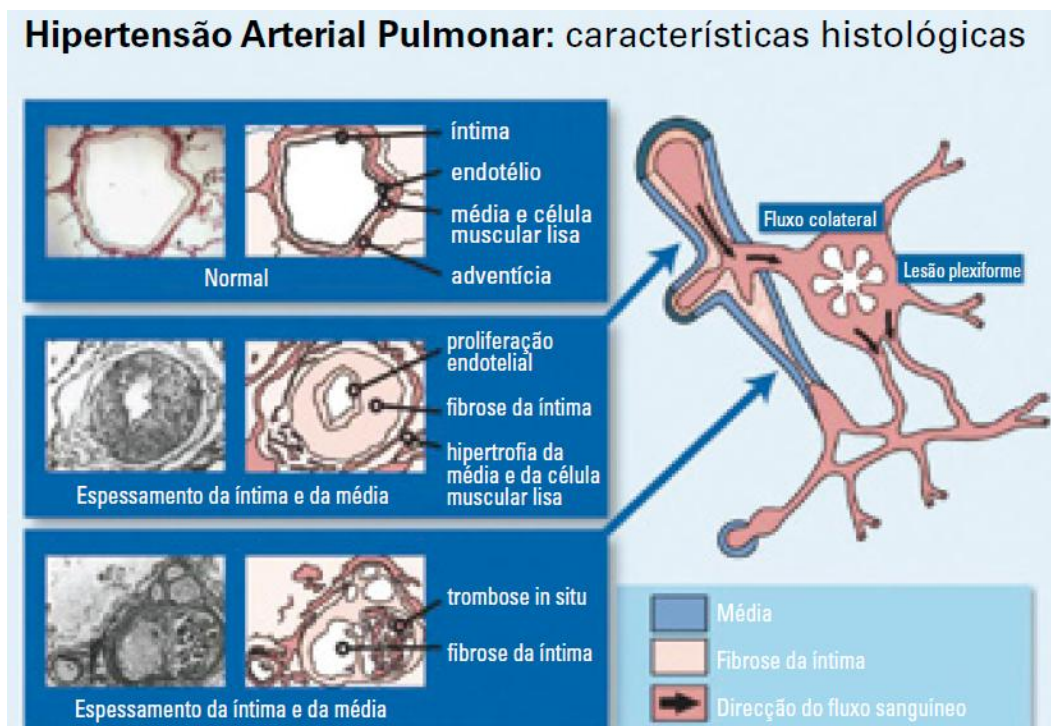


Figura 1. Características histológicas da HAP. Disponível em: < http://www.hap.info.com.pt/assets/Brochura_HAP.pdf > Acesso em: 20/01/2014.

A HAP é definida hemodinamicamente por uma pressão arterial pulmonar média > 25 mm Hg em repouso ou > 30 mm Hg durante o exercício, determinada através de cateterismo do ventrículo direito (HUMBERT, SITBON e SIMONNEAU, 2004; GAINE e RUBIN, 1998).

1.2.1 Classificação da HAP

A HAP pode ser classificada em I, II, III e IV (RICH, 1998) segundo a classe funcional (Tabela 8) e, ainda, classificada etiologicamente em idiopática, familiar ou relacionada a diversas condições como uso de anorexígenos, doenças do tecido conjuntivo, doenças cardíacas congênitas, hipertensão porta, infecção por HIV, esquistossomose (HUMBERT, SITBON e SIMONNEAU, 2004).

Tabela 8. Classificação funcional da HAP.

Classes	Limitação à atividade física	Sintomatologia
I	Paciente com HP sem limitação à atividade física	Atividade física não causa dispnéia, dor torácica, cansaço ou síncope
II	Paciente com HP com leve limitação à atividade física	Paciente confortável no repouso. Atividade física corriqueira causa dispnéia, dor torácica, cansaço ou "quase" síncope
III	Paciente com HP com marcada limitação à atividade física	Paciente confortável no repouso. Toda e qualquer atividade física causa dispnéia, dor torácica, cansaço ou "quase" síncope
IV	Paciente com HP incapaz de qualquer atividade física sem sintomatologia	Pacientes com sinais de ICD. Dispnéia e/ou fadiga podem estar presentes ao repouso. Desconforto é aumentado por qualquer atividade física

Fonte: RICH, 1998.

Entre as formas de hipertensão pulmonar mais estudadas encontra-se a hipertensão arterial pulmonar idiopática, doença rara com incidência de 1 a 2 casos/milhão por ano (RUNO e LOYD, 2003).

O diagnóstico etiológico é feito através da anamnese, do exame clínico e de exames complementares, entre os quais se incluem ecocardiografia tomografia computadorizada, ressonância magnética, cintilografia pulmonar. A HAP não tem cura, sendo a doença progressiva, com prognóstico reservado e necessidade de tratamento pelo resto da vida. No caso da hipertensão arterial pulmonar idiopática (HAPI), na ausência de tratamento específico, a sobrevivência média após o início dos sintomas em um, três e cinco anos é de 68%, 48% e 34% respectivamente (D' ALONZO et al, 1991). Entretanto, se o paciente estiver em classe funcional IV, a sobrevivência média é de apenas seis meses (D' ALONZO et al, 1991) (Figura 2).

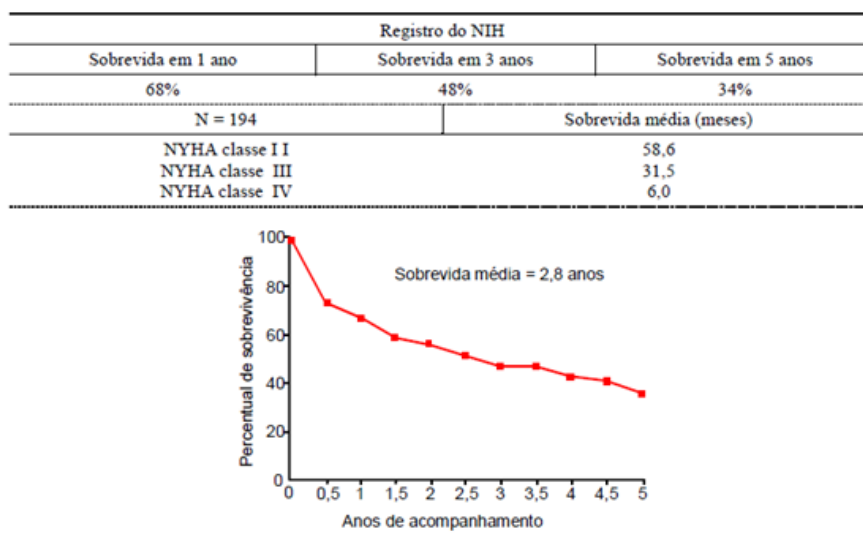


Figura 2. Expectativa de vida dos pacientes com HAPI de acordo com a classe funcional (D'ALONZO et al, 1991).

1.2.2 Fisiopatologia da HAP

A HAP é uma síndrome clínica e hemodinâmica, que resulta no aumento da resistência vascular na pequena circulação, em geral por mecanismos mistos, envolvendo vasoconstrição e remodelagem da parede arterial, levando ao aumento da pressão arterial pulmonar e aumento da pressão no ventrículo direito (VD), o que proporciona hipertrofia e falência ventricular direita (HUMBERT, SITBON e SIMONNEAU 2004; RUBIN, 1997).

1.2.2.1. Remodelagem da parede arteriolar

A integridade do endotélio é essencial à regulação do tono vascular e estrutura dos vasos, do fluxo sanguíneo, da perfusão tissular e à proteção contra espasmo, trombose e aterogênese.

O remodelamento vascular pulmonar é caracterizado pelo espessamento das três camadas que compõem a parede vascular, a túnica íntima (camada mais interna que consiste basicamente de uma camada de células endoteliais e de uma lâmina elástica subendotelial fenestrada e tecido conectivo), a túnica média (camada intermediária constituída de células musculares lisas e fibras elásticas finas e ocasionais), e a túnica adventícia (camada mais externa constituída de tecido conectivo e fibroblastos,

interrompida por fibras elásticas e por fibras nervosas) (MANDEGAR, REMILLARD e YUAN, 2002). Dessa forma, o espessamento vascular ocorre devido à hipertrofia (crescimento celular) e à hiperplasia (proliferação celular) das células constituintes das três camadas do vaso. Estas alterações então são observadas nas células musculares lisas, nos fibroblastos e nas células endoteliais; e também ocorre aumento da deposição de componentes da matriz extracelular, como colágeno, elastina e fibronectina (JEFFERY e WANSTALL, 2001). O remodelamento vascular pulmonar também ocorre devido à diferenciação de células precursoras em células do músculo liso vascular (MEYRICK e REID, 1980). Todas essas alterações são características da estrutura vascular de humanos com HAP e de modelos animais da doença (JEFFERY e WANSTALL, 2001).

O comportamento alterado do endotélio na HAP se caracteriza pela perda da capacidade de sintetizar vasodilatadores, inibidores da agregação plaquetária e antimitogênicos, como a prostaciclina e o óxido nítrico, associada ao aumento na expressão e secreção (endotelial e plaquetária) de potentes vasoconstritores e indutores de crescimento celular como o tromboxano A2 e a endotelina-1 (MCLAUGHLIN et al, 2002). Na disfunção endotelial, ocorre predomínio dos fatores contráteis, induzindo aumento da resistência vascular periférica e hipertrofia/hiperplasia da parede vascular. O aumento na produção de tromboxano A2, um vasoconstritor, bem como a produção deficiente de prostaciclina, vasodilatador, são achados em pacientes com a forma idiopática da HAP (MCLAUGHLIN et al, 2002). Um outro exemplo desse desequilíbrio, relacionado à disfunção endotelial, é a demonstração de expressão reduzida da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), e expressão aumentada de endotelina-1 (ET-1), um potente vasoconstritor.

Dentre os fatores de crescimento e seus receptores, a superfamília TGF- β (*transforming growth factor*) é de especial relevância na gênese da HAP, pois exerce papel importante em processos fisiológicos de inflamação, imunidade e diferenciação e proliferação celular. A superfamília TGF- β é composta por mediadores multifuncionais, incluindo TGF- β e BMP (*bone morphogenetic proteins*). Estudos demonstram que pacientes com a forma idiopática da HAP apresentam alteração no receptor tipo 2 do BMP (BMPR2), mais precisamente

mutações no gene que o codifica e que está localizado no cromossomo 2q33 (LANE et al, 2000) O BMPR2 liga-se a citocinas como TGF- β , BMP, ativina, inibina e outros fatores de crescimento e diferenciação. Ele exerce sua função de sinalização através da formação de um complexo heterodimérico na superfície celular, juntamente com o receptor do tipo 1. Ao ser ativado, este complexo inicia a sinalização dentro da célula através de enzimas específicas, conhecidas como Smad. Este sinal é translocado até o núcleo, onde irá regular a transcrição de genes proliferativos. Mutações no BMPR2 causariam sinalização deficiente, acarretando a perda de mecanismos antiproliferativos, por exemplo, na circulação pulmonar. Já foi demonstrado que o BMPR2 tem sua expressão drasticamente reduzida na circulação pulmonar em pacientes com HAP idiopática, até mesmo nos indivíduos que não apresentam mutações deste receptor (CHRISTMAN et al, 1992).

O NO, um vasodilatador derivado do endotélio, também tem ação antiproliferativa na musculatura lisa vascular (GILLESPIE et al, 1989), possivelmente ligada à geração de GMPc intracelular. Tem sido cogitado que inibidores da enzima fosfodiesterase tipo 5 (que degrada GMPc) poderiam atuar sobre o remodelamento vascular pulmonar induzido por hipóxia (WALFORD e LOSCALZO, 2003). Esta ação protetora do GMP cíclico estaria relacionada à via das MAPP quinases e à inibição do fator de transcrição AML1 (*acute myelogenous leukemia*) (RABINOVITCH, 1999).

A prostaciclina, é um eicosanóide derivado do ácido araquidônico, que é liberado dos fosfolípidos da membrana endotelial por fosfolípases ativadas, A2 e C. Por ação da enzima ciclooxigenase formam-se os endoperóxidos cíclicos PGG2 e PGH2. Este, por ação da prostaciclina sintase, origina nas células endoteliais a prostaciclina que é um potente vasodilatador e inibidor da adesão plaquetária e crescimento celular. A estimulação dos receptores de prostaciclina nas células musculares lisas provoca ativação da adenilato ciclase, induzindo aumento de AMPc e estimulação da PKA na musculatura lisa vascular (POHL, BRESSE e BASSENNGE, 1986). Além disso, a prostaciclina inibe o efeito da endotelina-1 (ET-1). Pacientes com HAP apresentam síntese e excreção urinária diminuídas da prostaciclina (TUDER et al, 1999).

A ET-1 é um potente vasoconstritor produzido, predominantemente, pela célula endotelial, com ação mitogênica, inflamatória e de proliferação sobre a célula muscular lisa. Apesar de não existir estoques intracelulares de ET-1, estímulos específicos induzem sua síntese e secreção em minutos (Figura 3). Há dois tipos de receptores de endotelina: ET_A (encontrados em células musculares lisas e miócitos cardíacos) e ET_B (encontrados em células endoteliais e musculares lisas). A ligação da ET-1 aos seus receptores ativa enzima fosfolipase C, aumentando os níveis intracelulares de cálcio, o que resulta em vasoconstrição prolongada. O diacil-glicerol, produzido a partir da fosfolipase C ativada, estimula a proteína quinase C, enzima mediadora da ação mitogênica da ET-120. Outros efeitos relevantes da ET-1 são a estimulação da produção de citocinas e fatores de crescimento (AGUI et al, 1994), a indução da formação de proteínas da matriz extracelular (PEIFLEY e WINKLESS, 1998) e a potencialização dos efeitos do TGF- β e PDGF. Estudos em pulmões de ratos normais demonstraram níveis de RNAm da ET-1 cinco vezes maiores se comparados com qualquer outro órgão (MATSUMOTO et al, 1989). Em condições normais, os pulmões retiram ET-1 da circulação. Na HAP, os pulmões sintetizam ET-1 em quantidades aumentadas, o que resulta em aumento dos níveis circulantes, com implicações prognósticas (GALIÈ et al, 1996). Nessas condições, a circulação pulmonar passa a ser alvo desse peptídeo.

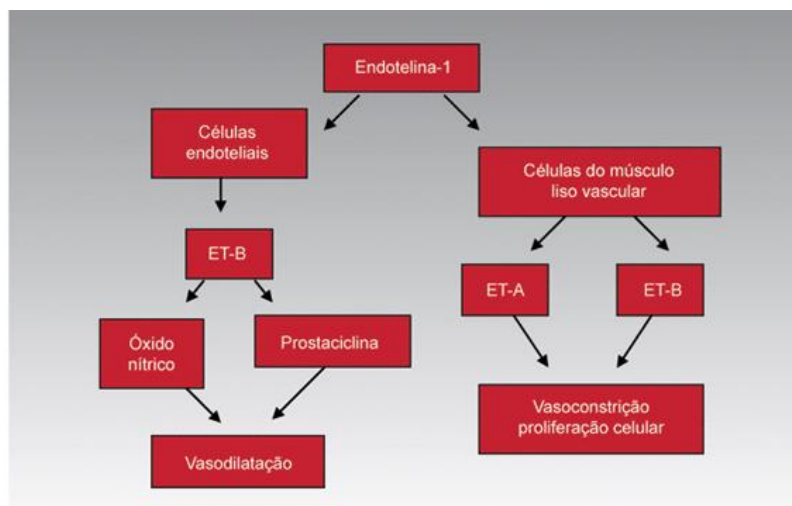


Figura 3. Ação da endotelina pelos receptores ET-B nas células endoteliais causando vasodilatação e pelos receptores ET-A e ET-B nas células do músculo liso vascular causando vasoconstrição.

1.2.2.2. Vasoconstrição

A maioria dos eventos que levam à vasoconstrição na HAP, em última análise, fazem-no através do aumento de cálcio nas células musculares lisas vasculares. O aumento do tônus vascular na pequena circulação é comumente avaliado em modelos de HAP que leva a vasoconstrição pulmonar. A redução na tensão alveolar de oxigênio promove uma elevação rápida e reversível da resistência vascular pulmonar, que se inicia com menos de um minuto, revertendo rapidamente com a normalização das condições de oxigenação (ARCHER et al, 2004).

A vasoconstrição das arteríolas pulmonares ocorre através da inibição de vários canais de potássio, designados por Kv, seguida de despolarização da membrana celular e entrada de cálcio através dos canais tipo L. Nas artérias pulmonares, ocorre uma resposta vasoconstritora frente a hipóxia. Porém, sistemicamente, ocorre uma resposta vasodilatadora frente à hipóxia por um mecanismo pouco elucidado (WARD, SNETKOV e AARONSON, 2004). Além disso, há evidências de que os canais de cálcio tipo L possam ser diretamente influenciados pela hipóxia. A vasoconstrição das artérias pulmonares é, em condições normais, um mecanismo adaptativo com a finalidade de equilibrar a ventilação e a perfusão, restringindo o fluxo sanguíneo em áreas pouco ventiladas em favor de áreas de melhor ventilação (WARD, SNETKOV e AARONSON, 2004).

Uma teoria complementar para a vasoconstrição pulmonar por hipóxia sugere a participação de mecanismos “redox” na célula muscular lisa. Em condições normais, a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelas mitocôndrias manteria um “estado oxidado” dos canais de potássio, que permaneceriam abertos. Durante a hipóxia, o transporte de elétrons mitocondrial está reduzido, bem como a geração de ERO. O consequente “estado reduzido” do citosol resultaria na inibição dos canais de potássio e despolarização da membrana celular (MANDEGAR, REMILLARD e YUAN, 2002).

Uma característica particular em pacientes com a forma idiopática da HAP é a redução no número de canais de potássio. Alterações nestes canais foram encontradas em células musculares lisas destes pacientes, mas não em

outras formas de HAP. Comparando-se indivíduos normais com portadores de HAS, HAP associada a outras doenças e HAP idiopática, verificou-se que as células musculares lisas deste último grupo apresentaram expressão reduzida de subunidades dos canais Kv (YUAN et al, 1998). Isto acarretaria um decréscimo nas correntes de potássio, permitindo a entrada de cálcio e vasoconstrição pulmonar sustentada.

1.2.3 Tratamento farmacológico da HAP

O tratamento da HAP consiste em medidas gerais e específicas. As medidas gerais incluem tratamento da insuficiência cardíaca, uso oral de anticoagulantes, oxigênio nos casos de hipoxemia, profilaxia de infecções das vias aéreas através de vacinas antipneumocócica e antigripal.

O tratamento específico da HAP visa diminuir a pressão pulmonar e a melhora do débito cardíaco, a fim de aumentar a expectativa e a qualidade de vida dos pacientes.

Atualmente, os fármacos mais utilizados na clínica para o tratamento específico da HAP são: bloqueadores de canal de Ca^{2+} , análogos de PGI_2 , antagonistas do receptor de endotelina, inibidores de fosfodiesterase 5 (PDE5) (BALIGA, MacALLISTER e HOBBS, 2011).

Bloqueadores do canal de Ca_L , como nifedipina, diltiazem e anlodipina, podem ser eficazes em reduzir a pressão arterial pulmonar de pacientes responsivos ao tratamento. Entretanto, somente 10 - 15 % dos pacientes com HAP se enquadram nessa categoria (BALIGA, MacALLISTER e HOBBS, 2011). As doses de antagonistas do Ca^{2+} utilizadas na HAP são maiores em relação às doses utilizadas para tratar HAS, embora a dose e a tolerância possam variar entre os pacientes (GAINE e RUBIN, 1998). Pacientes que respondem à terapia apresentam taxa de sobrevivência de 94 %, enquanto que os pacientes que não respondem apresentam sobrevivência de 55 % (SITBON et al, 2005).

Análogos de PGI_2 são utilizados com o objetivo de mimetizar os efeitos benéficos, vasodilatador e anti-proliferativo, desse prostanóide derivado do ácido araquidônico. Atualmente, epoprostenol, iloprost, trepostinil e beraprost

são utilizados no tratamento clínico de pacientes com HAP (BALIGA, MacALLISTER e HOBBS, 2011). Porém, o epoprostenol só pode ser administrado cronicamente por via venosa central. Possui meia vida curta, o que obriga que a administração do fármaco seja realizada de forma contínua, com o uso de bomba de infusão. O treprostinil por ser um análogo mais estável pode ser administrado continuamente no tecido subcutâneo, sendo uma das alternativas ao epoprostenol. Utiliza-se bomba de microinfusão para a administração do fármaco. Já o Iloprost está entre as alternativas à infusão contínua intravenosa de epoprostenol. É um análogo da prostaciclina administrado por via inalatória. Após a administração, a duração da ação é de aproximadamente 30 minutos a 1 hora (DE WET et al, 2004) .

Antagonistas do receptor de endotelina-1 também têm sido utilizados no tratamento da HAP. Estes melhoram a hemodinâmica pulmonar e redução dos sintomas da doença (WILLIAMSON et al, 2000). A endotelina-1 exerce efeito vasoconstritor e mitogênico ao ativar receptores ET_A e ET_B nas células do músculo liso vascular, enquanto que a ativação de receptores ET_B nas células endoteliais estimula a produção de NO e PGI_2 . Os antagonistas não seletivos dos receptores de endotelina ET_A e ET_B , como bosentan, ambrisentan ($ET_A > ET_B$) e sitaxsentan ($ET_A \gg ET_B$) têm sido utilizados em pacientes com HAP (BALIGA, MacALLISTER e HOBBS, 2011).

