



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS CHAPECÓ

CURSO DE MEDICINA

ÉRIKA ZACHI GRALAK

MATEUS BARROS MARRA

**EFICÁCIA DE NOVAS MOLÉCULAS ANTI-HIPERTENSIVAS COM ALVO NO
SISTEMA PURINÉRGICO EM MODELOS PRÉ-CLÍNICOS**

UMA REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE

CHAPECÓ

2020

ÉRIKA ZACHI GRALAK

MATEUS BARROS MARRA

**EFICÁCIA DE NOVAS MOLÉCULAS ANTI-HIPERTENSIVAS COM ALVO NO
SISTEMA PURINÉRGICO EM MODELOS PRÉ-CLÍNICOS**

UMA REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE

Artigo resultante do Trabalho de Curso apresentado à
Universidade Federal da Fronteira Sul como parte dos
requisitos para obtenção do grau de Médico (a).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréia Machado Cardoso

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Henrique Manfredi

CHAPECÓ

2020

ERIKA ZACHI GRALAK
MATEUS BARROS MARRA

**EFICÁCIA DE NOVAS MOLÉCULAS ANTI-HIPERTENSIVAS COM ALVO
NO SISTEMA PURINÉRGICO EM MODELOS PRÉ-CLÍNICOS: UMA
REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE**

Trabalho de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de aprovação no respectivo componente da grade do curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul - *campus* Chapecó.

Orientadora: **Prof.^a. Dra Andréia Machado Cardoso**

Este trabalho de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 10/11/2020

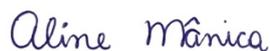
BANCA EXAMINADORA



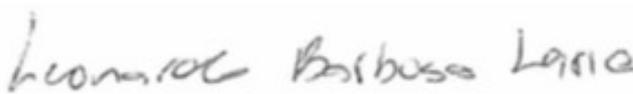
Prof.^(a) Dra Andréia Machado Cardoso (UFFS/Chapecó)
Presidente e Orientadora



Prof. Dr. Leandro Henrique Manfredi (UFFS/Chapecó)
Coorientador



Prof.^(a) Dr.^(a) Aline Mânica (Unochapecó/Chapecó)
Membro da Banca Avaliadora



Prof. Leonardo Barbosa Leiria (UFFS/Chapecó)
Membro da Banca Avaliadora

EFICÁCIA DE NOVAS MOLÉCULAS ANTI-HIPERTENSIVAS COM ALVO NO SISTEMA PURINÉRGICO EM MODELOS PRÉ-CLÍNICOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE

AUTORES: Érika Zachi Gralak (a), Mateus Barros Marra (a), Andréia Machado Cardoso (b) Leandro Henrique Manfredi (b).

(a) Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Medicina, Chapecó, Santa Catarina, Brasil.

(b) Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, Curso de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, Santa Catarina, Brasil.

Correspondências para: Leandro Henrique Manfredi, Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Medicina, campus Chapecó, Chapecó, Santa Catarina, CEP 89802-112, Brasil, Tel.: +55 (49) 988025160; e-mail: leandro.manfredi@uffs.edu.br