Inibidores de PDE5 representam outra classe terapêutica para o tratamento da HAP, uma vez que essa isoforma é abundante em vasos pulmonares e sua expressão e atividade estão aumentadas na HAP (MURRAY, MacLEAN e PYNE, 2002; SEBKHI et al, 2003). PDE são enzimas que catalisam a degradação dos segundos mensageiros AMP_c e/ou GMP_c . Os inibidores de PDE exercem efeitos benéficos como vasodilatação, inibição da proliferação e prevenção da agregação plaquetária (BENDER e BEAVO, 2006). A inibição de PDE5, que metaboliza GMP_c exclusivamente, reduz a pressão arterial sistêmica e pulmonar em animais e em humanos (JACKSON et al, 1999). O inibidor de PDE5 sildenafil é o fármaco de primeira escolha para a HAP, seguido do tadalafil, que também foi aprovado como terapia (GALIE et al, 2009).

A inalação de gás NO reduz a pressão arterial pulmonar e melhora a oxigenação em diversas formas de HAP. Entretanto, o tratamento prolongado

com NO inalado é complicado devido ao desenvolvimento de metahemoglobinemia e ao agravamento da HAP quando a terapia é descontinuada (ICHINOSE, ROBERTS e ZAPOL, 2004).

Os tratamentos utilizados na clínica atualmente melhoram os sintomas, reduzem a gravidade das alterações hemodinâmicas, retardam a progressão da doença e melhoram o prognóstico (BALIGA, MacALLISTER e HOBBS, 2011). Entretanto, a mortalidade continua elevada e a deterioração gradual implica na necessidade de transplante de pulmão (UMAR et al, 2010). Dessa forma, a busca de novos alvos terapêuticos e o desenvolvimento de novos fármacos têm sido de grande interesse clínico, visando encontrar melhores opções de tratamento.

1.2.4 Novas estratégias terapêuticas para o tratamento da HAP

Sabendo que a endotelina-1 exerce efeito vasoconstritor e mitogênico ao ativar receptores ET_A e ET_B nas células do músculo liso vascular, o macitentan, também chamado de ACT-064992, apresentou efeito benéfico em pacientes com HAP como antagonista dos receptores ET-1 com alta da potência e elevada lipofilicidade (IGLARZ et al, 2008).

Uma alternativa para a redução do nível de GMP_c observado na HAP, seria o tratamento com os doadores de NO e ativadores da guanilato ciclase (BALIGA, MacALLISTER e HOBBS, 2011). O trinitrato de glicerina, um doador de NO, reduziu a pressão arterial pulmonar de pacientes com HAP, quando administrado por inalação (GOYAL et al, 2006). Já os ativadores da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) também têm apresentado efeitos favoráveis na HAP, devido ao aumento dos níveis de GMP_c nas artérias pulmonares. O ativador da GCs, riociguat foi avaliado em estudo clínico de fase II para determinação da eficácia clínica na HAP e apresentou efeitos benéficos (GHOFRANI et al, 2010).

O aumento do GMP_c tecidual em resposta à ativação de receptores de peptídeos natriuréticos (RPN) promove efeitos benéficos na HAP, como vasodilatação, efeitos anti-hipertrófico e anti-proliferativo (KLINGER et al, 1998). Entretanto, a meia-vida plasmática curta e a baixa biodisponibilidade oral os tornam fracos candidatos à terapia farmacológica. Com isso, uma

estratégia para aumentar os níveis de peptídeos natriuréticos endógenos consiste na inibição da enzima endopeptidase neutra (EPN), a principal via de degradação de peptídeos natriuréticos na circulação. Essa estratégia foi eficaz em modelo animal de HAP induzida por hipóxia (KLINGER et al, 1993).

Diversos fatores de crescimento como o fator de crescimento derivado de plaqueta (FCDP), fator de crescimento de fibroblasto (FCF) e fator de crescimento do endotélio vascular (FCEV) têm sido associados a proliferação celular anormal na HAP (IZIKKI et al, 2009). Esses fatores de crescimento agem como mitógenos potentes através da ativação do receptor tirosina-quinase (RTK), ativando diversas vias de proliferação e migração celular (BALIGA, MacALLISTER e HOBBS, 2011). Alguns inibidores do RTK como imatinibe, sunitinibe e sorafenibe mostraram-se eficazes em modelos animais de HAP (KLEIN et al, 2008).

O inibidor da Rho-quinase (ROCK) fasudil também apresentou efeitos benéficos em modelos animais de HAP (MOUCHAERS et al, 2010). ROCK medeia vasoconstrição e proliferação de células do músculo liso vascular e sua inibição promove redução dos sintomas da HAP (FUKUMOTO, TAWARA e SHIMOKAWA, 2007) (Figura 4).

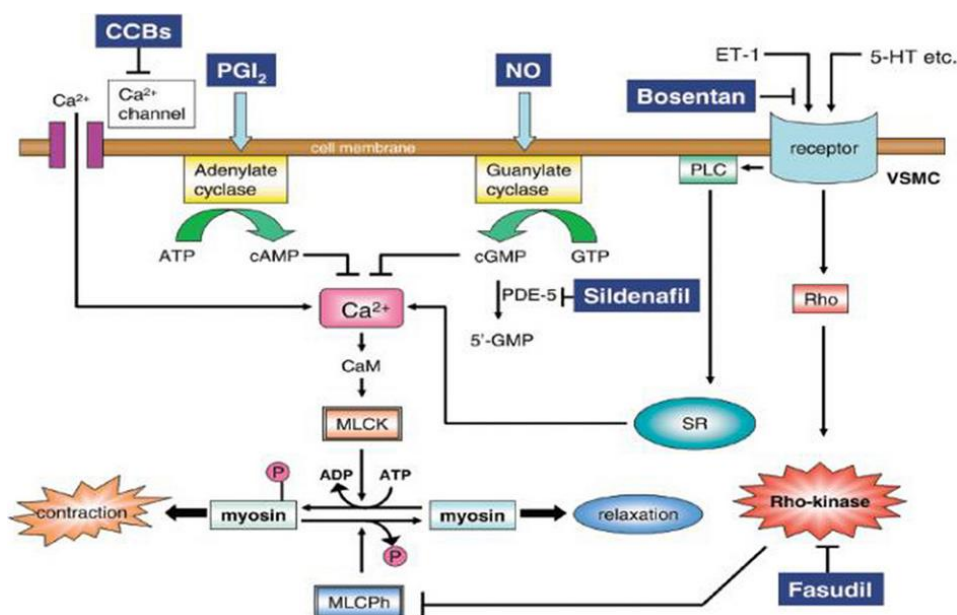


Figura 4. Mecanismo vasodilatador das artérias pulmonares em resposta aos fármacos convencionais utilizados no tratamento da HAP e ao inibidor de Rho-quinase. 5-HT, serotonina; CaM, calmodulina; CCBs, bloqueadores de canais de cálcio; ET-1, endotelina-1; MLCK, cadeia leve da miosina cinase; MLCP, cadeia leve da miosina fosfatase; NO, óxido nítrico; PDE-5, fosfodiesterase-5; VSMC, músculo liso vascular; PGI₂, prostaciclina; PLC, fosfolipase C; SR, retículo sarcoplasmático (FUKUMOTO, TAWARA e SHIMOKAWA, 2007).

A serotonina (5-HT), além de promover efeitos mitogênicos que levam ao remodelamento vascular pulmonar, também é um potente vasoconstritor, cujos níveis plasmáticos estão aumentados na HAP (HERVÉ et al, 1995). Já foram descritos os efeitos anti-proliferativos promovidos pela inibição do seu transportador (5-HTT ou SERT) em modelos animais de HAP (ZHU et al, 2009). Antagonistas de receptores 5-HT_{2B} apresentaram efeitos promissores no tratamento de pacientes com HAP (BALIGA, MacALLISTER e HOBBS, 2011).

Canais iônicos presentes nas células do músculo liso vascular também constituem alvos importantes para o tratamento da HAP. Como a expressão de canais K_v1.5 está reduzida na HAP, esse canal é um possível alvo para novos fármacos, uma vez que sua ativação promove hiperpolarização, vasodilatação e indução da apoptose (BALIGA, MacALLISTER e HOBBS, 2011). Além disso, o bloqueio de canais TRPC6 também representa um novo possível alvo, já que sua expressão e atividade estão aumentadas na HAP, levando ao influxo de Ca²⁺ excessivo nas células musculares lisas de artérias pulmonares (YU et al, 2004).

Finalmente, ativadores do canal K_{ATP} , como a iptakalina, também representam uma nova estratégia terapêutica contra a HAP, devido aos efeitos vasodilatador e anti-proliferativo (XIE et al, 2004; ZHU et al, 2008).

E por ainda não existir um tratamento ideal, a procura por novas terapias continua sendo de grande importância para os pacientes. A partir disto, a colaboração entre o Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Instituto de Ciências Biomédicas e do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio[®]) vem possibilitando cada vez mais a identificação de novas substâncias com perfil vasodilatador, as quais poderão futuramente ser candidatos a novos fármacos para o tratamento da HA e da HAP. O LASSBio[®] sintetizou a molécula protótipo, 3,4-metilenodioxibenzoil-2-tienilidrazona (LASSBio-294) com propriedade vasodilatadora (SILVA, NOEL e BARREIRO, 2002) e desde então modificações estruturais foram feitas, originando novos derivados a fim de otimizar esta propriedade farmacológica e reduzir os efeitos adversos.

1.3 Desenvolvimento do derivados N-acilidrazônico hereoaromático

A substância protótipo bioativa LASSBio-294, pertence à classe das *N*-acilidrazonas e foi sintetizada a partir do safrol, um produto natural brasileiro, obtido do óleo de sassafrás (*Ocotea pretiosa*) (LIMA et al, 2000) como matéria-prima. A substituição do anel fenila pelo isómero tiofeno em padrões *N*-acilidrazônicos (BARREIRO et al, 2002) originou o LASSBio-294. A introdução da subunidade *N*-acilidrazônica para originar a estrutura LASSBio-294 foi proposta considerando sua relação bioisostérica com o grupamento piridazinônico, presente na estrutura de vários inibidores seletivos de fosfodiesterases (PDE) do tipo 4 e 3, responsáveis pela degradação seletiva de nucleotídeos cíclicos (PIAZ, GIOVANNONI e CASTELLANA, 1997).

LASSBio-294 foi descrito como um potente vasodilatador mediado possivelmente através da ativação de receptores A_{2A} de adenosina pois através de ensaios de competição com radioligantes realizado pelo CEREP, LASSBio-294 deslocou 57%, o ligante seletivo radiomarcado [³H]CGS21680 dos receptores A_{2A} de adenosina.

Sendo assim, na tentativa de se identificar agentes vasodilatadores mais potentes, foram feitas alterações na estrutura da molécula protótipo, ilustrado na figura 5, gerando vários derivados, dentre eles, o (*E*)-*N'*-(benzo [d] [1,3] dioxola -5- metileno) tiofeno-2-carbozihidrazida (LASSBio-1027) (LEAL et al, 2012).

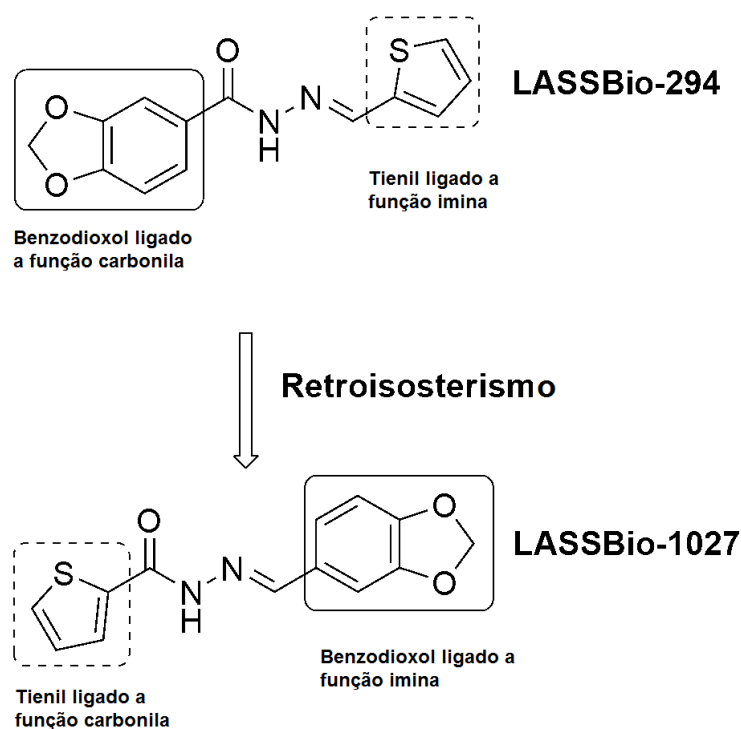


Figura 5. Estrutura química do derivado *N*-acilidrazônico heteroaromático LASSBio-1027 (LEAL et al, 2012).

O LASSBio-1027 é um retro-isómero do LASSBio-294. Este sofreu uma inversão dos grupos funcionais ligados à subunidade *N*-acilidrazona como pode ser observado na Figura 5. O anel tiofeno ligado a função imina no LASSBio-294 encontra-se ligado a carbonila da subunidade *N*-acilidrazônica no LASSBio-1027. Já o anel 1,3 benzodioxola ligado a carbonila na molécula protótipo encontra-se ligado a função imina no derivado.

Uma forma para se identificar provável interação de LASSBio-1027 aos receptores A_{2A} de adenosina, foi através do protocolo de ancoramento molecular (docking) (TESCH, 2013). A figura 6 mostra o resultado obtido através da estrutura cristalográfica do subtipo A_{2A} (código PDB 3EML), utilizado

para o estudo de ancoramento molecular a fim de identificar possíveis interações do LASSBio-1027 para o receptor A_{2A} de adenosina.

No subtipo A_{2A} a subunidade *N*-acilidrazona de LASSBio-1027 realiza interações por ligação de hidrogênio com o resíduo Glu169 e interações de empilhamento π com o resíduo Phe168, enquanto a subunidade 1,3-benzodioxola realiza interações por ligação de hidrogênio com o resíduo Asn253. Ademais, a subunidade tiofenila de LASSBio-1027 realiza interações de empilhamento π com o resíduo His264 (Figura 6).

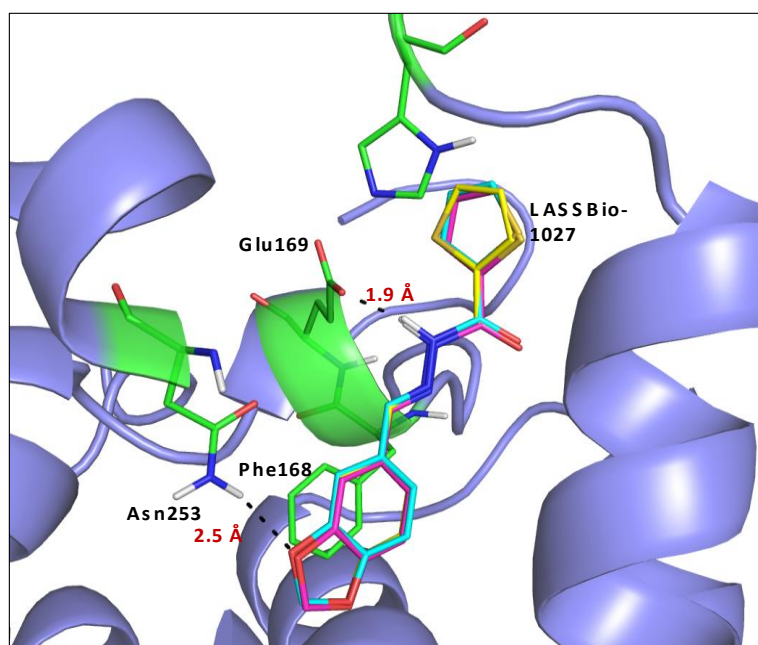


Figura 6. Possíveis conformações do composto LASSBio-1027 (amarelo, azul e vermelho) no receptor A_{2A} de adenosina (azul) (PDB ID: 3EML). Os resíduos de aminoácido em verde são partes da conformação ativa do receptor A_{2A}

O papel fisiológico da adenosina foi inicialmente investigado por Drury e Szent-Györgyi, que demonstraram que a mesma apresentava efeitos biológicos pronunciados como redução da pressão arterial, efeito inotrópico negativo e vasodilatação coronariana (HASKO e CRONSTEIN, 2004). Baseando-se nestes estudos iniciais, na atualidade, a adenosina é empregada na clínica para o tratamento de arritmias cardíacas, principalmente taquicardias supraventriculares (WILBUR e MARCHLINSKI, 1997).

A adenosina modula vários processos fisiológicos nos mamíferos cujas respostas são promovidas pela sua interação com receptores específicos localizados na membrana celular. A partir dos estudos farmacológicos e de biologia molecular, foi possível caracterizar quatro subtipos de receptores de adenosina denominados A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 (OLAH e STILES, 1995). Os subtipos A_1 e A_3 estão acoplados a proteína G inibitória, cuja ativação promove inibição da adenilato ciclase. Já os receptores A_{2A} e A_{2B} estão acoplados a proteína G excitatória cuja ativação promove estimulação da adenilato ciclase (OLSSON e PEARSON 1990).

A ativação do receptor A_{2A} promove diversos efeitos incluindo, vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e de neutrófilos além de reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio (LEAL et al., 2008; LEWIS et al., 1994; PRENTICE e HOURANI, 1996).

1.4 JUSTIFICATIVA

Os vasodilatadores diretos utilizados na clínica apresentam efeitos adversos indesejados, o que contra-indica o seu uso em monoterapia para o tratamento da HA. Além disso, tendo em vista que os fármacos utilizados para o tratamento da HAP melhoram a qualidade e aumentam a expectativa de vida do paciente porém não curam a doença, o presente estudo foi proposto com a finalidade de contribuir para o tratamento da HAS e da HAP através do desenvolvimento de um novo derivado *N*-acilidrazônico com mecanismo de ação vasodilatadora envolvendo a ativação dos receptores A_{2A} de adenosina.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho consiste na investigação de um novo candidato a fármaco vasodilatador para o tratamento da HAS e HAP que promova efeito através da ativação dos receptores A_{2A} de adenosina.

1.5.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito vasodilatador in vitro, em anéis de aorta de ratos Wistar;
- Investigar o mecanismo de ação do derivado no músculo liso vascular de ratos Wistar;
- Avaliar o efeito anti-hipertensivo durante tratamento prolongado em ratos Wistar Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertenso (SHR);
- Investigar a afinidade do LASSBio-1027 para o receptor de adenosina através do ensaio de competição com radioligantes;
- Avaliar a ação do LASSBio-1027 na melhora da hipertrofia ventricular direita decorrente da HAP induzida por monocrotalina em ratos;
- Avaliar a ação do LASSBio-1027 na melhora da disfunção vascular decorrente da HAP induzida por monocrotalina em ratos;
- Investigar o efeito do tratamento do LASSBio-1027 na melhora da HAP induzida por monocrotalina através do ecocardiograma.

2. Materiais e Métodos

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Ratos WKY, SHR e Wistar provenientes do biotério pertencente ao Laboratório de Farmacologia Cardiovascular foram mantidos em sala com temperatura (25°C) e umidade (50-60 %) controladas, em um ciclo de 12h/12h, claro/escuro. Água e ração foram disponibilizadas sem restrição.

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob o registro nº DFBCICB 013.

2.2 Substâncias

Fenilefrina, acetilcolina, glibenclamida, L-NAME e monocrotalina foram adquiridos da Sigma Chemical (St Louis, MO, USA). ZM241385 foi adquirido da Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA). Sulfóxido de dimetil (DMSO), eosina, entellan, sírius red F3BA: MERCK & Co, Inc. (Whitehouse Station, NJ, USA); éter etílico, NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, NaHCO₃, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, KH₂PO₄, dextrose, formaldeído, álcool etílico, xilol, ácido acético glacial, HCl, NaOH, ácido fosfomolibdico, ácido pícrico, óxido de mercúrio (II), sulfato de alumínio e amônio, hematoxilina: Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

LASSBio-1027, glibenclamida e L-NAME foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck Darmstadt, Germany).

2.3 Registro de tensão isométrica de músculo liso arterial

Ratos Wistar machos pesando entre 200 e 280 g foram anestesiados com éter etílico e então sacrificados por deslocamento da coluna cervical. A porção torácica da artéria aorta foi retirada, dissecada através da remoção do tecido conjuntivo externo e dividida em anéis de 2 a 3 mm de comprimento. Os anéis de aorta foram posicionados em duas garras metálicas no sentido transversal (Figura 7). A porção inferior foi fixada a uma haste na cuba

experimental e a superior conectada a um transdutor de força (FT 03) para registro de tensão isométrica.

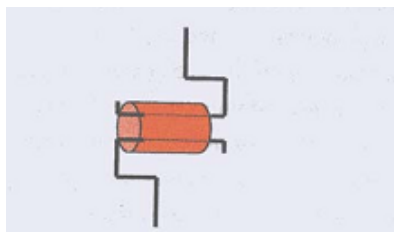


Figura 7: Representação esquemática de anel de aorta de rato posicionado em duas garras metálicas: a porção inferior fixa a uma haste na cuba experimental e a superior conectada a um transdutor de tensão

As cubas experimentais (Figura 8) foram preenchidas com 10 ml de solução Tyrode modificada constituída em (mM): NaCl, 123,0; KCl, 4,7; MgCl₂, 1,2; dextrose, 11,5; NaHCO₃, 15,5; CaCl₂, 1,2, continuamente borbulhadas com mistura carbogênica (95 % de O₂ e 5 % de CO₂) e mantidas a 37°C e pH 7,4.



Figura 8: Cubas verticais utilizadas para o registro de tensão isométrica

A tensão gerada foi digitalizada (Digidata 1322A) e os dados armazenados em computador para posterior análise utilizando o programa Axoscope 8.0 (Axon Instruments, Inc). Após estabilização das preparações por 120 minutos sob tensão de 1 g, foi iniciado o protocolo experimental. Com o objetivo de identificar a presença ou ausência de endotélio vascular, as preparações foram expostas ao agonista α_1 -adrenérgico, fenilefrina (10 μ M) e quando atingido o platô da contratatura, foi adicionada acetilcolina (10 μ M) que

promove relaxamento do vaso na presença de endotélio. Portanto, um relaxamento superior a 80% em resposta a acetilcolina indica a integridade do endotélio, enquanto que um relaxamento inferior a 10% indica uma eficiente remoção mecânica do endotélio. Após a determinação do teste de integridade do endotélio vascular, as preparações foram lavadas durante 30 minutos com a solução nutritora e uma nova contratatura foi induzida através da exposição a 10 μ M de fenilefrina. Após a estabilização da contratatura induzida pela fenilefrina, concentrações crescentes do LASSBio-1027 (1 a 300 μ M) foram adicionadas às preparações. Ao final do experimento, a reversibilidade do efeito farmacológico foi observada com a lavagem das preparações por 30 minutos, seguida de nova exposição à fenilefrina.

Para avaliação do mecanismo vasodilatador de LASSBio-1027, os anéis de aorta foram pré-incubados com L-NAME, inibidor da óxido nítrico sintase (100 μ M); glibenclamida, inibidor dos canais de potássio sensíveis a ATP (5 μ M); glibenclamida (5 μ M) + L-NAME (100 μ M); ZM 241385, antagonista seletivo dos receptores de adenosina do tipo A_{2A} (100 nM)

2.4 Avaliação do efeito anti-hipertensivo durante tratamento prolongado

Ratos WKY e SHR machos com 12 semanas de idade foram selecionados ao acaso para avaliação do efeito anti-hipertensivo *in vivo*. O tratamento foi realizado diariamente, com uma única dose diária, do derivado LASSBio-1027 por via intraperitoneal (10 mg/kg) ou oral (gavagem, 20 mg/kg) durante 14 dias consecutivos. A pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), além da frequência cardíaca (FC), foram medidas através do método indireto de forma não invasiva, na cauda do animal utilizando um pletismógrafo (modelo *LE 5001 Pressure Meter*). Os animais foram aclimatizados previamente no recipiente de contenção (conforme ilustrado na Figura 9), por um período de três dias e a média da PAS, PAD e PAM dos três dias do pré tratamento foi utilizada como controle da PA.

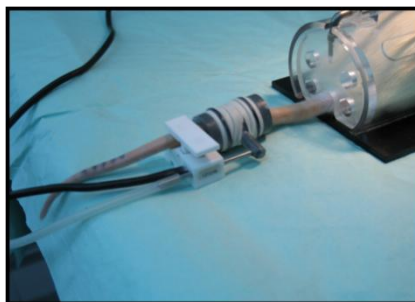


Figura 9. Medida da PA de forma não invasiva na cauda do animal.

Este recipiente permitiu a exteriorização da cauda do animal para que o manguito e o sensor de fluxo sanguíneo fossem posicionados na porção proximal da cauda. Antes da aferição da PA, os animais foram mantidos sob uma fonte de calor irradiante (cerca de 39° C) para produção de vasodilatação. As medidas foram feitas 24 horas após a administração do derivado.

2.5 Ensaio de competição com radioligantes

O ensaio de competição com radioligantes foi realizado pelo CEREP, o qual utilizou LASSBio-1027 (10 μ M) e os receptores/células humanos recombinantes. Células CHO expressaram o receptor A_1 e células recombinantes humanas HEK-293 expressaram os receptores A_{2A} e A_3 . Utilizou-se os agonistas radioligantes: [3 H]CCPA (1 nM) para A_1 , [3 H]CGS21680 (6 nM) para A_{2A} e [125 I]AB-MECA (0,15 nM) para o A_3 . Os dados foram expressos como porcentagem de inibição do controle específico de ligação obtido na presença do LASSBio-1027 através da equação: % inibição = 100 - [(medida da ligação específica / controle da ligação específica) x 100].

2.6 Modelo animal de hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina

Para investigar o efeito do derivado LASSBio-1027 na melhora da disfunção vascular e ventricular decorrente da HAP, a doença foi induzida através da administração de monocrotalina (MCT), um alcalóide presente na planta *Crotalaria spectabilis*, que produz lesão endotelial nas artérias pulmonares (THOMAS, 1998). Essa lesão leva a um remodelamento da parede dos vasos, maior resistência vascular pulmonar, e conseqüentemente hipertensão

pulmonar com hipertrofia ventricular direita. A MCT foi dissolvida em 1N HCl e tamponada em pH 7,4. MCT foi administrada em dose única de 60 mg/kg por via intraperitoneal em ratos Wistar. Após 14 dias da administração da MCT, iniciou-se o tratamento terapêutico com o derivado LASSBio-1027 por 14 dias consecutivos como mostrado na Figura 10. Os grupos experimentais (n = 6) foram os seguintes: 1. administração de salina no dia da indução da doença (grupo controle); 2. administração de MCT e tratado com salina (grupo MCT + salina); 3. administração de MCT e tratado com veículo (grupo MCT + DMSO); 3. administração de MCT e tratado com LASSBio-1027 em diferentes doses por via oral (gavagem) ou intraperitoneal.



Figura 10. Esquema representativo do protocolo experimental realizado no modelo de HAP. Monocrotalina (MCT) foi administrada em dose única i.p. 60 mg/kg para a indução da HAP em ratos. O tratamento terapêutico foi iniciado após 14 dias da indução da HAP. O tratamento terminou no 28º dia.

2.6.1 Medida da pressão sistólica do ventrículo direito

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg) por via intraperitoneal para a medida da pressão no ventrículo direito. Esta avaliação foi realizada através de punção direta no ventrículo direito utilizando-se um cateter venoso (scalp weplast 19G) preenchido com soro fisiológico heparinizado conectado a um transdutor de pressão calibrado (MLT884, AD Instruments, USA). A pressão ventricular foi registrada e armazenada no computador para posterior análise (Powerlab, AD Instruments, USA) utilizando o programa Lab Chart (7.0 Version, AD Instruments). Após a medida da pressão intracavitária, os ratos foram sacrificados para retirada do coração e pulmões a fim de realizar a análise histopatológica. Além disso, o coração foi pesado e dividido em duas partes: ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo

junto com o septo intraventricular (VE + S). A artéria pulmonar foi retirada para registro de tensão isométrica conforme descrito no item abaixo.

2.6.2 Registro de tensão isométrica de artérias pulmonares

Após medida da pressão sistólica do ventrículo direito, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical sob anestesia com pentobarbital sódico (40 mg/kg). A artéria pulmonar foi rapidamente retirada e transferida para uma pequena cuba contendo solução Tyrode modificada constituída de (mM): NaCl, 123; KCl, 4,7; MgCl₂, 1,2; KH₂PO₄, 1,2; dextrose, 11,5; NaHCO₃, 15,5; CaCl₂, 1,2. As artérias foram posicionadas em hastes experimentais dentro de cubas verticais preenchidas com 10 mL de solução Tyrode modificada continuamente borbulhada com mistura carbogênica (95% O₂/5% CO₂), e mantida à 37°C. Uma das extremidades da haste foi conectada a um transdutor de força (Grass FT 03, USA) para o registro de tensão isométrica. Os sinais gerados foram digitalizados (Digidata 1322, USA) e armazenados em computador para análise através do programa Axoscope (Axon Instruments, Inc, USA).

Após o período de estabilização da preparação de 180 minutos, avaliou-se a reatividade vascular da artéria pulmonar de animais com HAP. Estas preparações foram expostas a concentrações crescentes de fenilefrina (1 nM – 10 µM) que após a estabilização do platô da resposta contrátil máxima foram adicionadas concentrações crescentes de acetilcolina (1 nM – 10 µM) para avaliar a resposta vasodilatadora.

2.6.3 Análise morfométrica das arteríolas pulmonares

2.6.3.1. Coloração com hematoxilina-eosina

Após anestesia e sacrifício dos animais, os pulmões direito e esquerdo foram retirados e mantidos em solução de formaldeído 10 % em tampão-fosfato para fixação. Posteriormente, os tecidos foram desidratados em 3 banhos de álcool etílico (70, 90 e 100 %) por 30 min cada e em seguida, o material passou por 2 banhos de xilol por 30 min. A infiltração foi realizada em 2 banhos de parafina a 60°C para em seguida serem emblocados. O tecido foi então

seccionado em micrótomo (Lupe modelo MRP 03) em frações de 4 μm . As lâminas foram mantidas na estufa durante 20 min a 60°C e em seguida, passaram por três banhos de xilol para retirada da parafina. Os cortes foram hidratados em soluções com concentrações decrescentes de álcool (100, 95 e 70%) durante 5 min e um único banho de água destilada também por 5 min. Então os cortes histológicos foram colocados em solução de hematoxilina de Harris durante 5 min e lavados em água corrente por 5 min. Em sequência, o material passou rapidamente por um banho de álcool clorídrico 1%, usado para tornar nítida a diferença entre o citoplasma e o núcleo. Essas lâminas foram submetidas a um banho de eosina-floxina durante 1 min e, em seguida, lavadas em água corrente rapidamente e mergulhadas em água acética. As lâminas foram mergulhadas em xilol por três vezes durante 5 min e montadas em bálsamo de Entellan para observação em microscópio óptico (Zeiss – Axiostar-plus) com objetivas de 20 e 40 x. Com esta coloração, o citoplasma corou-se em tonalidade rósea e o núcleo em púrpura.

Em seguida, procedeu-se com a análise morfométrica das artérias pulmonares as quais foram fotografadas por uma câmera digital (modelo Canon Power Shot A 620/610) acoplada ao microscópio óptico (modelo Zeiss Axiostar plus). Utilizou-se aproximadamente 10 artérias pulmonares de cada lâmina (aumento de 40X) para avaliação da hipertrofia desses vasos. O diâmetro dessas artérias variou entre 30 e 100 μm . Foram calculadas a área interna (A_i) e a área externa (A_e), utilizando o programa ImageJ. A área da parede, em porcentagem, foi calculada através da seguinte fórmula: $[(A_e - A_i)/A_e] \times 100$ (ZUCKERBRAUN et al, 2009). Foi calculada a média da área da parede das artérias pulmonares da lâmina correspondente a um (01) animal e em seguida, obtida a média das diferentes lâminas ($n = 6$ por grupo).

2.6.3.2. Coloração de Gomori

Após anestesia e sacrifício dos animais, os pulmões direito e esquerdo foram retirados e mantidos em solução de formaldeído 10 % em tampão-fosfato para fixação. Posteriormente, os tecidos foram desidratados em 3 banhos de álcool etílico (70, 90 e 100 %) por 30 min cada e em seguida, o material passou por 2 banhos de xilol por 30 min. A infiltração foi realizada em 2 banhos de

parafina a 60°C para em seguida serem emblocados. O tecido foi então seccionado em micrótomo (Lupe modelo MRP 03) em frações de 4 µm. As lâminas foram mantidas na estufa durante 20 min a 60°C e em seguida, passaram por três banhos de xilol para retirada da parafina. Os cortes foram hidratados em água desionizada e, em seguida, colocados em solução de Bouin pré-aquecida a 56°C durante 15 minutos. Após, seguiu-se com a lavagem em água corrente para remoção da cor amarela das secções. Em sequência, corou-se com a solução de hematoxilina férrica de Weigert durante 5 minutos. Posteriormente, após lavagem em água corrente durante 5 minutos, corou-se em solução de coloração tricrômica durante 5 minutos. Por fim, colocou-se em ácido acético a 0,5% durante 1 minuto e lavou-se as lâminas. Estas foram mergulhadas em xilol por três vezes durante 5 min e montadas em bálsamo de Entellan para observação em microscópio óptico (Zeiss – Axiostar-plus) com objetivas de 20 e 40 x. Com esta coloração, foi possível a avaliação das fibras do tecido conjuntivo, musculares e colágenas. O procedimento descrito consistiu num sistema de apenas um só passo que combinou a coloração citoplásmica e da fibra conjuntiva numa solução de ácido fosfotúngstico/ ácido acético. As secções de tecido foram tratadas em solução de Bouin para intensificar a coloração final. Em seguida, procedeu-se à coloração dos núcleos com hematoxilina férrica de Weigert, seguida por corante ácido vermelho (coloração do citoplasma e as fibras musculares) e anilina azul (coloração das fibras de colágeno). A lavagem em ácido acético após a coloração tornou as tonalidades da cor mais delicadas e transparentes. Com esta coloração, os núcleos coram-se em preto, o citoplasma e tecido muscular em vermelho e as fibras colágenas em azul.

Em seguida, procedeu-se com a análise morfométrica das artérias pulmonares. As quais foram fotografadas por uma câmera digital (modelo Canon Power Shot A 620/610) acoplada ao microscópio óptico de luz (modelo Zeiss Axiostar plus). Utilizou-se aproximadamente 10 artérias pulmonares de cada lâmina (aumento de 40X) para avaliação da hipertrofia desses vasos. O diâmetro dessas artérias variou entre 30 e 100 µm. Foram calculadas a área interna (Ai) e a área externa (Ae), utilizando o programa ImageJ. A área da parede, em porcentagem, foi calculada através da seguinte fórmula: $[(Ae - Ai)/Ae] \times 100$ (ZUCKERBRAUN et al, 2009). Foi calculada a média da área da

parede das artérias pulmonares de cada lâmina e em seguida, obtida a média das diferentes lâminas. Cada lâmina correspondeu ao tecido de um rato.

2.7 Ecocardiograma

A ecocardiografia é um método não-invasivo, que possibilita a determinação do volume, massa e função mecânica do coração, através da análise da anatomia e da função sistólica e diastólica das câmaras cardíacas.

Os exames foram conduzidos e analisados pelo mesmo observador experiente, de maneira cega quanto ao tratamento que cada animal havia sido submetido, antes e após o período de tratamento. Todas as medidas foram adquiridas em triplicatas sendo posteriormente calculados os valores médios.

As medidas e análise ecocardiográficas foram realizadas durante o experimento e as imagens foram guardadas meramente para fins ilustrativos. Após anestesia com pentobarbital sódico 60 mg/kg, os animais foram tricotomizados na região do tórax e posicionados em decúbito lateral, visando à aquisição das imagens realizadas através de um ecocardiógrafo com Doppler (Esaote, modelo Caris Plus, USA), com transdutor de 10 MHz ou com o sistema de ultrassom de alta resolução *Vevo 770* (FUJIFILMS VisualSonics, Toronto, Canadá), com transdutor de 11-24 MHz.

Para a medida das estruturas cardíacas, foram obtidas imagens em modo unidimensional, orientada pelas imagens em modo bidimensional, com transdutor em posição para-esternal. A análise da geometria cardíaca foi feita por meio da utilização do modo bidimensional em eixo curto ao nível dos músculos papilares para a mensuração da área ventricular direita e esquerda ao final da diástole, sendo analisados os seguintes parâmetros: área do VD, diâmetro do VD, espessura do VD, área do VE, diâmetro do VE e diâmetro da artéria pulmonar.

A avaliação do fluxo da artéria pulmonar foi obtida com o Doppler pulsátil posicionado na via de saída do ventrículo direito, logo abaixo da valva pulmonar, para obter o fluxograma do local analisado.

A partir do registro da curva de fluxo sistólico pulmonar, foi registrado o tempo de aceleração, em ms (TAP) que representa o intervalo de tempo medido do início até o pico máximo do fluxo pulmonar. Todas as medidas

foram obtidas de acordo com os manuais da Sociedade Americana de Ecocardiografia e da Associação Européia de Ecocardiografia (LANG et al., 2006)

2.8 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão. A concentração do LASSBio-1027 necessária para reduzir em 50% a contratatura induzida pela fenilefrina (IC_{50}) foi determinada para cada experimento. A curva concentração-resposta foi ajustada pela seguinte equação: $y_{max} = y_{min} + a/(1 + e^{-x-x_0/b})$ onde y é a porcentagem de tensão isométrica; $a = y_{max} - y_{min}$; $b =$ inclinação; e $x_0 = IC_{50}$. O teste t de Student foi utilizado para comparar a mesma concentração em duas curvas ou para a comparação de dois grupos experimentais. Para a comparação de múltiplos grupos, foi utilizado one-way ANOVA e Newman-Keuls como post-test. Em ambos os testes, considerou-se significância estatística $p < 0,05$. Os gráficos foram construídos utilizando o programa GraphPad Prism 5 para representar os dados obtidos.

3. Resultados

3 RESULTADOS

3.1 Efeito do LASSBio-1027 no músculo liso arterial

A atividade vasodilatadora do derivado LASSBio-1027 foi avaliada em anéis de aorta de ratos Wistar. A contratilidade foi induzida pela fenilefrina (10 μ M) em anéis de aorta com e sem endotélio. Após administraram-se concentrações crescentes do derivado LASSBio-1027, o qual promoveu relaxamento em aortas pré-contraídas de maneira concentração-dependente (Figura 11). A CI_{50} em anéis de aorta com endotélio foi de $6,89 \pm 1,4 \mu$ M (n = 6). A remoção do endotélio vascular reduziu a resposta vasodilatadora induzida pelo composto, pois a CI_{50} aumentou para $154,7 \pm 17,4 \mu$ M indicando que o efeito vasorelaxante foi parcialmente dependente da integridade do endotélio vascular.

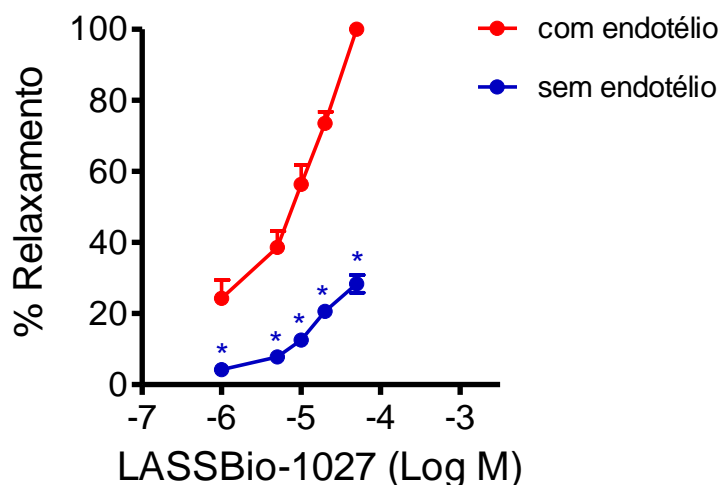


Figura 11. Curva concentração–resposta do LASSBio-1027 em aorta de rato com e sem endotélio, pré-contraído com fenilefrina. Dados representam a média \pm EP (n=6). *P<0,05 comparado ao experimento com endotélio.

Considerando o envolvimento endotelial para o relaxamento dos anéis de aorta induzidos pelo derivado LASSBio-1027, investigou-se as vias de sinalização envolvidas no mecanismo vasodilatador. Anéis de aorta com endotélio íntegro foram pré-incubadas com L-NAME, um inibidor da óxido nítrico sintase, que reduziu o relaxamento máximo induzido pelo LASSBio-1027 para $9,1 \pm 1,2\%$ (Figura 12A). O pré-tratamento de aortas com endotélio íntegro

com ZM241385, um antagonista seletivo do receptor A_{2A} de adenosina, promoveu um deslocamento da curva concentração-resposta para a direita e reduziu o relaxamento máximo para $6,3 \pm 2,0\%$ (Figura 12B). Estes resultados sugerem que o LASSBio-1027 promove relaxamento através da produção de óxido nítrico mediada pela ativação do receptor A_{2A} de adenosina.

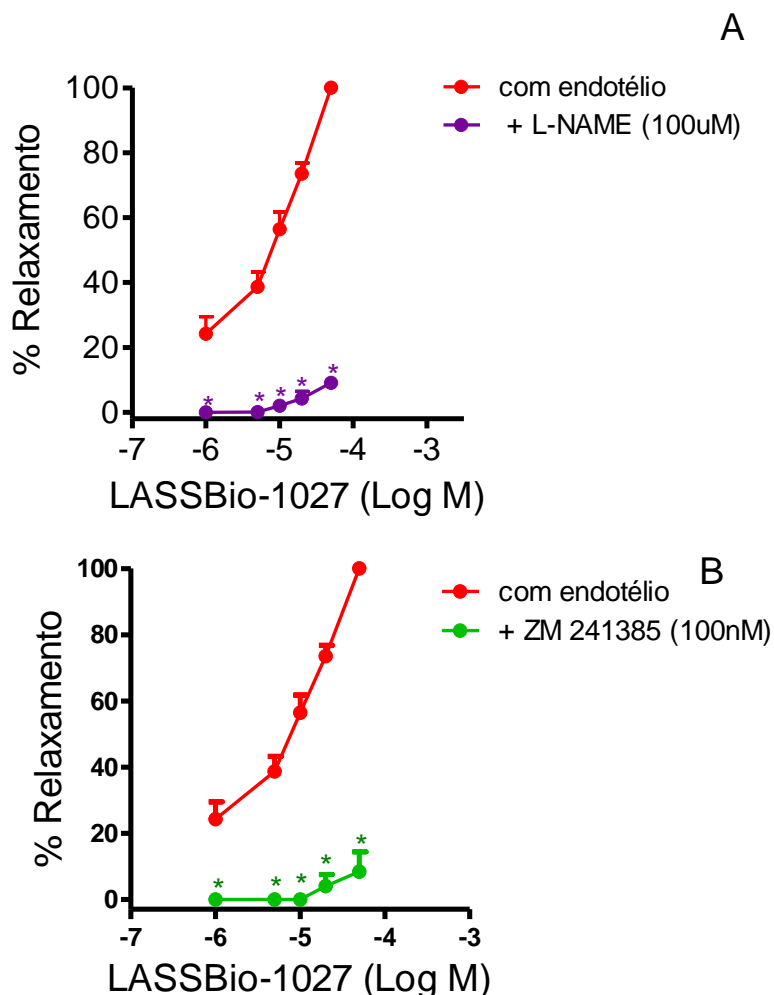


Figura 12. Curva concentração–resposta do LASSBio-1027 em aortas com endotélio, pré-contraídas com fenilefrina na presença de (a) L-NAME (inibidor da óxido nítrico sintase) e (b) ZM241385 (antagonista seletivo dos receptores A_{2A}). Dados representam a média \pm EP (n=6). *P < 0,05 comparado ao experimento com endotélio.