Contagem de palavras do manuscrito: 9334

Número de tabelas: 3

Número de figuras: 4

RESUMO

A hipertensão, uma doença crônica caracterizada como condição de elevada pressão arterial, tem alta prevalência no mundo e é responsável por milhões de mortes e complicações todos os anos. A sinalização purinérgica possui um importante papel nos mecanismos da hipertensão, uma vez que os receptores e enzimas purinérgicos agem sinergicamente para manter uma pressão sanguínea e integridade vascular fisiológicas. Em condições de pressão arterial elevada, ocorre uma perturbação na sinalização purinérgica mediada pela adenosina trifosfato (ATP) e seus metabólitos, na expressão ou atividade das enzimas purinérgicas extracelulares e na ativação dos receptores P2 e P1, o que torna o sistema purinérgico um possível alvo terapêutico para essa doença. Nessa revisão, foram selecionados 12 estudos para analisar a efetividade de novas moléculas anti-hipertensivas com alvo em receptores purinérgicos em modelos pré-clínicos. O processo de busca de artigos foi realizado nas seguintes bases de dados eletrônicas: *MEDLINE* via *PubMed*, *Scopus* e *Embase*. A qualidade dos estudos incluídos foi analisada através da ferramenta para risco de viés do *Systematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation (SYRCLE)*. A meta-análise foi realizada utilizando o tamanho do efeito *Hedges g* cujo desfecho primário é a alteração da pressão arterial. Nesse estudo, os dados integrados mostraram que as moléculas que atuam no sistema purinérgico reduzem a pressão sanguínea, o que pode sugerir investigações clínicas futuras. Considerando os mecanismos moleculares, via de administração e qualidade metodológica do estudo, acredita-se que as moléculas AF-219 (antagonista do P2X3), INS45973 (agonista do P2Y2), e *Brilliant blue G* (BBG; antagonista do P2X7) tenham maior potencial terapêutico, o que sugere possível aplicação dessas moléculas em futuros ensaios clínicos.

ABSTRACT

Hypertension (HTN), a chronic disease characterized as an elevated blood pressure condition, has a high prevalence in the world and is responsible for millions of deaths and complications every year. Purinergic signalling plays an important role throughout hypertension mechanisms once purinergic receptors and enzymes act synergically to maintain a physiological blood pressure and vascular integrity. Under increased blood pressure conditions, there is a disturbance in purinergic signalling mediated by adenosine triphosphate (ATP) and its metabolites, in expression or activity of extracellular purinergic enzymes and in activation of P2 and P1 receptors. In this review, we selected 12 studies to analyze the effectiveness of new antihypertensive molecules targeted in purinergic signalling in preclinical models. We searched the following electronic bibliographic databases: *MEDLINE* via *PubMed*, *Scopus* and *Embase*. The quality of the studies included was analyzed by the *SYRCLE*'s risk of bias tool. The data were meta-analyzed through funnel plot and forest plot. According to the qualitative analysis and meta-analysis all molecules low blood pressure significantly, what was demonstrated through the size of the effect. However,

due to molecular mechanisms, route of administration and study quality, AF-219 (P2X3 antagonist), INS45973 (P2Y2 agonist) and Brilliant blue G (BBG; P2X7 antagonist) molecules have a greater therapeutic potential. These results suggest a possible future clinical trial.

PALAVRAS-CHAVE: Pressão arterial, sinalização purinérgica, moléculas anti-hipertensivas, receptores purinérgicos P2X e P2Y.

LISTA DE ABREVIACÕES: ADA, adenosina deaminase; AHA, *American Heart Association*; ATP, adenosina trifosfato; AVC, acidente vascular cerebral; BBG, *Brilliant blue G*; DRG, gânglio da raiz dorsal cervical; E-NPP, ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase; HAS, hipertensão arterial sistêmica; ICC, insuficiência cardíaca congestiva; IM, isquemia miocárdica; MEV, mudança do estilo de vida; NO, óxido nítrico; NTS, núcleo do trato solitário; PAD, pressão arterial diastólica; PAS, pressão arterial sistólica; PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca; RVLM, medula rostral ventrolateral.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	06
2	METODOLOGIA.....	09
2.1	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	09
2.2	PROCESSO DE SELEÇÃO DOS ESTUDOS.....	10
3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	11
4	RESULTADOS.....	12
4.1	META-ANÁLISE.....	12
4.2	SELEÇÃO DOS ARTIGOS.....	12
4.3	DESCRIÇÃO DOS ARTIGOS INCLUÍDOS.....	12
5	MOLÉCULAS AVALIADAS.....	15
6	DISCUSSÃO.....	20
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
	REFERÊNCIAS.....	25
	TABELAS E FIGURAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é uma doença crônica, de caráter multifatorial, com prevalência importante no mundo todo, sobretudo nos países em desenvolvimento, sendo responsável por 10,4 milhões de mortes por ano. De acordo com a *American Heart Association* (AHA), a HAS é caracterizada como uma pressão arterial sistólica (PAS) ≥ 140 mmHg e/ou Pressão Arterial Diastólica (PAD) ≥ 90 mmHg, aferidas em consultório médico e em medições repetidas. A hipertensão é subdividida, ainda, em estágios: pré-hipertensão e hipertensão de estágios 1, 2 e 3 (UNGER *et al.*, 2020).