Também investigou-se o mecanismo pelo qual o LASSBio-1027 promove vasodilatação na ausência do endotélio vascular em aortas pré-incubadas com glibenclamida, um bloqueador dos canais K_{ATP} . A glibenclamida reverteu quase que completamente o efeito do derivado como mostrado na figura 13. Estes resultados sugerem que estes canais demonstram grande importância para o

efeito vascular pois, possivelmente, a ativação do receptor A_{2A} de adenosina no músculo liso vascular pelo derivado culmine com a abertura dos canais de K_{ATP} , induzindo a hiperpolarização da célula e conseqüentemente, vasodilatação.

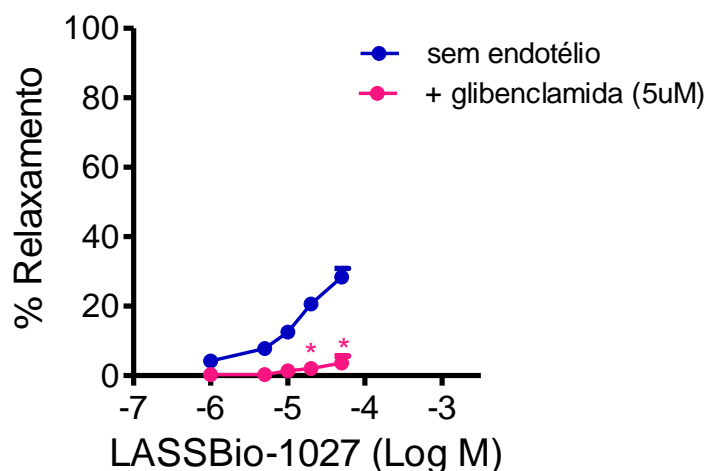


Figura 13. Curva concentração – resposta do LASSBio-1027 na ausência do endotélio de aortas pré-contraídas com fenilefrina na presença da glibenclamida (bloqueador dos canais de K_{ATP}). Dados representam média \pm EP (n=6). *P < 0,05 comparado ao experimento sem endotélio.

Também avaliou-se o efeito vasodilatador do derivado em anéis de aorta pré-incubadas com a associação de glibenclamida e L-NAME conforme mostrado na Figura 14. Quando os dois bloqueadores são utilizados, observa-se reversão total do efeito vasodilatador promovido pelo LASSBio-1027 indicando a participação do componente endotelial e muscular liso para o efeito vasodilatador do derivado.

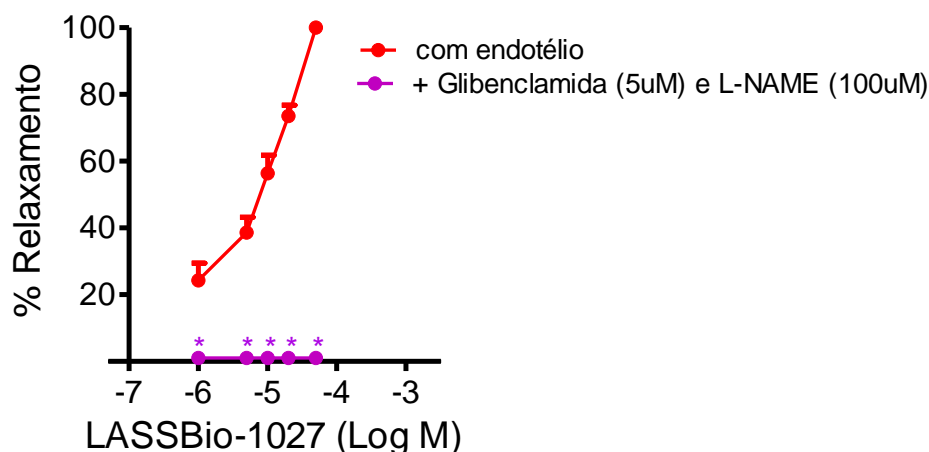


Figura 14. Curva concentração – resposta do LASSBio-1027 em aortas com endotélio, pré-contráidas com fenilefrina na presença de Glibenclamida + L-NAME. Dados representam a média \pm EP (n=6). *P < 0,05 comparado ao experimento com endotélio.

3.2 Efeito do LASSBio-1027 durante tratamento prolongado

LASSBio-1027 foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) na dose de (10 mg/kg/dia) em ratos WKY e SHR por 14 dias consecutivos. O derivado não promoveu alteração significativa da pressão arterial em ratos WKY (Figura 15). No entanto, após a contínua administração do derivado por 14 dias (administração i.p) em SHR, LASSBio-1027 promoveu redução das PAS, PAD e PAM sem alterar significativamente a frequência cardíaca (Tabela 9).

Tabela 9. Medidas dos parâmetros hemodinâmicos após tratamento por 14 dias com LASSBio-1027 em ratos WKY e SHR.

	PS (mmHg)	PD (mmHg)	PAM (mmHg)	FC (bpm)
Controle (SHR)	219,4 \pm 5,7	171,7 \pm 4,7	187,2 \pm 4,8	419,5 \pm 10,7
10 mg/kg L-1027 (SHR)	118,0 \pm 1,4*	95,5 \pm 4,1*	103,3 \pm 3,1*	320,6 \pm 20,6
Controle (WKY)	140,2 \pm 7,7	107,2 \pm 12,8	118,0 \pm 11,0	391,1 \pm 20,3
10 mg/kg L-1027 (WKY)	109,0 \pm 2,7	88,0 \pm 7,7	94,6 \pm 5,7	398,2 \pm 11,8

Houve redução significativa da PAS e PAD de $219,4 \pm 5,7$ para $118,0 \pm 1,4$ mm Hg e de $171,7 \pm 4,7$ para $95,5 \pm 4,1$ mm Hg, respectivamente quando compara-se o dia zero e o 14^o dia de tratamento. Do mesmo modo, houve redução da pressão arterial média de $187,2 \pm 4,8$ para $103,3 \pm 3,1$ mm Hg após 14 dias de tratamento (Figura 15). O tratamento não alterou a frequência cardíaca em ratos WKY nem em SHR. O mesmo protocolo experimental foi realizado em SHR através da administração do derivado LASSBio-1027 por via oral (20 mg/kg/dia). SHR tratados por 14 dias apresentaram redução significativa dos parâmetros hemodinâmicos sem alteração significativa da frequência cardíaca como demonstrado na figura 16. A PAS reduziu de $221,3 \pm 2,6$ (dia zero) para $135,4 \pm 8,9$ mm Hg ($p < 0,05$) (dia 14). Do mesmo modo a PAD reduziu de $179,0 \pm 6,8$ (dia zero) para $104,5 \pm 9,7$ mm Hg ($p < 0,05$) (dia 14). Por fim a pressão arterial média reduziu de $221,1 \pm 7,6$ (dia zero) para $113,1 \pm 5,6$ mm Hg ($p < 0,05$) (dia 14).

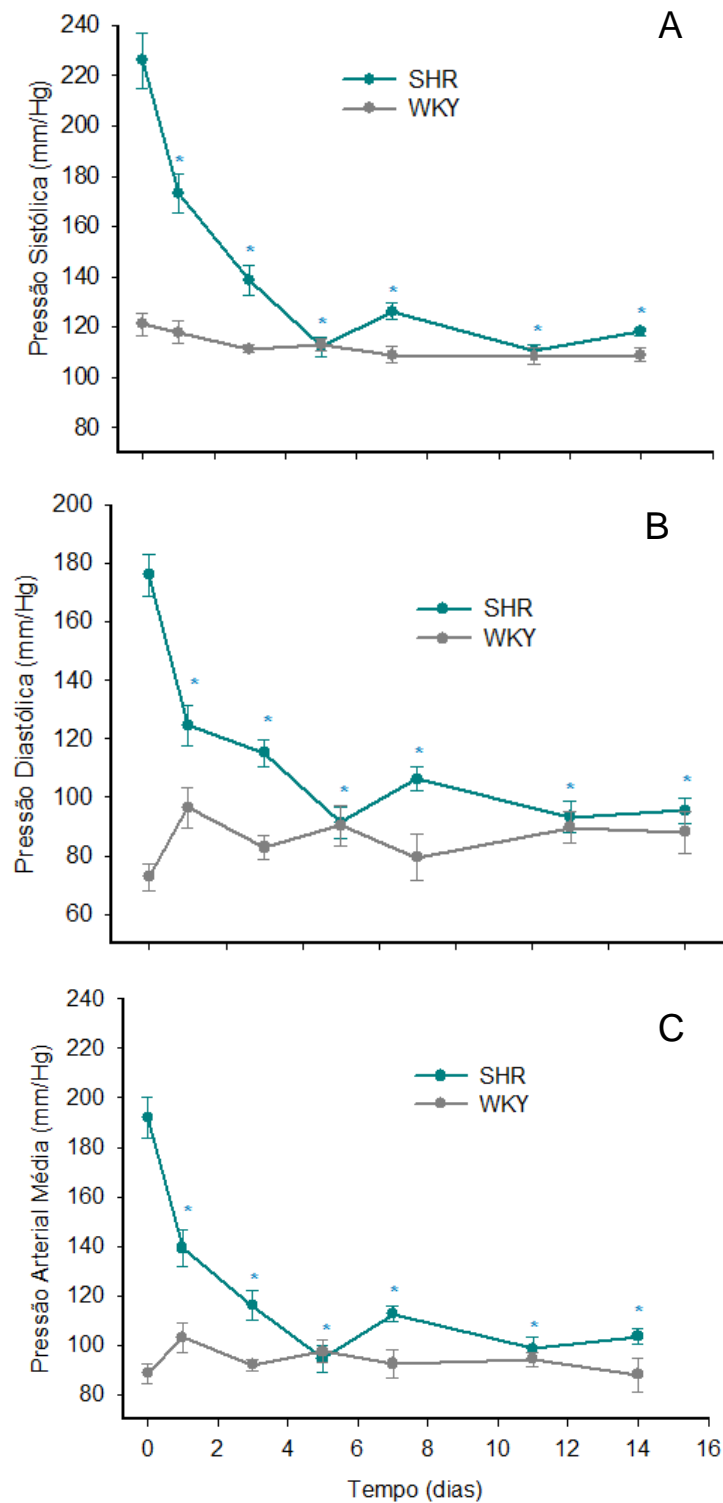


Figura 15. Ratos SHR e WKY tratados por via i.p. com LASSBio-1027 (10 mg/kg/dia) por 14 dias. Efeitos sobre (a) pressão sistólica, (b) pressão diastólica e (c) pressão arterial média. Dados representam \pm média EP (n=6). * $p < 0,05$ comparado ao dia zero.

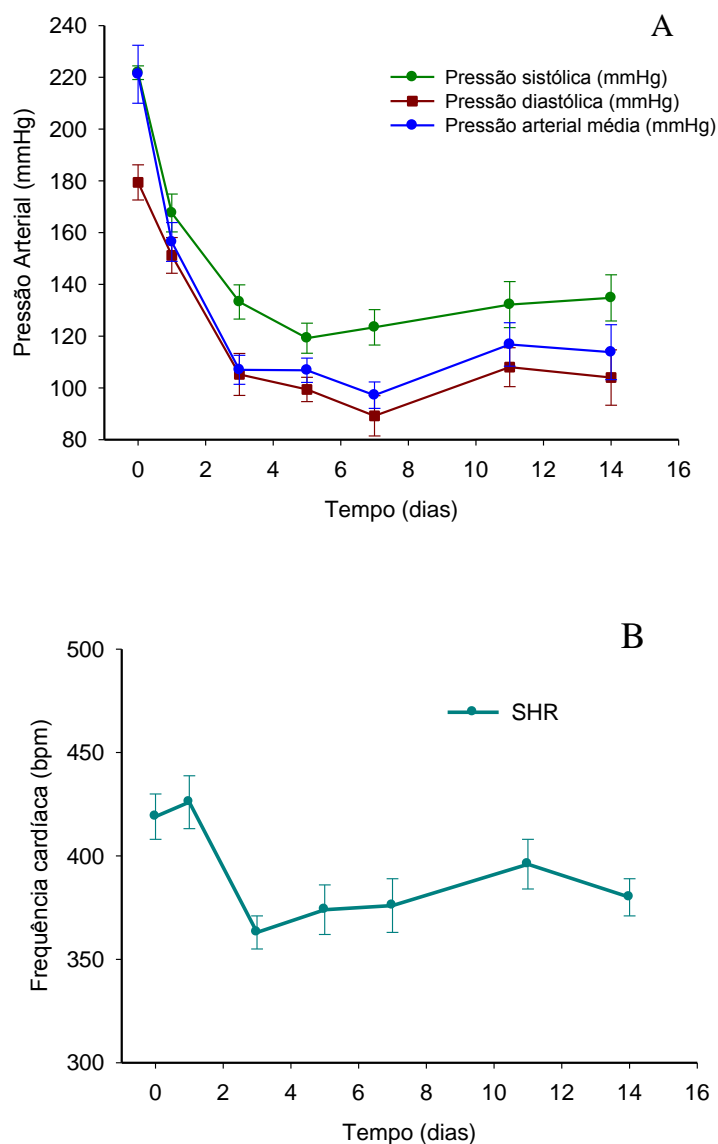


Figura 16. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tratados por via oral com LASSBio-1027 (20 mg/kg/dia) por 14 dias. Efeitos sobre pressão sistólica, diastólica e arterial média e (b) frequência cardíaca. Dados representam média \pm EP (n=6). * P < 0,05 comparado ao dia zero.

3.3. Ensaio de competição com radioligantes

A porcentagem de inibição da ligação do agonista [3H]CCPA (1 nM) pelo LASSBio-1027 (10 μ M) para o receptor A_1 (n = 2) foi de 29,1%. Já a porcentagem de inibição da ligação do agonista [3H]CGS21680 (6 nM) pelo LASSBio-1027 (10 μ M) para o receptor A_{2A} (n = 2) foi de 47,5%. A ligação do agonista [125I]AB-MECA (0.15 nM) para o receptor A_3 foi inibida em 67,5% pelo LASSBio 1027 (10 μ M).

3.4 Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP)

3.4.1. Tratamento terapêutico por 14 dias com LASSBio-1027 através da via intraperitoneal

Com a finalidade de avaliar o efeito do derivado LASSBio-1027 na reversão da HAP, a doença foi induzida através da administração de MCT em modelo animal (ratos Wistar). Após 14 dias da injeção de MCT, iniciou-se o tratamento com LASSBio-1027 com a administração i.p. diária na dose de 20 mg/kg. Observe na figura 17, registro representativo do aumento da PSVD após estabelecimento da HAP. A PSVD nos animais controle foi de $25,34 \pm 1,95$ mm Hg enquanto os animais doentes tratados com salina ou DMSO apresentam respectivamente, $49,04 \pm 6,18$ e $42,50 \pm 2,43$ mm Hg. O tratamento com LASSBio-1027 (20 mg/kg) promoveu redução significativa da PSVD para $26,55 \pm 1,65$ mm Hg.

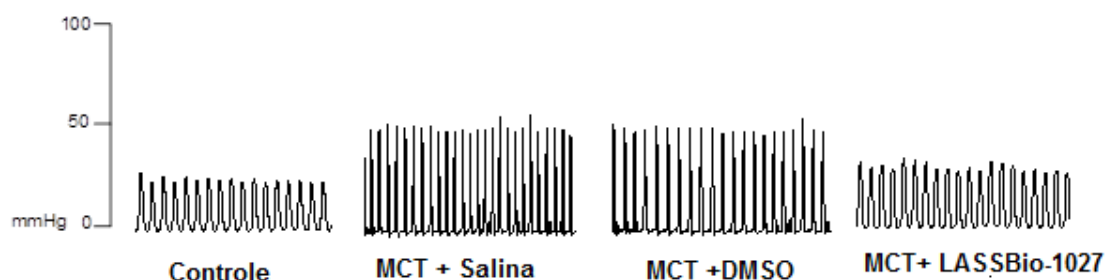


Figura 17. Registros representativos da PSVD (mmHg) de rato controle (salina), rato com HAP (MCT + salina), rato com HAP tratado com o veículo (MCT + DMSO) e rato com HAP tratado com LASSBio-1027 20 mg/kg i.p.

Além da aferição da PSVD, também avaliou-se os seguintes parâmetros: peso do VD, da relação entre o peso do VD e o peso do animal e da relação entre o peso do VD e o peso de VE + S (Figura 18). Houve aumento significativo do peso do coração, do VD e da relação VD/peso demonstrando que os animais com HAP apresentam hipertrofia do VD que consiste em uma das alterações decorrentes do aumento da resistência das artérias pulmonares na HAP. Estes parâmetros foram revertidos com o tratamento com LASSBio-1027 (20 mg/kg i.p). indicando redução da hipertrofia do VD.

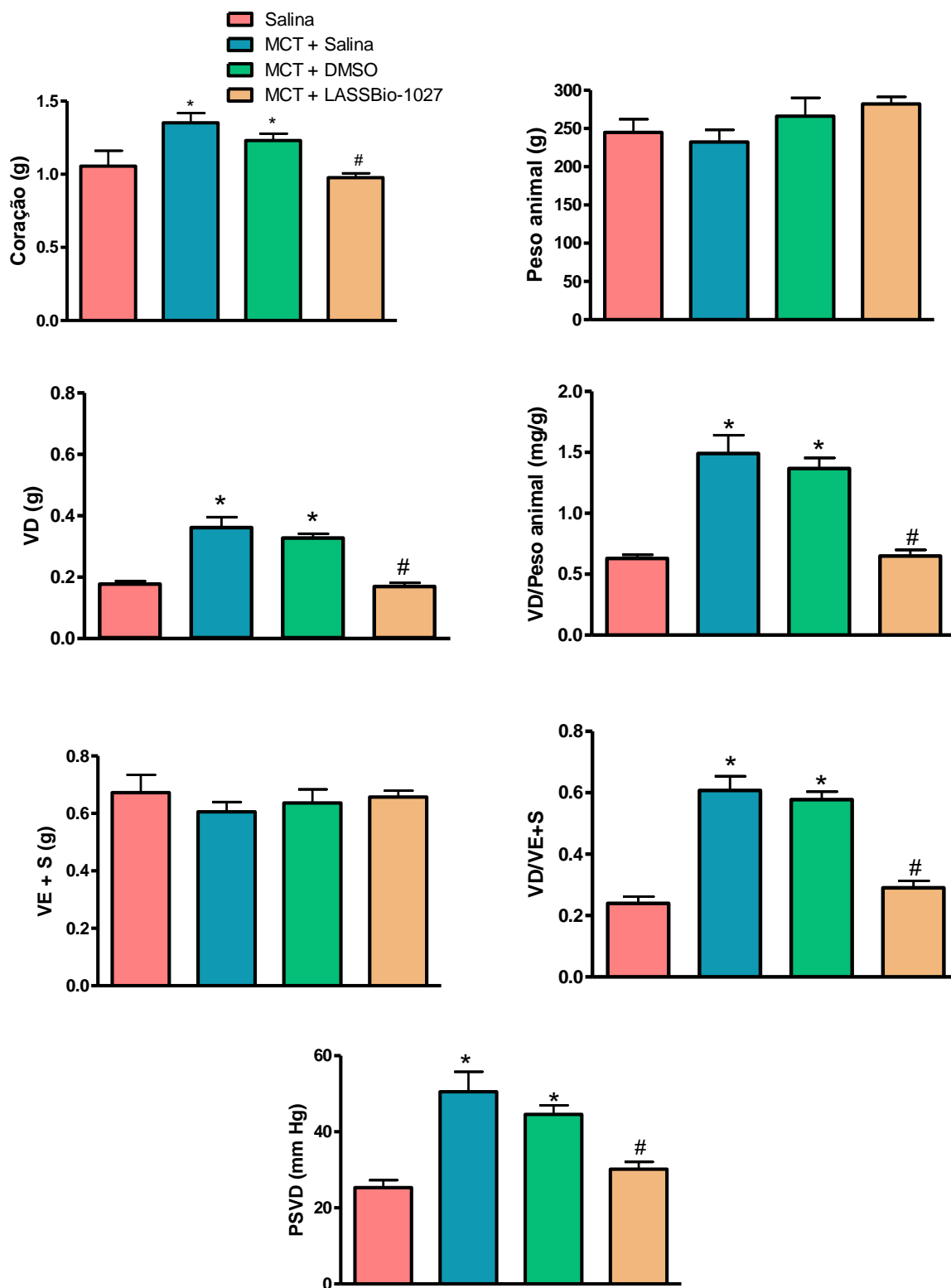


Figura 18. Parâmetros avaliados em modelo de HAP após o tratamento terapêutico com LASSBio-1027 20 mg/kg i.p. * $p < 0,05$ comparado ao controle, # $p < 0,05$ comparado ao MCT + DMSO. Dados representam a média \pm EP de 6 experimentos

Sabendo que além da hipertrofia ventricular direita, uma outra alteração característica na HAP é a lesão endotelial provocada pelo aumento da resistência vascular, avaliou-se a reatividade vascular de anéis de artéria pulmonar dos animais controle, doentes e dos doentes tratados com LASSBio-1027 (20 mg/kg i.p.) (Figura 19). Não houve diferença significativa na contração induzida por concentrações crescentes de fenilefrina nos grupos MCT+ DMSO e MCT+ LASSBio-1027 quando comparados ao controle. Já o relaxamento máximo induzido pela acetilcolina em anéis de artéria pulmonar de ratos com HAP tratados com o veículo (MCT + DMSO) foi significativamente reduzido para $33,54 \pm 6,73$ % quando comparado ao grupo controle que foi de $62,78 \pm 1,54$ %, porém foi recuperado no grupo HAP tratado com LASSBio-1027 para $59,00 \pm 5,29$ % ($p < 0,05$). Estes resultados estão expressos na tabela 10.

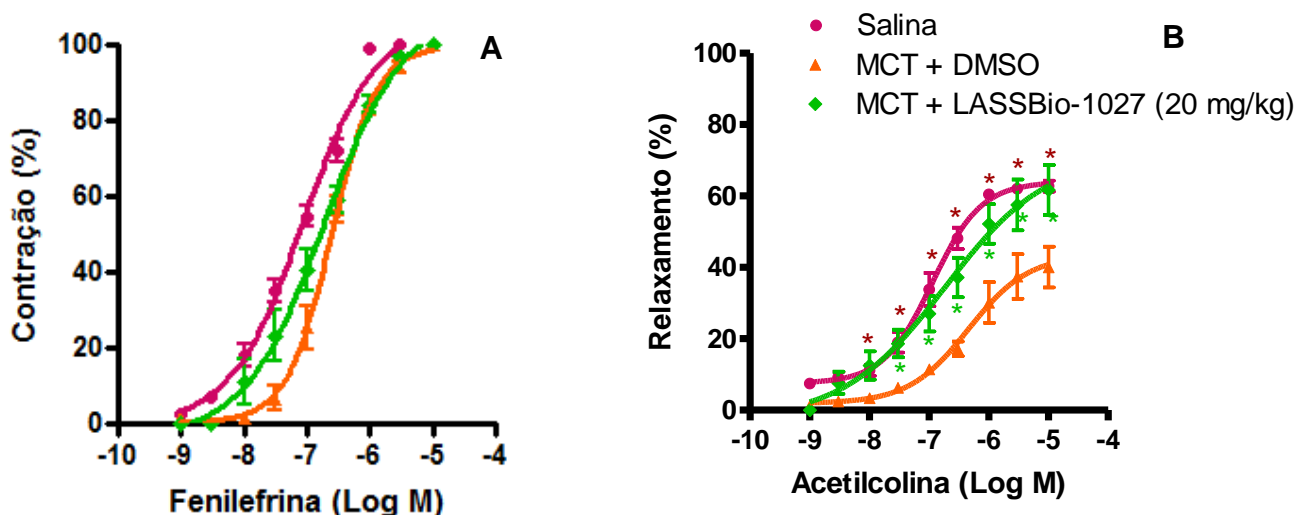


Figura 19. Efeito do tratamento terapêutico com LASSBio-1027 20 mg/kg i.p. na reatividade de anéis de artéria pulmonar de ratos com HAP. * $p < 0,05$ comparado ao MCT + DMSO. (A) curvas concentração-resposta mediante concentrações crescentes de fenilefrina e (B) curvas concentração-resposta mediante concentrações crescentes de acetilcolina. Dados representam a média \pm EP de 6 experimentos.

Tabela 10. Reatividade e relaxamento de artéria pulmonar após o tratamento terapêutico com LASSBio-1027 20 mg/kg i.p.

	CE ₅₀ fenilefrina (μM)	CE ₅₀ acetilcolina (μM)	Rmax acetilcolina (%)
Controle	0,103 ± 0,010	1,378 ± 0,027	62,78 ± 1,54
MCT + DMSO	0,311 ± 0,040	ND	33,54 ± 6,73*
MCT + LASSBio-1027	0,284 ± 0,021	2,026 ± 0,074	59,00 ± 5,29 [#]

CE₅₀: concentração eficaz média; Rmax: relaxamento máximo a 10 μM de acetilcolina; *p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao MCT + DMSO; ND: não determinado.

3.4.2 Análise morfométrica das arteríolas pulmonares

Após a análise morfométrica das artérias/arteríolas pulmonares dos animais controle observou-se uma porcentagem de área da parede de 61,87 ± 2,29. Já nos animais submetidos ao modelo de HAP tratados com salina ou DMSO observou-se aumento significativo da área da parede dos vasos para 83,43 ± 1,25 % e 86,34 ± 1,93 %, respectivamente indicando o desenvolvimento de hipertrofia da parede vascular, característico da HAP. Já nos animais doentes tratados com LASSBio-1027 20 mg/kg por via i.p. observou-se redução significativa da área da parede vascular para 66,00 ± 2,89, indicando redução significativa da hipertrofia da parede vascular (Figura 20).

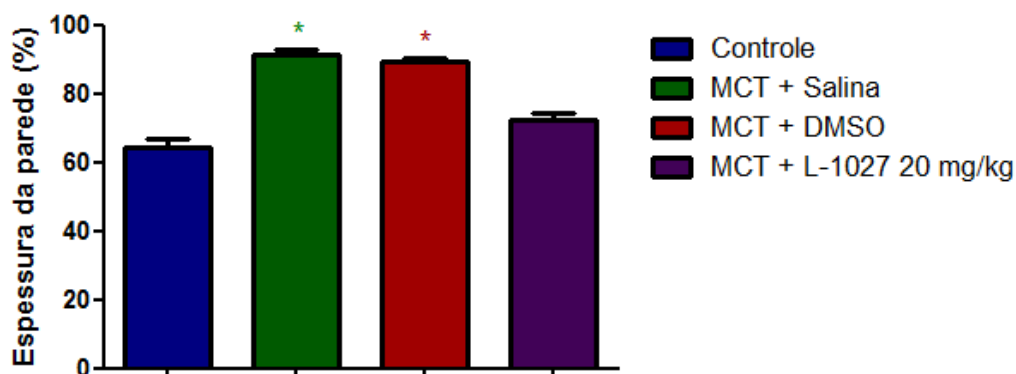


Figura 20. Análise morfométrica das artérias pulmonares de ratos com HAP após o tratamento terapêutico com LASSBio-1027 20 mg/kg, i.p.

3.4.3. Tratamento terapêutico por 14 dias com LASSBio-1027 através da via oral.

Baseado no interesse do desenvolvimento de fármacos que possam ser administrados por via oral e nos bons resultados obtidos com o tratamento por via intraperitoneal do derivado LASSBio-1027 para o tratamento da HAP, houve interesse na avaliação do mesmo através da administração por via oral.

Então, utilizou-se o protocolo experimental descrito anteriormente porém com a administração de LASSBio-1027 por via oral diária nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg/dia por 14 dias consecutivos. O tratamento com a substância promoveu redução significativa da PSVD, do peso do VD, da relação entre o peso do VD e o peso do animal e da relação entre o peso do VD e o peso de VE + S (Figura 21). Esses resultados também indicam eficácia do derivado no tratamento oral da HAP.

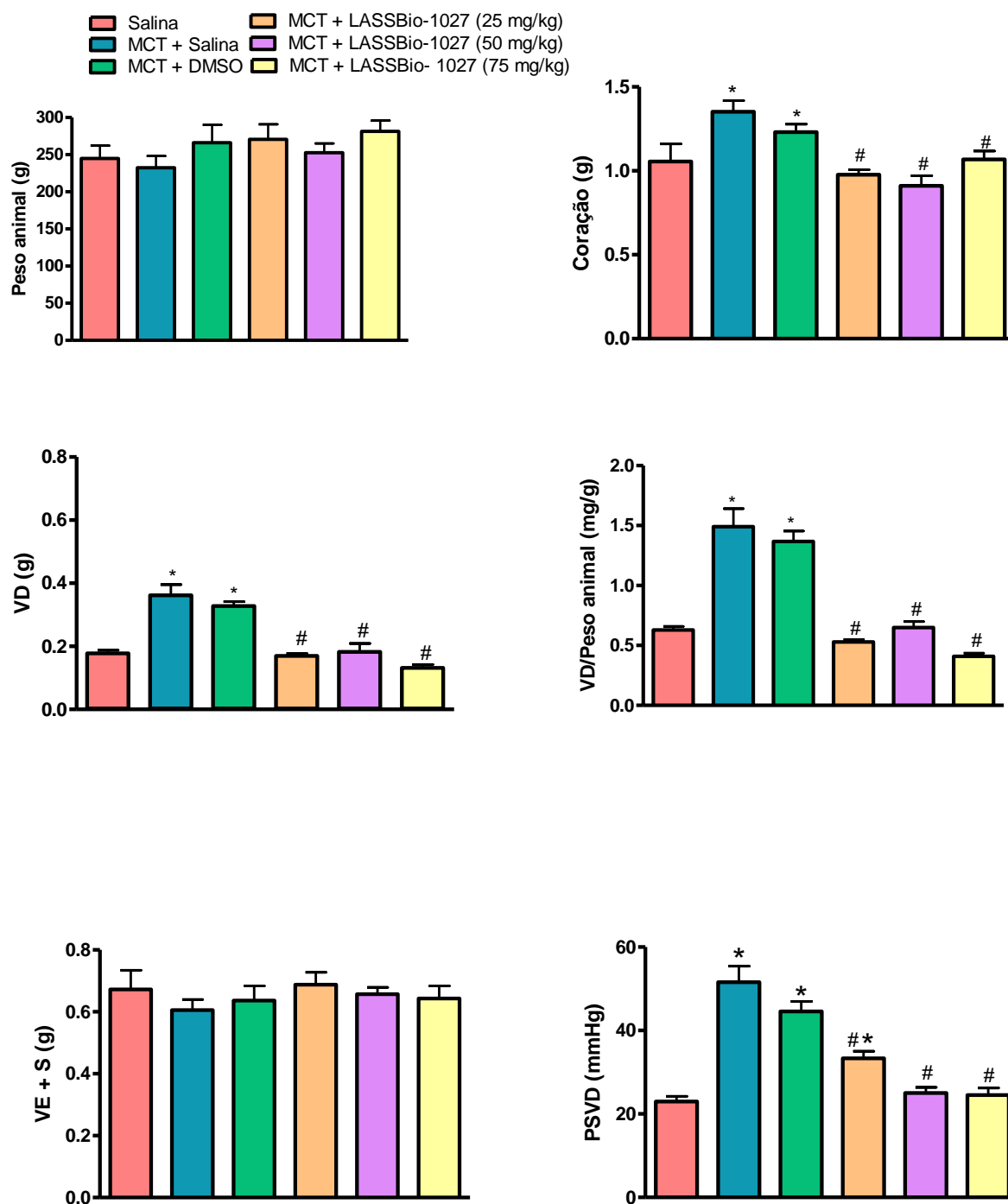


Figura 21. Parâmetros avaliados em modelo de HAP após o tratamento terapêutico com LASSBio-1027 nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg v.o. * $p < 0,05$ comparado ao controle, # $p < 0,05$ comparado ao MCT + DMSO. Dados representam a média \pm EP de 6 experimentos.

A reatividade das artérias pulmonares foi investigada nos diferentes grupos experimentais através da exposição a concentrações crescentes de fenilefrina e acetilcolina (Figura 22). O relaxamento máximo induzido pela acetilcolina em anéis de artéria pulmonar de ratos com HAP tratados com veículo (MCT + DMSO) reduziu significativamente para $36,82 \pm 5,88$ % em relação ao grupo controle que foi de $62,78 \pm 1,54$ %, porém recuperado nos grupos tratados com LASSBio-1027 nas doses 25 ($71,00 \pm 3,02$ %), 50 ($55,67 \pm 1,29$ %) e 75 ($65,00 \pm 0,02$ %) mg/kg por via oral. Estes resultados estão expressos na tabela 11.

Tabela 11. Reatividade e relaxamento de artéria pulmonar após o tratamento terapêutico com LASSBio-1027

	CE ₅₀ fenilefrina (μM)	CE ₅₀ acetilcolina (μM)	Rmax acetilcolina (%)
Controle	0,103 ± 0,010	1,378 ± 0,027	62,78 ± 1,54
MCT + DMSO	0,357 ± 0,022	ND	36,82 ± 5,88*
MCT + LASSBio-1027 (25 mg/kg)	0,334 ± 0,021	1,329 ± 0,028	71,00 ± 3,02 [#]
MCT + LASSBio-1027 (50 mg/kg)	0,312 ± 0,021	3,738 ± 0,906	55,67 ± 1,29 [#]
MCT + LASSBio-1027 (75 mg/kg)	0,378 ± 0,017	3,285 ± 0,034	65,00 ± 0,02 [#]

CE₅₀: concentração eficaz média; Rmax: relaxamento máximo a 10 μM de acetilcolina; *p<0,05 comparado ao controle, [#]p<0,05 comparado ao MCT + DMSO; ND: não determinado.

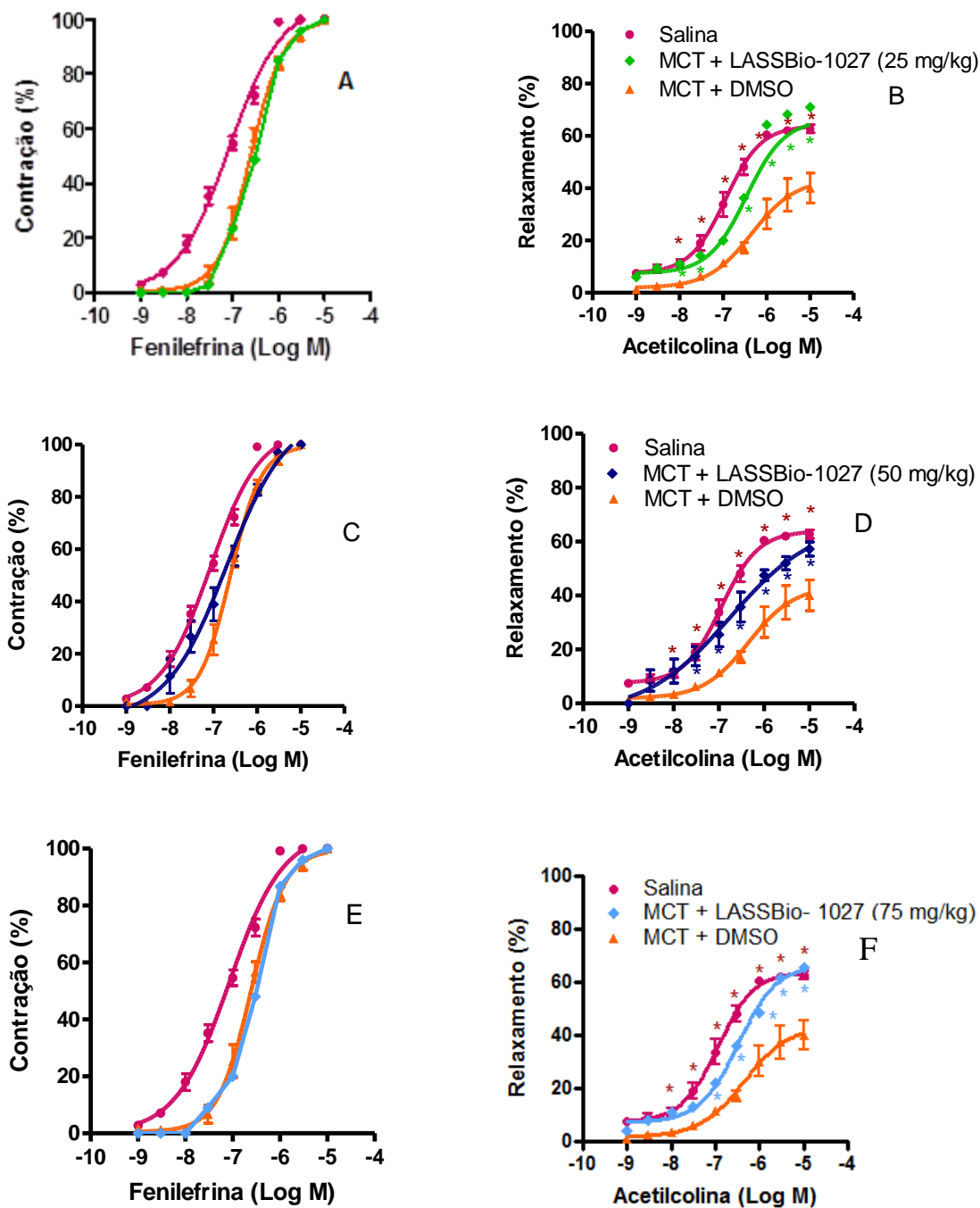


Figura 22. Efeito do tratamento terapêutico com LASSBio-1027 nas doses 25 mg/kg/p.o.(A,B), 50 mg/kg/p.o.(C,D), 75 mg/kg/p.o.(E,F) na reatividade de artérias pulmonares de ratos com HAP. Curvas contração-resposta mediante concentrações crescentes de fenilefrina e de acetilcolina. * $p < 0,05$ comparado a MCT + DMSO. Dados representam a média \pm EP de 6 experimentos.

3.4.4 Análise morfométrica das arteríolas pulmonares

Após a análise morfométrica das artérias/arteríolas pulmonares dos animais controle (Figura 23A) observou-se uma porcentagem de área da parede de $62,50 \pm 1,27$ %. Já nos animais submetidos ao modelo de HAP tratados com salina ou DMSO observou-se aumento significativo da área da parede dos vasos para $78,83 \pm 1,17$ % e $79,34 \pm 1,93$ %, respectivamente indicando o desenvolvimento de hipertrofia da parede vascular, característico da HAP (Figura 23B e 23C). Já nos animais doentes tratados com LASSBio-1027 observou-se redução significativa da área da parede vascular para $69,00 \pm 3,89$; $68,50 \pm 3,27$ e $61,83 \pm 3,83$ %, respectivamente nos animais com HAP tratados com as doses de 25, 50 e 75 mg/kg/dia, indicando redução significativa da hipertrofia da parede vascular.

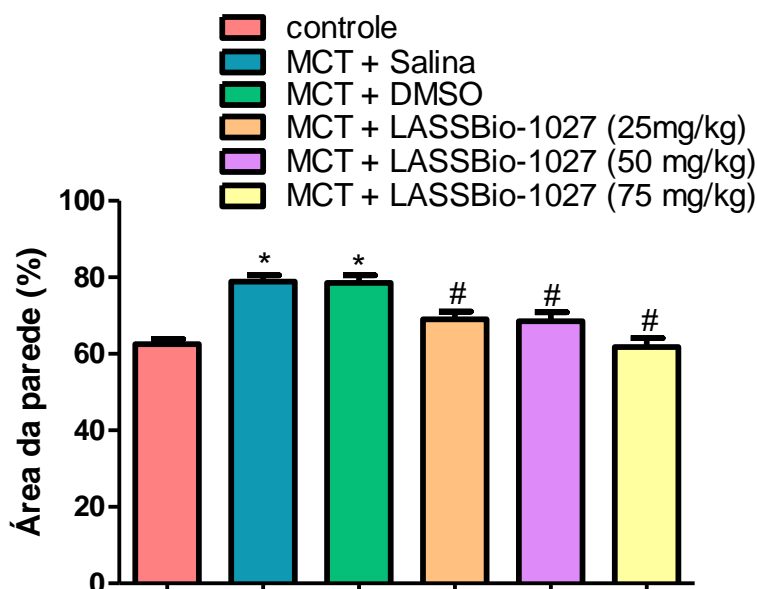
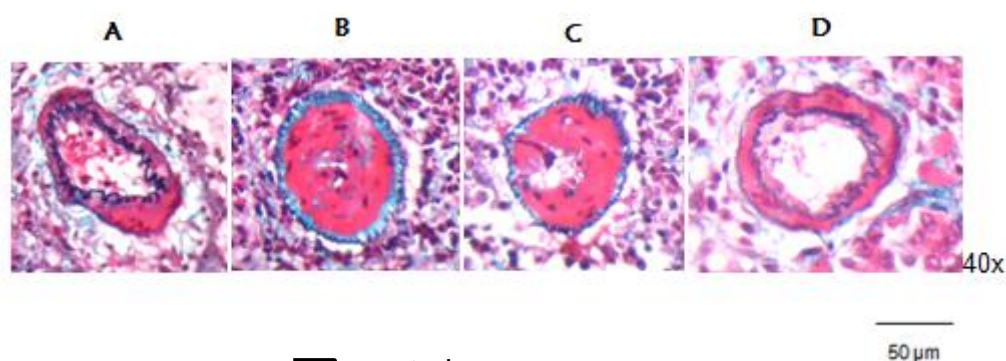


Figura 23. Análise morfométrica das artérias pulmonares de ratos com HAP após o tratamento terapêutico com LASSBio-1027. A: controle; B: MCT + salina; C: MCT + DMSO; D: MCT + LASSBio-1027 (50 mg/kg, v.o.); coloração de Gomori. * $p < 0,05$ comparado ao controle; # $p < 0,05$ comparado ao MCT + DMSO.

3.5 Ecocardiograma

Após o tratamento dos animais com HAP com veículo ou LASSBio-1027, realizou-se a avaliação ecocardiográfica que possibilitou a obtenção de informações relacionadas ao volume, massa e função mecânica do coração. Na Figura 24, observam-se imagens representativas de ecocardiografia do coração de ratos controle e com HAP. Nos animais com HAP tratados com o veículo, observa-se significativo aumento da espessura da parede do VD, indicando a hipertrofia de VD, que foi revertida nos animais com HAP tratados oralmente com LASSBio-1027 nas doses de 50 e 75 mg/kg.

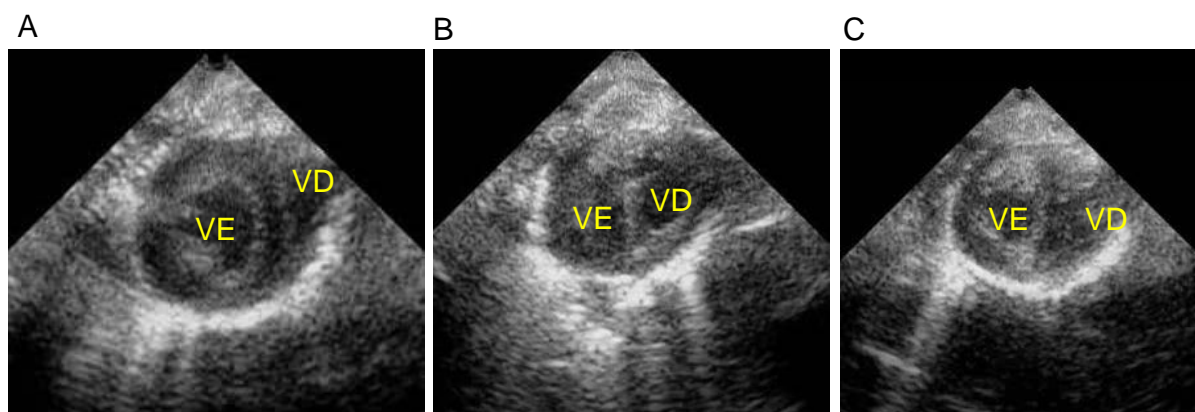


Figura 24. Imagens de ecocardiografia do coração de ratos com HAP após o tratamento terapêutico com LASSBio-1027 50 mg/kg v.o. A: controle; B: MCT + DMSO; C: MCT + LASSBio-1027. VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito.