Essa condição de elevada pressão arterial acomete aproximadamente um terço dos adultos e estima-se que haverá, em 2025, cerca de 1.56 bilhão de adultos hipertensos (SINGH; SHANKAR; SINGH, 2017). Nesse contexto, a HAS representa um grave problema de saúde, provoca grande impacto econômico e é o principal fator de risco para eventos cardiovasculares, acidente vascular cerebral (AVC), falência renal e outras complicações. Entre os fatores de risco para se desenvolver hipertensão, destacam-se: gênero, idade, álcool, doença aterosclerótica, tabagismo e sedentarismo (SINGH; SHANKAR; SINGH, 2017; WEBER *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2017).

Além das medidas de mudança de estilo de vida, o uso de fármacos anti-hipertensivos também se estabelece como um dos pilares do tratamento e manejo da HAS. Entre os principais fármacos atualmente utilizados, encontram-se os diuréticos, bloqueadores dos canais de cálcio, inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA), bloqueadores dos receptores AT1 da angiotensina II e betabloqueadores (UNGER *et al.*, 2020). Apesar de serem medicamentos bem estabelecidos no mercado farmacêutico e na prática clínica, muitos deles apresentam efeitos colaterais importantes, como é o caso de tosse seca no uso dos iECAs e dos distúrbios hidroeletrólíticos no uso dos diuréticos. Além disso, é também evidente a baixa adesão aos medicamentos por parte de muitos pacientes hipertensos e, conseqüentemente, a prevalência de hipertensão refratária ao tratamento (MCBRYDE *et al.*, 2017). Nesse sentido, tendo em vista que já é bem estabelecida a relação entre o sistema purinérgico e várias doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão, as moléculas anti-hipertensivas com ação nesse sistema são apontadas como nova opção de modalidade terapêutica (UNGER *et al.*, 2020; BURNSTOCK, 2017).

O Sistema Purinérgico compreende uma via de sinalização na qual a adenosina trifosfato (ATP) atua como molécula de sinalização extracelular (BURNSTOCK, 1972). A partir da década de 1990, período em que ocorreram estudos mais consolidados a respeito da

sinalização purinérgica, foram descritos e caracterizados os subtipos de purinas e pirimidinas envolvidos no processo de sinalização, sendo eles: quatro subtipos do receptor P1 (adenosina) (A1, A2A, A2B, A3), sete subtipos de receptores de canal iônico P2X (P2X1-P2X7) e oito subtipos de receptores P2Y, receptores acoplados à proteína G (P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14) (BURNSTOCK, 2018). A magnitude da sinalização purinérgica depende do balanço entre ATP gerado e ATP degradado, de modo que uma alteração nesse processo pode levar a um desequilíbrio e contribuir para o desenvolvimento da doença hipertensiva, por exemplo. Nesse sentido, após serem liberados e se ligarem a receptores específicos, o ATP e outros nucleotídeos sofrem degradação pelas enzimas ectonucleotidases, as quais estão localizadas na membrana celular com seu sítio ativo voltado para o meio extracelular (YEGUTKIN, 2014; ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006; VIRGILIO, 2012). Estão incluídas nessa classe de enzimas a ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (ENTPDase/CD39/NTPDase1), ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP) e ecto-5'-nucleotidase (CD73/E-5'-nucleotidase). O ATP e o ADP são hidrolisados, pela E-NTPDases e E-NPPs, a adenosina monofosfato (AMP), a qual, por sua vez, é hidrolisada a adenosina pela CD73. Essa adenosina formada pode ser deaminada, através da enzima adenosina deaminase (ADA), e formar inosina (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006; VIRGILIO, 2012).