Imagens representativas do fluxo pulmonar, ou seja, do fluxo sanguíneo na artéria pulmonar são apresentadas na figura 25. Os ratos com HAP tratados com o veículo apresentaram alteração do padrão de fluxo pulmonar, devido à redução do tempo de aceleração. O tratamento oral com LASSBio-1027 nas doses de 50 e 75 mg/kg reverteu este parâmetro.

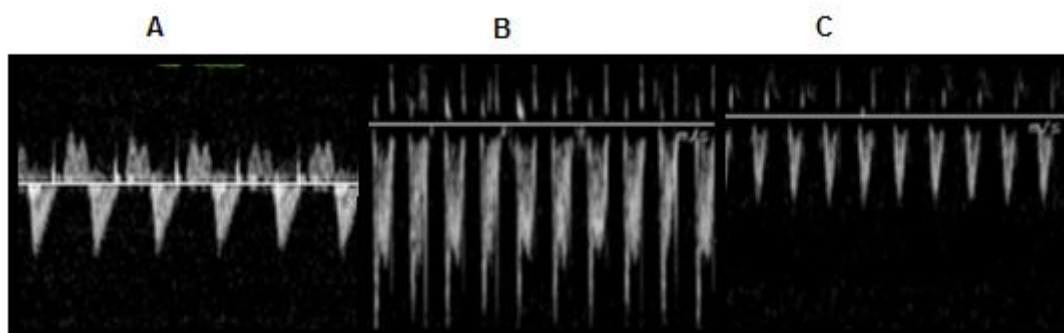


Figura 25. Imagens do fluxo pulmonar de ratos com HAP após o tratamento terapêutico com LASSBio-1027 50 mg/kg v.o. A: controle; B: MCT + DMSO; C: MCT + LASSBio-1027.

As seguintes alterações foram observadas através do exame de ecocardiograma utilizando o equipamento Vevo: diâmetro da artéria pulmonar, área do VD, espessura da parede do VD e tempo de aceleração do fluxo pulmonar em ratos com HAP quando comparados ao controle.

O diâmetro interno da artéria pulmonar nos animais controle foi de $0,31 \pm 0,02$ cm. Nos animais doentes tratados com DMSO houve redução do diâmetro interno da artéria pulmonar ($0,23 \pm 0,04$ cm) resultante da proliferação das células musculares lisas e hipertrofia da parede celular. Já no grupo tratado com LASSBio-1027 na dose de 50 mg/kg houve recuperação deste parâmetro para $0,34 \pm 0,02$ cm (Figura 26).

Quanto a área do VD, os animais controle apresentaram área de $16,00 \pm 1,63$ mm². Nos animais doentes tratados com DMSO houve aumento da área do VD ($23,43 \pm 2,29$ mm²) resultante da dilatação da câmara cardíaca. Já no grupo tratado com LASSBio-1027 na dose de 50 mg/kg houve recuperação deste parâmetro para $18,50 \pm 4,12$ mm². Não houve alteração significativa na área do VE (Figura 26).

A alteração da área do VD foi acompanhada por alteração na espessura do VD, a qual foi de $0,42 \pm 0,08$ cm. Nos animais doentes tratados com DMSO houve aumento da espessura da parede do VD ($0,84 \pm 0,07$ cm) resultante do aumento do trabalho cardíaco. Já no grupo tratado com LASSBio-1027 na dose

de 50 mg/kg houve recuperação deste parâmetro para $0,51 \pm 0,13$ cm (Figura 26).

O tempo de aceleração do fluxo pulmonar foi de $28,83 \pm 5,07$ ms no grupo controle. Já no grupo com HAP tratados com veículo DMSO houve redução deste valor para $15,75 \pm 1,07$ ms. Houve recuperação deste parâmetro após o tratamento com LASSBio-1027 na dose de 50 mg/kg para $22,67 \pm 2,51$ ms. (Figura 26).

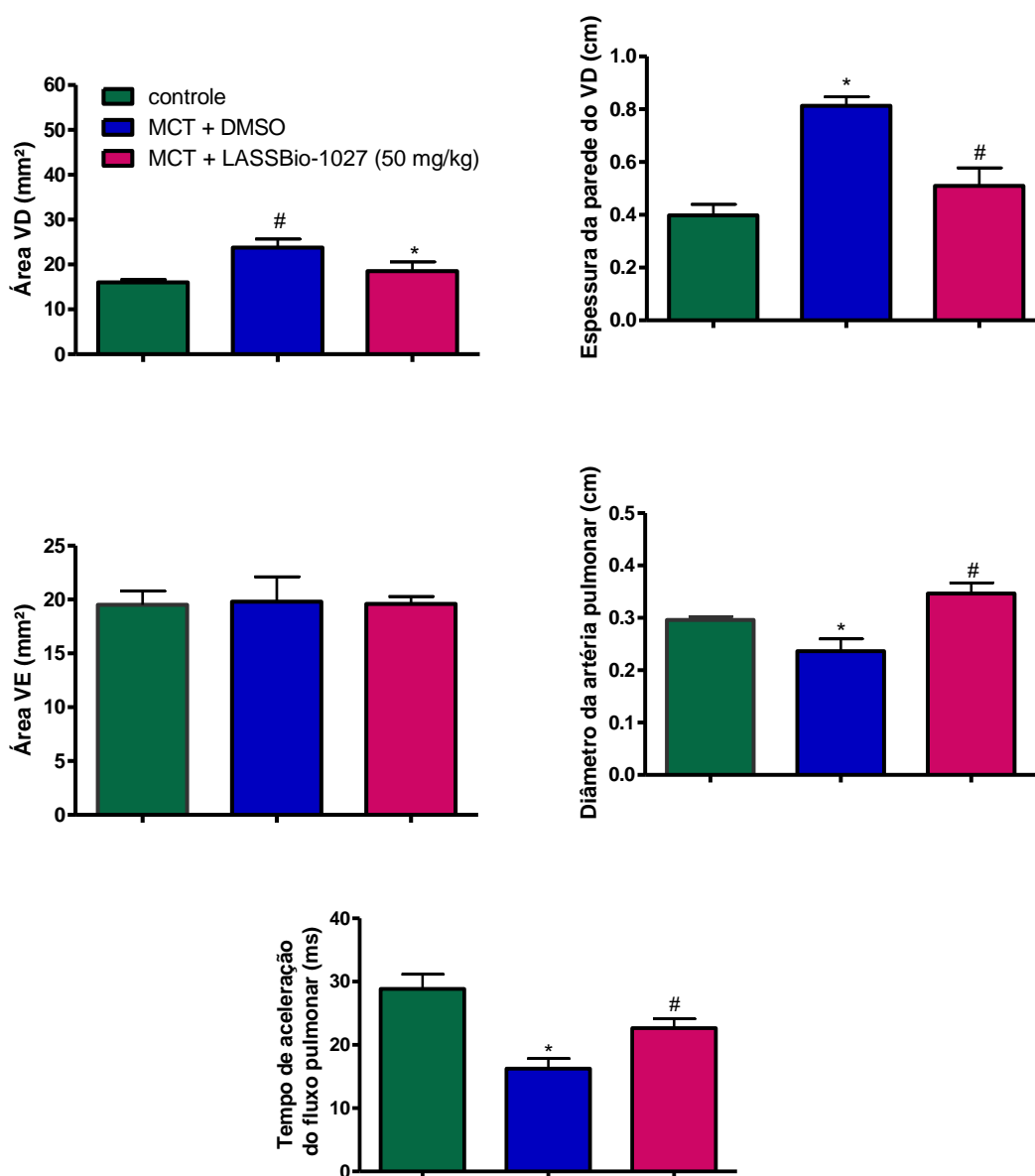


Figura 26. Parâmetros avaliados na ecocardiografia, utilizando o equipamento Vevo, de ratos com HAP após o tratamento terapêutico com LASSBio-1027 na dose de 50 mg/kg *p.o.* * $p < 0,05$ comparado ao controle, # $p < 0,05$ comparado ao MCT + DMSO. Dados representam a média \pm EP de 6 experimentos.

Após o tratamento com LASSBio-1027 nas doses de 25 e 75 mg/kg, realizou-se o exame de ecocardiograma com o equipamento Esaote para se determinar as seguintes alterações: área do VD, diâmetro do VD, espessura da parede do VD, área do VE, diâmetro do VE e tempo de aceleração do fluxo pulmonar.

A área ($37,00 \pm 4,84 \text{ mm}^2$) e a espessura do VD ($0,15 \pm 0,01 \text{ cm}$) não foram recuperadas no tratamento na dose de 25 mg/kg quando comparadas ao controle que apresentou área de $30,20 \pm 3,03 \text{ mm}^2$ e espessura do VD de $0,11 \pm 0,02 \text{ cm}$. Já com o tratamento na dose de 75 mg/kg houve recuperação destes parâmetros com valores respectivos de $34,20 \pm 2,95 \text{ mm}^2$ de área do VD e $0,11 \pm 0,01 \text{ cm}$ de espessura do VD (Figura 27).

O tempo de aceleração do fluxo pulmonar foi de $25,50 \pm 7,50 \text{ ms}$ no grupo controle. Já no grupo com HAP tratado com LASSBio-1027 na dose de 25 mg/kg houve redução deste valor para $14,55 \pm 2,07 \text{ ms}$. Porém, na dose de 75 mg/kg recuperou para $24,67 \pm 4,33 \text{ ms}$ (Figura 27).

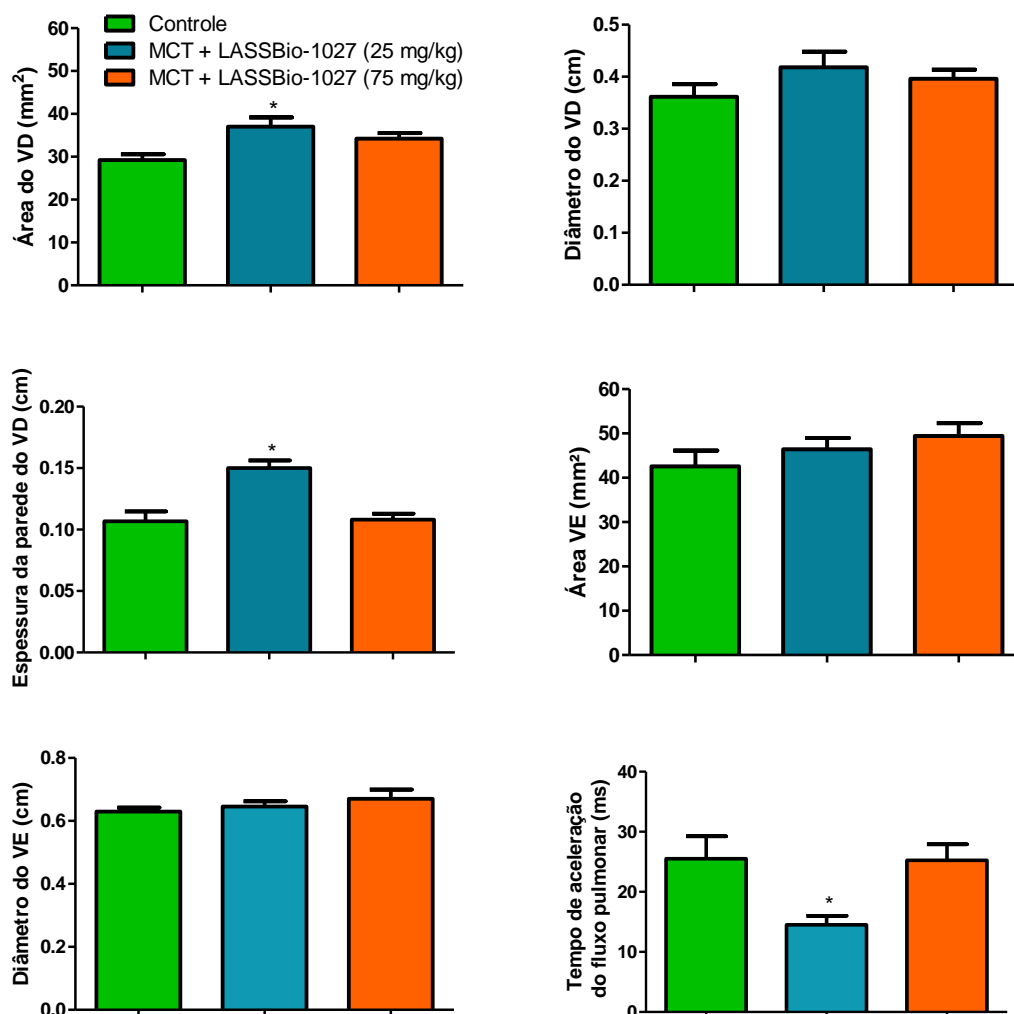


Figura 27. Parâmetros avaliados na ecocardiografia, utilizando o equipamento Esaote, de ratos com HAP após o tratamento terapêutico com LASSBio-1027 nas doses de 25 e 75 mg/kg v.o. *p < 0,05 comparado ao controle. Dados representam a média \pm EP de 6 experimentos.

4. Discussão

4.DISSCUSSÃO

4.1 Hipertensão Arterial Sistêmica

LASSBio-1027 promoveu relaxamento vascular em anéis de aorta com endotélio íntegro e em preparações desprovidas de endotélio vascular. O efeito vasodilatador do derivado reduziu em aortas pré-incubadas com inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME) indicando que a ação vasodilatadora é parcialmente dependente da integridade do endotélio vascular. Além disso, infere-se que a produção de NO é importante para o mecanismo vasodilatador do derivado. LASSBio-1027 promoveu relaxamento em aortas de maneira concentração-dependente provavelmente através da ativação do receptor de adenosina A_{2A} uma vez que em ensaio farmacológico de registro de tensão isométrica, ao pré-incubarmos anéis de aorta com o antagonista seletivo dos receptores A_{2A} , ZM 241385, observou-se inibição significativa da vasodilatação induzida por LASSBio-1027. Além disso, em ensaios de ancoramento molecular, este derivado demonstrou interação para o receptor A_{2A} .

A vasodilatação induzida pelo LASSBio-1027 em aortas sem endotélio foi bloqueada na presença da glibenclamida, um inibidor do canal de K_{ATP} . Estes achados sugerem que LASSBio-1027 não somente pode ativar receptor A_{2A} localizado no endotélio vascular como também no músculo liso vascular de aorta de ratos.

A adenosina é formada por uma ligação glicosídica entre uma base púrica adenina e uma D-ribose (POLOSA, 2002). É gerada a partir do metabolismo do trifosfato de adenosina (ATP) pela ação de enzimas da família das ecto-nucleotidases, amplamente distribuídas pelo organismo e expressas em muitas células incluindo plaquetas, células epiteliais, endoteliais e leucócitos (ELTZSCHIG, 2009).

Uma destas enzimas, a NTPDase -1 (ecto-apirase) também conhecida como CD39, converte o ATP ou adenosina difosfato (ADP) em adenosina monofosfato (AMP) que por sua vez sofre a ação de uma ecto-5'-nucleotidase (CD73) gerando a adenosina, que é rapidamente convertida pela enzima adenosina desaminase à inosina. A degradação desta última pela purina

nucleosídeo fosforilase gera xantina que será posteriormente metabolizada em hipoxantina e ácido úrico (POLOSA, 2002).

A adenosina modula vários processos fisiológicos nos mamíferos cujas respostas são promovidas pela sua interação com receptores específicos localizados na membrana celular. A partir dos estudos farmacológicos e de biologia molecular, foi possível caracterizar quatro subtipos de receptores de adenosina denominados A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 (OLAH e STILES, 1995). Os subtipos A_1 e A_3 estão acoplados a proteína G inibitória, cuja ativação promove inibição da adenilato ciclase. Já os receptores A_{2A} e A_{2B} estão acoplados a proteína G estimulatória cuja ativação promove estimulação da adenilato ciclase (OLSSON e PEARSON 1990).

Desta forma, LASSBio-1027 interage com receptores A_{2A} no endotélio vascular, o qual promove ativação da proteína G estimulatória. Esta irá ativar a enzima adenilato ciclase – enzima intracelular aderida à membrana plasmática que catalisa a formação de 3'-5' adenosina monofosfato cíclico (AMPC) a partir do trifosfato de adenosina (ATP) – proporcionando um aumento da resposta celular. Assim, após a formação do complexo ligante/GPCR, a subunidade α da proteína Gs, que interage com o nucleotídeo guanílico, catalisa a troca de GDP por GTP, assumindo a forma ativa dessa isoforma. A porção α da proteína desloca-se então do dímero $\beta\gamma$ e ativa a adenilato ciclase, resultando no aumento substancial da concentração de AMPC.

O AMPC, então, se liga a subunidade regulatória da proteína quinase A (PKA) e libera a subunidade catalítica que fosforila e ativa a enzima óxido nítrico sintase (eNOS). Esta enzima catalisa a conversão do aminoácido L-arginina que produz L-citrulina e óxido nítrico (NO). O NO é um gás solúvel, e é um importante sinalizador celular. Este se difunde para as células musculares lisas adjacentes e ativa a enzima guanilato ciclase aumentando os níveis de guanilato monofosfato cíclico (GMPc). O GMPc se liga a subunidade regulatória da proteína quinase G (PKG) e libera a subunidade catalítica que fosforila e abre canais de K^+ sensíveis a ATP. A partir da abertura desses canais, há efluxo de K^+ e hiperpolarização da célula (Figura 28).

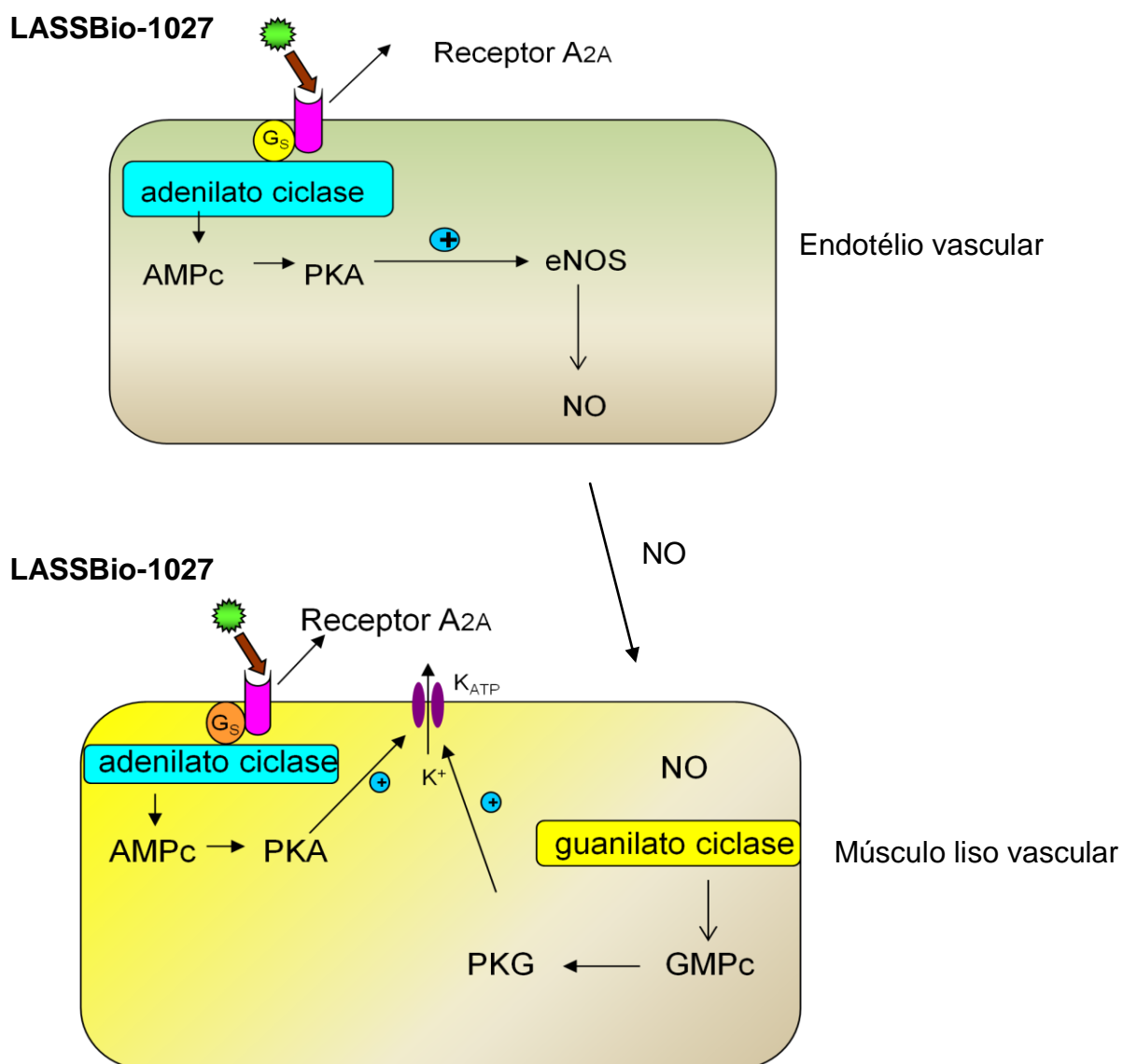


Figura 28. Representação do mecanismo de ação do LASSBio-1027.

Além da ativação de receptores nas células endoteliais, também há indícios que LASSBio-1027 ative receptores A_{2A} nas células musculares lisas. A via de sinalização responsável pela resposta vasodilatadora estaria relacionada a fosforilação e abertura dos canais de K_{ATP} pela PKA – AMPc.

LASSBio-1027 mostrou potência vasodilatadora cerca de 10 vezes maior (CI₅₀ = 6,9 μM) que a substância protótipo LASSBio-294 (CI₅₀ = 74,0 μM) sugerindo então, que a inversão dos grupos funcionais ligados à subunidade *N*-acilidrazona possivelmente facilitou a interação de LASSBio para o receptor de adenosina A_{2A}.

O receptor de adenosina A_{2A} está localizado no endotélio vascular mas, também no músculo liso vascular de aortas de ratos (IKEDA et al, 1997), e a ativação dos receptores tanto no endotélio quanto no músculo liso vascular está envolvida na dilatação dos vasos (PRENTICE e HOURANI, 1996). A ativação do receptor A_{2A} endotelial, que está acoplada a uma proteína G estimulatória, induz a liberação de NO através da ativação da via adenilato ciclase-PKA (RAY e MARSHALL, 2006). Contudo, a ativação destes receptores nas células musculares lisas potencializa a ativação do AMPc e PKA, os quais fosforilam e abrem canais de K_{ATP} . Este efeito, por sua vez, causa hiperpolarização da célula e consequente vasodilatação (DUBEY et al, 2001). Por isto, ao bloquear estes canais com glibenclamida observou-se reversão do efeito vasodilatador promovido pelo LASSBio-1027.

O mecanismo de ação proposto foi corroborado pelos ensaios de competição com radioligantes o qual demonstrou que LASSBio-1027 deslocou 47,5 % o ligante seletivo radiomarcado [3H] CGS21680 para o receptor A_{2A} e 67,5 % o ligante [^{125}I] AB-MECA para o receptor A_3 .

A ativação do receptor A_{2A} promove diversos efeitos incluindo, vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e de neutrófilos além de reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio (LEWIS et al, 1994; PRENTICE e HOURANI, 1996; LEAL et al, 2008). Já os efeitos farmacológicos via ativação dos receptores A_3 ainda são pouco conhecidos. Dados da literatura sugerem efeito cardioprotetor dos receptores A_3 após ensaios de isquemia em modelos animais, porém o mecanismo responsável por este efeito ainda é desconhecido. (LIU et al, 1994; STAMBAUGHET et al, 1997; TRACEY et al, 1997).

Auchampache e colaboradores propuseram que agonistas dos receptores A_1 poderiam interagir com o receptor A_3 desempenhando um papel cardioprotetor na injúria isquêmica (AUCHAMPACH et al, 1997; TRACEY, 1997). Já que no sistema cardiovascular, a ativação do receptor A_1 promove ações inibitórias no coração como, bradicardia e inotropismo negativo, consequentemente reduz o débito cardíaco (WEBB et al, 1990). No entanto, apesar de já estar descrito que os receptores A_3 são encontrados em cardiomiócitos (ZHOU et al, 1992; WANG et al, 1997), o seu papel funcional permanece desconhecido. Entretanto, estudos farmacológicos já demonstram a

participação de PKC e canais de K^+ sensíveis ao ATP (TRACEY et al, 1998) em resposta a estimulação dos receptores A_3 .

Além do efeito vasodilatador *in vitro*, LASSBio-1027 também demonstrou efeito anti-hipertensivo *in vivo*. Tratamento com LASSBio-1027 reduziu a PAM em SHR mas não em ratos WKY. Um dado importante é que LASSBio-1027 não promoveu alteração significativa da frequência cardíaca em ratos normais nem em SHR, o que sugere sua ação sob o receptor A_{2A} , uma vez que a ativação promove vasodilatação sem indução de taquicardia reflexa como efeito compensatório.

Uma hipótese para explicar este fenômeno seria a participação dos receptores A_{2A} em áreas cerebrais. Alguns autores sugerem que os receptores A_{2A} desempenham um papel primordial na regulação de áreas cerebrais localizadas nas regiões pré-sinápticas, pós-sinápticas e/ou não-sinápticas (SEBASTIÃO e RIBEIRO, 2000). Uma dessas áreas cerebrais na qual os receptores A_{2A} podem ser encontrados é no núcleo do trato solitário (NTS), localizado na porção dorsomedial da medula oblonga. A estimulação dos receptores A_{2A} no NTS modula distintas respostas regionais simpáticas promovendo redução da pressão arterial média e da frequência cardíaca (BARRACO et al, 1991). Portanto, a ativação dos receptores A_{2A} promove, mais especificamente, redução da atividade do nervo simpático renal e do nervo simpático pós-adrenal (SCISLO e O'LEARY, 2005).

Vários estudos sugerem que o efeito hipotensor da ativação dos receptores A_{2A} no NTS é mediada via liberação de glutamato de terminais aferentes e/ou de interneurônios intrínsecos do NTS envolvidos na transmissão do sistema baroreflexo (BARRACO et al, 1996; CASTILLO-MELENDEZ et al, 1994; THOMAS et al, 2000).

Portanto, o planejamento do LASSBio-1027 com efeito através da ativação dos receptores de adenosina A_{2A} mostrou que é possível o desenvolvimento de novos vasodilatadores diretos, agonistas dos receptores A_{2A} , os quais são isentos do efeito compensatório (taquicardia reflexa). Este efeito adverso é inerente a classe de fármacos vasodilatadores direto disponíveis na clínica e contra-indica a prescrição desta classe em monoterapia.

Além disso, parece que LASSBio-1027 promove efeito hipotensor em SHR e não em ratos WKY uma vez que animais espontaneamente hipertensos apresentam redução da produção da adenosina. Dubey e colaboradores (1997) descreveram o aumento da atividade da adenosina desaminase, responsável pela degradação da adenosina o que contribui para os baixos níveis de adenosina extracelular em células musculares de aorta e arteríolas renais em SHR. A desregulação da adenosina extracelular em células musculares lisas de SHR contribui para reforçar a resposta proliferativa que está envolvida na fisiopatologia do remodelamento vascular induzido pela HA, pois a adenosina derivada do meio vascular inibe o crescimento celular (ABIRU et al, 1991). Sendo assim, o desenvolvimento de um novo agonista do receptor de adenosina, especialmente agonista A_{2A} , é muito importante, visto seu efeito vasodilatador e antiproliferativo.

Muitos estudos têm descrito a síntese e o efeito anti-hipertensivo de novos agonistas do receptor de adenosina do tipo A_{2A} em SHR. Nestes ensaios, os análogos da adenosina foram sintetizados a partir de modificações estruturais da adenosina (CASATI et al, 1995, BONIZZONI et al, 1995). Entretanto, Webb (1990) e colaboradores descreveram o desenvolvimento de tolerância ao efeito anti-hipertensivo após administração de agonista do receptor A_{2A} por duas semanas.

O presente estudo descreve um composto inovador, LASSBio-1027, que é classificado como um derivado *N*-acilidrazônico e não apresenta estrutura similar a adenosina. Este composto é um agonista do receptor A_{2A} o qual promove uma ação anti-hipertensiva sem alterar significativamente a frequência cardíaca de ratos. A administração prolongada do derivado em SHR não promoveu tolerância ao efeito anti-hipertensivo, sugerindo-o como um novo candidato para o tratamento oral da HA.

4.2 Hipertensão arterial pulmonar

A adenosina é um importante intermediário de purinas e do metabolismo energético e está amplamente distribuída no organismo. Os níveis endógenos variam de 10 a 100 nM, apresentando níveis mais elevados na circulação pulmonar (SAADJIAN et al, 1999). Os níveis extracelulares de adenosina

aumentam consideravelmente em resposta a hipóxia (MOUDGIL, MICHELAKIS e ARCHER, 2005). Entretanto pacientes com HAP apresentam níveis plasmáticos de adenosina reduzidos na circulação pulmonar quando comparados a indivíduos normais, indicando uma possível deficiência na sinalização da adenosina em pacientes com HAP (SAADJIAN et al, 1999).

Em virtude dos efeitos benéficos de LASSBio-1027 como vasodilatador em modelo animal de HAS decorrentes de seu provável mecanismo de ação *in vitro*, que parece estar relacionado a ativação dos receptores A_{2A} , foram investigadas suas ações em modelo animal de HAP induzido por MCT em ratos, que tem sido o modelo mais utilizado nos últimos 10 anos (UMAR et al, 2010).

A MCT é um alcalóide pirrolizidínico, sendo encontrada em mais de 20 plantas, especialmente em sementes de *Crotalaria spectabilis*, e que após metabolismo hepático, forma um metabólito pirrólico, denominado monocrotalina pirrol (MCTP), que é responsável pela sua pneumotoxicidade (HUXTABLE, 1990). Após a exposição à MCT, a HAP e a hipertrofia do VD se desenvolvem no curso de duas semanas subsequentes. Ratos tratados com MCT desenvolvem espessamento da parede de artérias pulmonares levando ao remodelamento vascular pulmonar e conseqüente aumento da resistência vascular pulmonar e reduzida complacência dos vasos (JEFFERY e WANSTALL, 2001). A redução da complacência arterial leva ao aumento da pressão no VD, causando hipertrofia dos miócitos cardíacos e remodelamento ventricular direito (HUXTABLE, 1990; JEFFERY e WANSTALL, 2001; DHEIN et al, 2002; BOISSIERE et al, 2005). Além disso, após a exposição à MCT, também ocorre formação de microtrombos de plaquetas no interior de artérias pulmonares contribuindo para aumentar a resistência ao fluxo pulmonar e o trabalho do coração direito (HUXTABLE, 1990). A administração de MCT em ratos também promove lesão endotelial, reduzindo a resposta vasodilatadora à acetilcolina e ao carbacol (HUXTABLE, 1990; DHEIN et al, 2002; ALTIERE, OLSON e GILLESPIE, 1986). A perda das funções endoteliais ocorre devido à indução de apoptose de células endoteliais pulmonares pela MCTP (THOMAS et al, 2000). A hiperplasia e a hipertrofia pulmonar, e conseqüentemente o aumento do peso do pulmão, são acompanhadas pelo aumento dos conteúdos protéico e lipídico pulmonar em 55 e 86 %, respectivamente (HUXTABLE,

1990). Dessa forma, a HAP induzida por MCT apresenta diversas similaridades patológicas em relação à HAP humana, validando esse modelo animal para o estudo de novas substâncias que possam ser consideradas opções terapêuticas potenciais para prevenção e/ou reversão da doença.

De acordo com os resultados apresentados, a administração de MCT induziu aumento da PSVD, do peso do VD, da relação entre o peso do VD e o peso do animal, indicando que os animais desenvolveram HAP e hipertrofia ventricular direita (HUXTABLE, 1990; BOISSIERE et al, 2005; DHEIN et al, 2002). O tratamento prolongado tanto por via intraperitoneal quanto por via oral com LASSBio-1027 reduziu a hipertrofia do VD e disfunção ventricular direita. Provavelmente, o efeito vasodilatador de LASSBio-1027 reduziu a resistência e a pressão vascular pulmonar, diminuindo o trabalho sistólico ventricular direito e sua hipertrofia e dilatação da câmara cardíaca.

Houve recuperação de lesão endotelial da artéria pulmonar induzida pela MCT após tratamento com LASSBio-1027 uma vez que recuperou-se a resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina em ensaios de registro de tensão isométrica quando comparada a artéria pulmonar dos animais doentes.

A ecocardiografia transtorácica é amplamente utilizada para detectar HAP em humanos e em animais (BOISSIERE et al, 2005). Na avaliação ecocardiográfica de ratos normais e de ratos com HAP, observa-se diminuição do diâmetro interno da artéria pulmonar dos animais doentes, indicando hipertrofia desses leitos vasculares, assim como o aumento da área, espessura da parede do VD, caracterizando sua hipertrofia (BOISSIERE et al, 2005). Os animais que receberam injeção de MCT também tiveram redução do tempo de aceleração do fluxo pulmonar e alteração do padrão do fluxo, que normalmente apresenta um perfil arredondado e na HAP apresenta um perfil triangular, sendo a maior diferença observada no início da desaceleração, que passa a ocorrer mais rapidamente (KOSKENVUO et al, 2010). Na HAP, a velocidade do fluxo pulmonar aumenta e diminui rapidamente devido à rigidez da artéria pulmonar e ao aumento do trabalho sistólico ventricular direito (KOSKENVUO et al, 2010). O tratamento oral com LASSBio-1027 nas doses de 50 e 75 mg/kg reverteu o aumento da área, espessura da parede e diâmetro do VD assim como recuperou o diâmetro da artéria pulmonar indicando redução da resistência vascular pulmonar e da hipertrofia ventricular direita.

Os efeitos benéficos de LASSBio-1027 em modelo animal de HAP induzida por MCT devem ter sido decorrentes de seu provável mecanismo de ação *in vitro*, que parece estar relacionado a ativação dos receptores de adenosina A_{2A} .

Muitos estudos sugerem que a adenosina pode ser um potencial regulador endógeno no desenvolvimento da HAP por regular a proliferação de células musculares lisas e a síntese de colágeno, além da manutenção da homeostase vascular na circulação sistêmica. A interação da adenosina com o receptor A_{2A} é um potente vasodilatador sistêmico com possíveis efeitos similares na circulação pulmonar (SCHINDLER et al, 2005). Além disso, a adenosina atuando através da via do AMPc inibe a síntese de colágeno e a hipertrofia vascular das células musculares lisas e fibroblastos cardíacos (DUBEY et al, 2001).

Então, baseado nestas evidências, Xu e colaboradores propuseram em 2011 que a adenosina atuando via ativação dos receptores A_{2A} regularia o remodelamento vascular pulmonar e o desenvolvimento da HAP. Para isto, avaliaram a hemodinâmica, histologia e alterações ultra-estruturais no remodelamento vascular pulmonar em camundongos *knock-out* para o receptor A_{2A} quando comparados aos camundongos selvagens. Os animais *knock-out* desenvolveram aumento da pressão sistólica ventricular direita, e aumento do diâmetro e espessura do ventrículo direito. Além de hipertrofia das células musculares lisas e deposição de colágeno na túnica adventícia das arteríolas pulmonares, revelados em microscopia eletrônica. Assim, foi proposto, que a adenosina extracelular atuando via receptores A_{2A} representa um importante mecanismo regulador para o controle da HAP e do remodelamento vascular pulmonar. Então, o desenvolvimento da HAP na ausência dos receptores A_{2A} sugere que a ativação seletiva dos receptores A_{2A} parece desempenhar uma importante estratégia terapêutica para o tratamento da HAP.

Portanto, o novo derivado *N*-acilidrazônico LASSBio-1027 apresentou efeitos benéficos na reversão da HAP induzida por MCT em ratos. Seus efeitos devem ter sido ocasionados pela ativação dos receptores de adenosina A_{2A} , que além de levar à vasodilatação, também reduz a proliferação celular e o remodelamento vascular. A vasodilatação pulmonar e a redução do remodelamento promovem diminuição da resistência vascular pulmonar e da

pressão arterial pulmonar, gerando aumento da complacência ou distensibilidade arterial, o que reduz a pressão, o trabalho ventricular direito e sua hipertrofia através de uma via que pode ser uma nova estratégia terapêutica para o tratamento da HAP.

5. Conclusões

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que o planejamento do derivado LASSBio-1027 como um novo candidato a fármaco vasodilatador direto para o tratamento da HA e HAP foi bem sucedido.

LASSBio-1027 promoveu:

1. Vasodilatação em anéis de aorta mediado pela ativação de receptores A_{2A} de adenosina;
2. Redução da pressão arterial em SHR durante o tratamento prolongado *in vivo* sem ativar os mecanismos compensatórios reflexos;
3. Reversão da disfunção e hipertrofia ventricular direita e redução da lesão endotelial da artéria pulmonar de ratos com HAP induzida por MCT.

6. Referências bibliográficas

6 Referências Bibliográficas

ABIRU, T. et al. The antihypertensive effect of 2-alkynyladenosines and their selective affinity for adenosine A2 receptors, **Eur. J. Pharmacol.** v. 196, p. 69-76, 1991.

AGUI, T. et al. Stimulation of interleukin-6 production by endothelin in rat bone marrow-derived stromal cells. **Blood.** v. 84. p. 2531-2538, 1996.

ALTIERE, R.J.; OLSON, J.W.; GILLESPIE, M.N. Altered pulmonary vascular smooth muscle responsiveness in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 236, n. 2, p. 390-395, 1986.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. Cardiovascular Diseases in the United States: 2009. Disponível em: <www.yourethecure.org>. Acesso em: 21 jun. 2014.

ARCHER, S. et al. Preferential expression and function of voltage-gated, O₂-sensitive K⁺ channels in resistance pulmonary arteries explains regional heterogeneity in hypoxic pulmonary vasoconstriction. **Circ Res.** v. 95, p. 308-318, 2004.

ARTINANO, A. A., GONZALEZ, V.L.M. Endothelial dysfunction and hypertensive vasoconstriction. **Pharmacol. Res.**, v. 40, n. 2, p. 113-124, 1999.

AUCHAMPACH, J.A. et al. Selective activation of A₃ adenosine receptors protects against myocardial stunning and infarction without hemodynamic changes in conscious rabbits. **Circ Res.** v. 80, p. 800–809, 1997

BALIGA, R.S., MacALLISTER, R.J., HOBBS, A.J. New perspectives for the treatment of pulmonary hypertension. **Br. J. Pharmacol.**, v. 163, n. 1, p. 125-140, 2011.

BARRACO, R. A. et al. Adenosine receptor subtypes in the brainstem mediate distinct cardiovascular response patterns. **Brain Res Bull.** v. 26, p. 59–84, 1991.

BARRACO, R. A. et al. Activation of purinergic receptor subtypes in the nucleus tractus solitarius elicits specific regional vascular response patterns. **J Auton Nerv Syst.** v. 59, p.113–124, 1996.

BARREIRO, E.J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: A descoberta de novo agente cardioativo, **Quim. Nova** v. 25, p.1172-1180, 2002.

BENDER, A.T.; BEAVO, J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacol. Rev.**, v. 58, n. 3, p. 488-520, 2006.

BENOWITZ, N. L. Smoking less as a treatment goal for those who cannot stop smoking. **The American journal of medicine.** v. 116 p. 203-205. 2004.

BOISSIERE, J. et al. Doppler tissue imaging in assessment of pulmonary hypertension-induced right ventricle dysfunction. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 289, n. 6, p. H2450-H2455, 2005.

BONIZZONI, E. et al. Modeling hemodynamic profiles by telemetry in the rat. A study with A₁ and A_{2A} adenosine agonists, **Hypertension** v. 25, p. 564-569, 1995.

BRASIL. Relatório técnico da campanha nacional de detecção de suspeitos de diabetes mellitus. Brasília: Secretaria de Políticas da Saúde, Ministério da Saúde; 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Hipertensão arterial sistêmica para o Sistema Único de Saúde*. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

CASATI, C. et al. Telemetry monitoring of hemodynamic effects induced over time by adenosine agonists in spontaneously hypertensive rats, **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 275, p. 914-919, 1995.

CASTILLO-MELENDZ, M. et al. Presynaptic adenosine A_{2a} receptors on soma and central terminals of rat vagal afferent neurons. **Brain Res.** v. 652, p. 137-144, 1994.

CHRISTMAN, B.W. et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. **N Engl J Med.** v. 372, p. 70-75, 1992.

COWLEY, A. W. JR. The genetic dissection of essential hypertension. **Nature reviews. Genetics**, v. 7 p. 829-840, 2006.

D'ALONZO, G.E. et al. Survival in patients with pulmonary hypertension: results from a national prospective registry. **Ann Intern Med.** v.115, n. 5, p. 343-349, 1991.

DENG, A. Y. Genetic basis of polygenic hypertension. **Human Molecular Genetics.** v. 16, n. 2, p. 195-202, 2007.

DEWAR, M.J.S. et al. Development and use of quantum mechanical molecular models 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model, **J. Am. Chem. Soc.** v.107, p. 3902- 3909, 1985.

DE WET, C. J. et al. Inhaled prostacyclin is safe, effective, and affordable in patients with pulmonary hypertension, right heart dysfunction, and refractory hypoxemia after cardiothoracic surgery. **J Thorac Cardiovasc Surg.** v. 127, n. 4, p. 1058-1067, 2004.

DHEIN, S. et al. Changes in α_1 -adrenergic vascular reactivity in monocrotaline-treated rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 365, n. 2, p. 87-95, 2002.

DUBEY, R.K. et al. Smooth muscle cell derived adenosine inhibits cell growth, **Hypertension** v. 27, p. 766 –773, 1996.

DUBEY, R.K.. et al. Factors controlling growth and matrix production in vascular smooth muscle and glomerular mesangial cells, **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.** v. 6, p. 88 –105, 1997.

DUBEY, R.K. et al. A(2B) receptors mediate antimitogenesis in vascular smooth muscle cells. **Hypertension.** v. 35, p. 267–272, 2000.

DUBEY, R.K. et al. Dysregulation of extracellular adenosine levels by vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats, **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 21, p.249-254, 2001.

ELTZSCHIG, H. K. Adenosine: an old drug newly discovered. **Anesthesiology**, v. 111, n. 4, p. 904-15, 2009.

ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). **J Hypertens.** v. 31, p. 1281-1357, 2013.

FERRARIO, C.M. The renin-angiotensin system: importance in physiology and pathology. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 15, s. 3, p. S1-S5, 1990.

FIRTH, A.L. MANDEL. J. YUAN, J.X.J. Idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Dis. Model Mech.**, v. 3, p. 268-273, 2010.