Existem mecanismos já estabelecidos por meio dos quais moléculas envolvidas na sinalização purinérgica possam intervir na doença hipertensiva, incluindo-se: a ação de antagonistas dos receptores P2X3 que reduzem a ação simpática e promovem efeitos anti-hipertensivos por ação nos corpos carotídeos (PIJACKA *et al.*, 2016); antagonistas de receptores P2X7, através de uma possível inibição de ação pró-inflamatória desses receptores que, por estarem localizados nos rins, causam um ciclo vicioso entre pró-inflamação, injúria renal e hipertensão (JI *et al.*, 2012; FRANCO *et al.*, 2007); antagonistas P2Y6, possivelmente com ação de prevenção à hipertensão induzida por angiotensina II e relacionada ao envelhecimento (NISHIMURA *et al.*, 2016) e agonistas de receptores P2Y1 e P2Y2, por exemplo, por atividade de vasodilatação. O conhecimento desses mecanismos é importante para a compreensão da sinalização purinérgica na fisiopatologia da HAS e, consequentemente, para o desenvolvimento de moléculas que possam servir como potenciais métodos terapêuticos (BURNSTOCK, 2017).

O objetivo deste artigo de revisão e meta-análise é sintetizar os principais estudos referentes aos efeitos anti-hipertensivos de diversas moléculas com ação em receptores purinérgicos em modelos animais e discutir a real eficácia dessas moléculas já desenvolvidas

quanto à sua aplicabilidade como drogas para a HAS. Os resultados encontrados apontam possíveis potenciais terapêuticos da sinalização purinérgica para o tratamento da hipertensão e fornecem subsídios para futuros ensaios clínicos.

2 METODOLOGIA

Essa meta-análise foi conduzida de acordo com as diretrizes do “*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*” (PRISMA). A possibilidade de viés e a qualidade metodológica dos estudos incluídos foram avaliadas através da ferramenta para risco de viés do *SYstematic Review Centre for Laboratory Animal Experimentation* (SYRCLE), destinado a estudos em animais.

Estratégias de busca: uma meticulosa busca da literatura foi realizada nas bases de dados, durante o mês de dezembro de 2019, a fim de encontrar publicações que analisam a queda da pressão arterial através de moléculas que agem no sistema purinérgico em modelos pré-clínicos. Os estudos foram obtidos a partir das bases de dados *MEDLINE* via *PubMed*, *Scopus* e *Embase*. Os descritores utilizados como estratégia de busca foram: (*P2X7 receptor*) or (*P2X1 receptor*) or (*P2Y1 receptor*) or (*P2Y2 receptor*) or (*P2X3 receptor*) or (*P2X2 receptor*) or (*P2X4 receptor*) or (*P2X5 receptor*) or (*P2X7 receptor*) or (*P2Y4 receptor*) or (*P2Y6 receptor*) or (*P2Y11 receptor*) or (*P2Y12 receptor*) or (*P2Y13 receptor*) or (*P2Y14 receptor*)) and “*Blood pressure*”, em acordo com os termos indexados pelo *Medical Subject Headings* (MeSH) (tabela 1).

2.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO

Os artigos foram selecionados de acordo com os seguintes critérios de inclusão: estudos pré-clínicos conduzidos em ratos ou camundongos nos quais houve a administração de uma molécula com mecanismo de ação sobre o sistema purinérgico e que resulte em influência na pressão arterial.

Foram excluídos os estudos que continham pelo menos um dos critérios de exclusão: artigos que não fossem escritos nas línguas Inglês, Português ou Espanhol; modelos pré-clínicos que utilizassem outros animais que não fossem ratos ou camundongos; estudos em modelos clínicos ou *in vitro*; moléculas que já fossem drogas utilizadas no campo farmacêutico; artigos aos quais não fosse possível o acesso ao texto completo; textos nos formatos de resumo, carta, reuniões e conferências.