FUCHS, F.D. et al. Prevalence of systemic arterial hypertension and associated risk factors in the Porto Alegre metropolitan area. Populational-based study. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** v.63, n. 6, p. 473-479, 1997

FUKUMOTO, Y., TAWARA, S., SHIMOKAWA, H. Recent progress in the treatment of pulmonary arterial hypertension: expectation for Rho-kinase inhibitors. **Tohoku J. Exp. Med.** v. 211, p. 309–320, 2007.

GALIÈ N., GRIGGIONE F., BACCHI-REGGIANI L., et al. Relation of endothelin-1 to survival in primary pulmonary hypertension. **Eur J Clin Invest.** v. 26, p. 273, 1996.

GALIE, N. et al. Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. **Circulation**, v. 119, n. 22, p. 2894-2903, 2009.

GAINE, S.P., RUBIN, L. Primary pulmonary hypertension. **Lancet** v. 352, p. 719-725, 1998.

- GHOFRANI, H.A. et al. Riociguat for chronic thromboembolic pulmonary hypertension and pulmonary arterial hypertension: a phase II study. **Eur. Respir. J.**, v. 36, n. 4, p. 792-799, 2010.
- GILLESPIE M.N. et al. Polyamines and epidermal growth factor in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Am Rev Respir Dis.** v. 140, p. 1463-1466, 1989.
- GONZALEZ, J., VALLS, N. Essential hypertension and oxidative stress: new insights. **World J. Cardiol.** v. 6, n. 6, p. 353-356, 2014.
- GOYAL, P. et al. Efficacy of nitroglycerin inhalation in reducing pulmonary arterial hypertension in children with congenital heart disease. **Br. J. Anaesth.**, v. 97, n. 2, p. 208-214, 2006.
- GUYTON A. C., COLEMAN, T. G., Long-term regulation of the circulation: interrelationships with body fluid volumes. **Physical Bases of Circulatory Transport Regulation and Exchange**, 1967.
- GUDMUNDSSON S., GENNSER G., MARSAL K. Effects of hydralazine on placental and renal circulation in pre-eclampsia. **Acta Obstet Gynecol Scand.** v. 74, p. 415-418, 1995.
- HASKO, G., CRONSTEIN, B. N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends Immunol**, v. 25, n. 1, p. 33-9, 2004.
- HERVÉ, P. et al. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. **Am. J. Med.**, v. 99, n. 3, p. 249-254, 1995.
- HOFFMAN, B.B., LEFKOWITZ, R.J. Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists. In *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed.; Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W., Goodman, L.S., Gilman, A., Eds.; McGraw-Hill: New York, NY, USA, 1996; pp. 199–248.
- HUMBERT, M., SITBON, O., SIMONNEAU, G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. **N. Engl. J. Med.** v. 351, p. 1425-1436, 2004.
- HUXTABLE, R.J. Activation and pulmonary toxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Pharmacol. Ther.**, v. 47, n. 3, p. 371-389, 1990.
- ICHINOSE, F., ROBERTS, J.D. Jr, ZAPOL, W.M. Inhaled nitric oxide: a selective pulmonary vasodilator: current uses and therapeutic potential. **Circulation**, v. 109, n. 25, p. 3106-3111, 2004.
- IGLARZ M, et al Pharmacology of macitentan, an orally active tissuetargeting dual endothelin receptor antagonist. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 327, n. 3, p. 736–745, 2008

IKEDA, U. et al. Adenosine stimulates nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells, **Cardiovasc. Res.** v. 35, p. 168–174, 1997.

IZIKKI, M. et al. Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. **J. Clin. Invest.**, v. 119, n. 3, p. 512-523, 2009.

JAAKOLA, V. P. et al. The 2.6 Angstrom crystal structure of a human A_{2A} adenosine receptor bound to an antagonist. **Science** v. 322, p. 1211-1217, 2008.

JACKSON, G. et al. Effects of sildenafil citrate on human hemodynamics. **Am. J. Cardiol.**, v. 83, n. 5A, p. 13C-20C, 1999.

JEFFERY, T.K. WANSTALL, J.C. Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. **Pharmacol. Ther.**, v. 92, n. 1, p. 1-20, 2001.

JONES, G., et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking, **J. Mol. Biol.** v. 267, p. 727-748, 1997.

KAPLAN, N. M. Clinical Hypertension. 9 ed. Williams & Wilkins. p. 1-24, 2006.

KLEIN, M. et al. Combined tyrosine and serine/threonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial remodeling. **Circulation**, v. 118, n. 20, p. 2081-2090, 2008.

KLINGER, J.R. et al. Neutral endopeptidase inhibition attenuates development of hypoxic pulmonary hypertension in rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 75, n. 4, p. 1615-1623, 1993.

KLINGER, J.R. et al. Brain natriuretic peptide inhibits hypoxic pulmonary hypertension in rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 84, n. 5, p. 1646-1652, 1998.

KITCHEN D.B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nat Rev Drug Discov** v.3, p. 935-949, 2004.

KÜMMERLE, A.E. et al. Studies towards the identification of putative bioactive conformation of potent vasodilator arylidene *N*-acylhydrazones derivatives, **Eur. J. Med. Chem.** v. 44, p. 4004-4009, 2009.

KOPF, D., WALDHERR, R. RETTING R. Source of kidney determinates blood pressure in young renal transplanted rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* v. 265, p. 104-111, 1993.

KOSKENVUO, J.W. et al. A comparison of echocardiography to invasive measurement in the evaluation of pulmonary arterial hypertension in a rat model. **Int. J. Cardiovasc. Imaging**, v. 26, n. 5, p. 509-518, 2010.

- LANE, K.B. et al. Heterozygous germline mutations in a TGF- β receptor, BMPR2, are the cause of familial primary pulmonary hypertension. The International PPH Consortium. **Nat Genet.** v. 26, p. 81-4, 2000.
- LANG, R.M. et al. Recommendations for chamber quantification. **Eur. J. Echocardiogr.**, v. 7, n. 2, p. 79-108, 2006.
- LIMA, P. C. et al. Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole. **European journal of medicinal chemistry**, 35: 187-203. 2000.
- LIMA, L.M., BARREIRO, E.J. Bioisosterism: A useful strategy for molecular modification and drug design. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, n. 1, p. 23-49, 2005.
- LEAL, C. M. et al. Antihypertensive profile of 2-thienyl-3,4-methylenedioxybenzoylhydrazone is mediated by activation of the A_{2A} adenosine receptor. **Eur. J. Med. Chem.** v. 55, p. 49-57, 2012.
- LEAL, S. et al. Immunohistochemical characterization of adenosine receptors in rat aorta and tail arteries, **Microsc. Res. Tech.** v. 71, p. 703–709, 2008.
- LEWIS, C.D. et al. Characterization of adenosine receptors in the rat isolated aorta, **Gen. Pharmacol.** v. 25, p. 1381– 1387, 1994.
- LIU, G.S. et al. Evidence that the adenosine A₃ receptor may mediate the protection afforded by preconditioning in the isolated rabbit heart. **Cardiovasc Res.** v. 28, p.1057–1061, 1994.
- MACHNIK, A. et al. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C–dependent buffering mechanism. **Nature Medicine.** v. 15, p. 545-552, 2009.
- MANDEGAR M., REMILLARD, C.V., YUAN, J.X.J., Ion channels in pulmonary arterial hypertension. **Prog Cardiovasc Dis.** v. 45, p. 81-114, 2002.
- MARQUES, F. Z., MORRIS, B. J. Neurogenic hypertension: revelations from genome-wide gene expression profiling. **Current Hypertension Reports.** v. 14, n. 6, p. 485-491, 2012.
- MATSUMOTO, H. et al. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. **Biochem Biophys Res Commun** v. 164, p. 74-80, 1989.
- MCLAUGHLIN, V.V., et al. Survival in primary pulmonary hypertension: the impact of epoprostenol therapy. **Circulation** v. 106, p. 1477-1482, 2002.
- MEHTA S. Drug therapy for pulmonary arterial hypertension: what's on the menu today? **Chest** v. 124, p. 2045-2049, 2003.

MEYRICK, B., REID, L. Hypoxia-induced structural changes in the media and adventitia of the rat hilar pulmonary artery and their regression. **Am. J. Pathol.**, v. 100, n. 1, p. 151-178, 1980.

MICHAEL, M.C., BRODDE, O.E., INSEL, P.A. Peripheral adrenergic receptors in hypertension. **Hypertension**, v. 16, n. 2, p. 107-120, 1990.

MOUCHAERS, K.T. et al. Effective reduction of MCT-PAH by fasudil. Comparison with bosentan and sildenafil. **Eur. Respir. J.**, v. 36, n. 4, p. 800-807, 2010.

MOUDGIL, R., MICHELAKIS, E.D., ARCHER, S.L., Hypoxic pulmonary vasoconstriction. **J Appl Physiol**. v. 98, p. 390–403, 2005.

MULLINS, L. J., BAILEY, M. A., MULLINS J. J. Hypertension, kidneys and transgenics: a fresh perspectives. **Physiol Rev**. v. 86, n. 2, p. 709-746, 2006.

MURRAY, F., MacLEAN, M.R., PYNE, N.J. Increased expression of the cGMP-inhibited cAMP-specific (PDE3) and cGMP binding cGMP-specific (PDE5) phosphodiesterases in models of pulmonary hypertension. **Br. J. Pharmacol.**, v. 137, n. 8, p. 1187-1194, 2002.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE, NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. NIH Publication: 04-5230, p. 11-12, 2004.

OLAH, M. E., STILES, G. L. Adenosine receptor subtypes: Characterization and therapeutic regulation. **Annu. Rev. Pharmacol.Toxicol**. v. 35, p. 581–606, 1995.

OLSSON, R.A., PEARSON, J.D. Cardiovascular purinoceptors, **Physiol. Rev**. v. 70, p. 761–845, 1990.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. World Health Statistics 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/gho/publications/worldhealthstatistics/ENWHS2012Brochure.pdf>>. Acesso em: 20/10/2013

PEIFLEY, K.A., WINKLESS, J.A. Angiotensin II and endothelin-1 increase fibroblast growth factor-2 mRNA expression in vascular smooth muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 242, p. 202-208, 1998.

PIAZ, V. D., GIOVANNONI, M. P., CASTELLANA, C. Novel heterocyclic-fused pyridazinones as potent and selective phosphodiesterase IV inhibitors. **Journal of medicinal chemistry**, v. 40, p. 1417-1421, 1997.

POHL, U., BRESSE, R., BASSENGE, G. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. **Hypertension** v. 8, p. 37-44, 1986.

POLOSA, R. Adenosine-receptor subtypes: their relevance to adenosine-mediated responses in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Eur Respir J**, v. 20, n. 2, p. 488-96, 2002.

PRENTICE, D.J., HOURANI, S.M., Activation of multiple sites by adenosine analogues in the rat isolated aorta, **Br. J. Pharmacol.** v. 118, p. 1509–1517., 1996.

RABINOVITCH, M., EVE and beyond, retro and prospective insights. **Am J Physiol.** v. 277, p. L5-L12, 1999.

RAFIQ, S., ANAND, S., ROBERTS, R. Genome-wide association studies of hypertension: have they been fruitful? **Journal of Cardiovascular Translational Research.** v. 3, n. 3, p. 189-196, 2010.

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, p. 85–96, 2006.

REIS, D.J., The brain and hypertension: reflections on 35 years of inquiry into the neurobiology of the circulation. **Circulation.** v. 70, n. 3, p. 31-45, 1984.

RICH, S. Primary pulmonary hypertension: executive summary from the World Symposium-Primary Pulmonary Hypertension 1998. Disponível em: <<http://www.who.int/ncd/dvd/pph.html>> Acesso: 02/09/2013.

RITTER, J. M. Angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers in hypertension. **BMJ** v. 342, p. 1673-1680, 2011.

RUBIN, L.J. Primary pulmonary hypertension. **N. Engl. J. Med.** v. 336, p. 111-117, 1997.

RUNO, J.R., LOYD, J.E. Primary pulmonary hypertension. **Lancet.** v. 36, n. 9368, p. 1533-1544, 2003.

SAADJIAN, A.Y. et al. Adenosine plasma concentration in pulmonary hypertension. **Cardiovasc Res.** v. 43, p. 228–236, 1999.

SASAKI, S., ZHANG, X.H., KESTELLOT, H. Dietary sodium, potassium, saturated fat, alcohol and stroke mortality. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 26, p. 783, 1995.

SCHINDLER, C.W. et al. Role of central and peripheral adenosine receptors in the cardiovascular responses to intraperitoneal injections of adenosine A1 and A2A subtype receptor agonists. **Br J Pharmacol.** v. 144, p. 642–650, 2005.

SCISLO, T.J., O'LEARY, D. S. Purinergic mechanisms of the nucleus of the solitary tract and neural cardiovascular control. **Neurol Res.** v. 27, p. 182–194, 2005.

SEBASTIÃO, A. M., RIBEIRO, J. A. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. **Trends Pharmacol Sci.** v. 21 p. 341–346, 2001.

SEBKHI, A. et al. Phosphodiesterase type 5 as a target for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 107, n. 25, p. 3230-3235, 2003.

SILVA, A.G. et al. Synthesis and vasodilatory activity of new *N*-acylhydrazone derivatives, designed as LASSBio-294 analogues, **Bioorg. Med. Chem.** v. 13 p. 3431- 3437, 2005.

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 p. 293-298, 2002.

SITBON, O. et al. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Circulation**, v. 111, n. 23, p. 3105-3111, 2005.

SMITH, R. E., ASHIYA, M. Antihypertensive therapies. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 6, p. 597-598, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial. **Rev Bras Clin Terap.** v. 24, n. 6, p. 231-272, 1998.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Rev Bras Hipertens.** v. 13, n. 1, p. 1-68, 2010.

SONKUSARE, S. Vascular calcium channels and high blood pressure: pathophysiology and therapeutic implications. **Vascul. Pharmacol.**, v. 44, n. 3, p. 131-142, 2006.

STAMBAUGH, K. et al. A novel cardio- protective function of adenosine A1 and A3 receptors during prolonged simulated ischemia. **Am J Physiol.** v. 273, p. H501–505, 1997.

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, **Br. J. Pharmacol.** v. 134, p. 603-613, 2001.

TAKAHASHI, H. et al. The central mechanism underlying hypertension: a review of the roles of sodium ions, epithelial sodium channels, the renin–angiotensin–aldosterone system, oxidative stress and endogenous digitalis in the brain. **Hypertension Research.** v. 34, p. 1147-1160, 2011.

TESCH, R. Estudo por Modelagem Molecular Visando a Identificação de Novos Ligantes dos Receptores de Adenosina. 2013. 114 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Química Medicinal) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

THE SEVENTH REPORT OF THE JOINT NATIONAL COMMITTEE ON PREVENTION, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **The JNC 7 Report. JAMA**, Chicago. v. 289 p. 2560-2572, 2004.

THOMAS, H.C. et al. Monocrotaline pyrrole induces apoptosis in pulmonary artery endothelial cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 151, n. 2, p. 236-244, 1998

THOMAS, T. et al. Localization and action of adenosine A_{2A} receptors in regions of the brainstem important in cardiovascular control. **Neuroscience**. v. 95, p. 513–518, 2000.

TITZE, J. et al. Spooky sodium balance. **Kidney International**. v. 85, p. 759-767, 2014.

TRACEY, W. R. et al. Selective adenosine A₃ receptor stimulation reduces ischemic myocardial injury in the rabbit heart. **Cardiovasc Res**. v. 33, p. 410–441, 1997.

TRACEY, W.R. et al. Selective activation of adenosine A₃ receptors with *N*-(3-chlorobenzyl)-5*N*-methylcarboxamidoadenosine (CB-MECA) provides cardioprotection via K_{ATP} channel activation. **Cardiovasc Res**. v. 40, p. 138–145, 1998.

TOROK, J. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. **Physiol. Res.**, v. 57, n. 6, p. 813-825, 2008.

TUDER, R.M. et al. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 159, p. 1925-1932, 1999.

UMAR, S. et al. Novel approaches to treat experimental pulmonary arterial hypertension: a review. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2010, p. 1 – 11, 2010.

VERDONK M.L. et al. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins** v. 52, p. 609-623, 2003.

WALFORD, G., LOSCALZO, J. Nitric oxide in vascular biology. **J Thromb Haemost.** v.1, n. 2112-2118, 2003.

WANG, J., et al. BULLOUGH, D.A. Dual activation of adenosine A₁ and A₃ receptors mediates preconditioning of isolated cardiac myocytes. **Eur J Pharmacol**. v. 320, p. 241–248, 1997.

WARD, J.P.T., SNETKOV, V.A., AARONSON, P.I., Calcium, mitochondria and oxygen sensing in the pulmonary circulation. **Cell Calcium** v. 36, p. 209-220, 2004.

WEBB, R.L. et al, Hemodynamic effects of adenosine agonists in the conscious spontaneously hypertensive rat, **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 254, p. 1090–1099, 1990.

WEISSBERG, P.L. et al. The endothelin peptides ET-1, ET-2, ET-3 and sarafatoxin S6c are comitogenic with platelet derived growth factor for vascular smooth muscle cells. **Atherosclerosis** v. 83, p. 257-262, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Health Report 2002: Reducing risks, promoting healthy life. World Health Organization, Geneva, Switzerland, p. 57, 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/whr/2002/en/>>. Acesso em: 19 fev. 2014.

WIIG, H. et al. Immune cells control skin lymphatic electrolyte homeostasis and blood pressure. **J Clin Invest.** v. 123, n. 7, p. 2803-2815, 2013.

WILBUR, S. L., MARCHLINSKI, F. E. Adenosine as an antiarrhythmic agent. **Am J Cardiol**, v. 79, n. 12A, p. 30-7, 1997.

WILLIAMSON, D.J. et al. Hemodynamic effects of bosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 102, n. 4, p. 411-418, 2000.

XIE, W. et al. Effects of iptakalim hydrochloride, a novel K_{ATP} channel opener, on pulmonary vascular remodeling in hypoxic rats. **Life Sci.**, v. 75, n. 17, p. 2065-2076, 2004.

YU, Y. et al. Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, n. 38, p. 13861-13866, 2004.

YUAN, X-J. et al. Attenuated K^+ channel gene transcription in primary pulmonary hypertension. **Lancet** v. 351, p. 726-727, 1998.

XU, M. H. et al. Absence of the adenosine A_2A receptor confers pulmonary arterial hypertension and increased pulmonary vascular remodeling in mice. **J Vasc Res.**, v. 48, n. 2, p. 171-183, 2011

ZATZ, R. Fisiopatologia Renal. São Paulo: Atheneu; 2002.

ZAMPAGLIONE, B. et al. Hypertensive urgencies and emergencies. Prevalence and clinical presentation. **Hypertension** v. 27, p. 144-147, 1996.

ZHOU, Q.Y. et al. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A_3 adenosine receptor. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 89, p. 7432–7436, 1992.

ZHU, Y. et al. Iptakalim inhibited endothelin-1-induced proliferation of human pulmonary arterial smooth muscle cells through the activation of K_{ATP} channel. **Vascul. Pharmacol.**, v. 48, n. 2, p. 92-99, 2008.

ZHU, S.P. et al. Continuous fluoxetine administration prevents recurrence of pulmonary arterial hypertension and prolongs survival in rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 36, n. 8, p. e1–e5, 2009.

ZUCKERBRAUN, B.S. et al. Nitrite potently inhibits hypoxic and inflammatory pulmonary arterial hypertension and smooth muscle proliferation via xanthine oxidoreductase dependent nitric oxide generation. **Circulation**, v. 121, n. 1, p. 98-109, 2009.

APÊNCIDE A - ARTIGO CIENTÍFICO

European Journal of Medicinal Chemistry 55 (2012) 49–57



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Original article

Antihypertensive profile of 2-thienyl-3,4-methylenedioxybenzoylhydrazone is mediated by activation of the A_{2A} adenosine receptor

Carla Moreira Leal^{a,1}, Sharlene Lopes Pereira^{a,1}, Arthur Eugen Kümmerle^{b,2}, Daniella Moreira Leal^{a,1}, Roberta Tesch^{c,3}, Carlos M.R. de Sant'Anna^{b,2}, Carlos Alberto M. Fraga^{a,c,1,3}, Eliezer Jesus Barreiro^{a,c,1,3}, Roberto Takashi Sudo^{a,c,1,3}, Gisele Zapata-Sudo^{a,c,1,3}

^a Programa de Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-590, RJ, Brazil

^b Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 23890-000, RJ, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-590, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 February 2012
Received in revised form
26 June 2012
Accepted 28 June 2012
Available online 7 July 2012

Keywords:
N-acylhydrazone
LASSBio-1027
Vasodilator
Antihypertensive
Adenosine agonist

ABSTRACT

Several N-acylhydrazone derivatives synthesized from safrole have been found to promote intense vasodilation and antihypertensive activity. The present work describes the synthesis and antihypertensive profile of 2-thienyl-3,4-methylenedioxybenzoylhydrazone (LASSBio-1027), a new analogue of the lead compound 3,4-methylenedioxybenzoyl-2-thienylhydrazone. Thoracic aortas from Wistar-Kyoto (WKY) rats and spontaneously hypertensive rats (SHR) were prepared for isometric tension recording. Noninvasive blood pressure measurements were made during 14 days of intraperitoneal (10 mg/kg) or oral (20 mg/kg) administration of LASSBio-1027. LASSBio-1027 exhibited partially endothelium-dependent vasorelaxant activity, which was attenuated in the presence of *l*-NAME, glibenclamide, or ZM 241385. LASSBio-1027 exhibited an antihypertensive effect in SHR during 14 days of intraperitoneal or oral administration, but did not induce a hypotensive effect in normotensive WKY rats. LASSBio-1027-induced vascular relaxation of aortas from WKY rats was mediated by the activation of A_{2A} adenosine receptors. Docking studies and binding assays suggested that LASSBio-1027 has affinity for A_{2A} and A_3 adenosine receptors. This new N-acylhydrazone derivative represents a potential strategy for the treatment of arterial hypertension.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.