2.2 PROCESSO DE SELEÇÃO DE ESTUDOS

Após a busca dos estudos, por meio dos descritores nas respectivas bases de dados (tabela 1), esses artigos foram exportados para o “Rayyan”, uma ferramenta online e gratuita, com intuito de reunir os artigos encontrados nas diferentes bases de dados e otimizar o processo de filtragem dos artigos elegíveis à revisão sistemática. Inicialmente, 925 referências foram obtidas, de acordo com as estratégias de busca. 401 desses 925 artigos foram eliminados por serem duplicados, restando, assim, 524 artigos que foram submetidos à análise. Os dois avaliadores, em seguida, leram o resumo desses 524 artigos e verificaram se havia algum dos critérios de exclusão já mencionados. A partir dessa etapa, 468 artigos foram excluídos, restando 56 estudos que foram selecionados para serem lidos integralmente pelos avaliadores. Dos 56 artigos lidos integralmente, 44 foram eliminados com justificativa (figura 1). Ao final do processo de seleção, um total de 12 artigos foi capaz de responder à pergunta inicialmente proposta no presente trabalho, isto é, apontar a eficácia de moléculas anti-hipertensivas cujo mecanismo de ação seja no sistema purinérgico, em conformidade com os critérios de elegibilidade estabelecidos. Os resultados referentes a esses 12 artigos finais foram também incluídos na meta-análise, para fins de avaliação quantitativa.

Extração de dados e avaliação de risco de viés: as seguintes informações de cada estudo estão descritas nas tabelas 2 e 3: (1) dados dos animais, incluindo espécie, linhagem, sexo e peso; (2) como a hipertensão foi induzida, se ocorreu espontaneamente ou se eram modelos normotensos; (3) intervenções, como via de administração de drogas, duração do tratamento e dose; (4) métodos experimentais e resultados; (5) autores e ano da publicação. O programa *ImageJ* foi utilizado para extrair valores numéricos de gráficos que não estavam disponíveis no texto do estudo. Para avaliar o risco de viés dos estudos incluídos, a ferramenta do “*Systematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation*” (SYRCLE) foi utilizada, a qual é especificamente planejada para estudos animais.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi adotado o índice de *Hedge's g* a fim de analisar as diferenças de redução da pressão arterial, estimando assim o tamanho do efeito. Foi comparada a redução entre a pressão arterial média dos diferentes estudos e, naqueles cujas informações eram insuficientes, foi comparada a diferença entre pressão arterial sistólica/diastólica inicial e pressão arterial sistólica/diastólica final.

A seleção de um modelo de efeitos aleatórios com o índice de *Hedge's g* foi usada com base na suposição de um erro de amostragem (erro dentro do estudo) e variância entre os estudos (alta heterogeneidade nas metodologias dos estudos). Além disso, o índice *Hedge's g* foi selecionado, pois evita, ainda, a superestimação de um tamanho de efeito ao agrupar resultados de menos de ~ 20 estudos. A heterogeneidade foi avaliada usando as estatísticas Q e I^2 de Cochran. Os tamanhos de efeito foram codificados de modo que os números positivos refletissem a redução da pressão arterial, e os valores negativos o aumento desse desfecho em comparação com o respectivo grupo. Para cada medida dependente, foi relatado um erro padrão e o respectivo intervalo de confiança (IC) de 95%. Os tamanhos de efeito foram categorizados da seguinte forma: 0,20-0,49, pequeno; 0,50–0,79, médio; 0,80-1,1, grande; e $\geq 1,2$, muito grande (figura 2).

O viés de publicação foi avaliado por meio do gráfico de funil. No caso de viés de publicação significativo, o procedimento estatístico de corte e preenchimento foi calculado e adicionado no lado direito ou esquerdo do gráfico. Este procedimento adiciona ou remove estudos para equilibrar um gráfico de funil que seja assimétrico. As análises foram conduzidas usando o pacote de software estatístico de livre acesso “*metaphor*” no Stata v.16.0 (figura 3).

4 RESULTADOS

4.1 META-ANÁLISE

Doze estudos foram incluídos na análise da pressão arterial. Os resultados agrupados demonstraram que as moléculas cujo mecanismo de ação envolve o sistema purinérgico promovem uma diminuição da pressão arterial (ES: 2.87;1.82, 3.92, $P < 0,00$) (fig. 2). A análise do gráfico de funil foi realizada para todas as comparações e não houve risco de viés e assimetria.

4.2 SELEÇÃO DE ARTIGOS

Das 524 referências inicialmente rastreadas, 467 delas foram excluídas por não se enquadrarem nos critérios de inclusão. Os artigos eliminados e seus respectivos motivos de exclusão estão descritos na figura 1.

Após a etapa inicial de seleção, 57 estudos potencialmente relevantes foram identificados e selecionados para avaliação minuciosa, por meio da leitura de todo o texto. Por fim, após avaliação integral desses artigos, 45 estudos foram excluídos por não estarem de acordo com os critérios de elegibilidade, e 12 deles foram incluídos nas análises qualitativa e quantitativa. Um resumo é fornecido no diagrama de fluxo (fig. 1).

4.3 DESCRIÇÃO DOS ARTIGOS INCLUÍDOS

Dentre os doze estudos selecionados, duas espécies animais foram observadas: ratos (n=9) e camundongos (n=3), divididos nas seguintes linhagens: *Wistar* (n=3); *Dahl salt-sensitive* (DS) (n=1); *LEW rats* (n=1); *Sprague-Dawley* (SD) (n=4); ratos espontaneamente hipertensos (SH) (n=1); ratos com *background* genético SV129/C57BL6 (n=1); e ratos com *background* genético do tipo 129Sv/J (n=1). Três estudos utilizaram animais adultos, um artigo utilizou animais entre 4 e 5 semanas ou 14 e 16 semanas de idade; um deles utilizou animais entre 4 e 6 semanas de idade; um utilizou animais entre 6 e 8 semanas de idade e seis deles não mencionaram a idade dos animais utilizados. Sobre o sexo dos animais, dez referências usaram animais machos, enquanto dois outros estudos não especificaram o sexo dos animais usados. O peso da população de animais analisada variou de acordo com cada

estudo, com ratos ou camundongos pesando entre de 70g e 400g. Houve uma variação maior de 50g em apenas um estudo. As especificações de cada estudo são apresentadas na tabela 2.

A condição quanto à pressão arterial desses animais foi a seguinte: animais normotensos (n=4); animais espontaneamente hipertensos (HS) (n=1); hipertensão induzida por dieta rica em sódio (n=1); desregulação da pressão arterial devido à disfunção cardíaca subjacente, como insuficiência cardíaca isquêmica e oclusão de artéria coronária (n=2); distúrbio na pressão arterial secundário a *background* genético (n=1); hipertensão induzida por ANG-II (n=1); hipertensão induzida por α,β -MeATP (n=1); e hipertensão induzida por PPADS (n=1).

Para analisar a influência que moléculas com alvo na sinalização purinérgica têm na pressão arterial desses animais, de acordo com cada estudo, foram utilizados agentes agonistas ou antagonistas purinérgicos. As moléculas utilizadas nos doze estudos foram as seguintes: α,β -MeATP, um agonista dos receptores P2X (n=3); BBG, um antagonista específico do receptor P2X7 (n=2); PPADS, um antagonista não seletivo do receptor P2 (n=1); INS45973, molécula que atua como agonista do receptor P2Y2/4 (n=2); MRS2179, um agonista do receptor P2Y1 (n=1); AF-219, antagonista específico do receptor P2X3 (n=1); MRS2578, um antagonista do receptor P2Y6 (n=1); CGS21680, agonista do receptor A2A (n=1); Ap4A, agonista dos receptores P2Y1 e A2 (n=1) e 2-MeSATP, agonista dos receptores P2Y (n=1).

O número de grupos, assim como o número de animais por grupo, variou de acordo com cada estudo, sendo esses dados representados na tabela 3. Além disso, de acordo com a molécula testada, uma quantidade específica do composto foi infundida. Foi analisada a ação da molécula no Núcleo do Trato Solitário (NTS) (n=3); nos neurônios C1 da medula ventrolateral rostral (RVLM) (n=1), no corpo carotídeo (n=1), acima do receptor P2X7 expresso no rim de ratos sensíveis ao Sódio (n=1), nos gânglios da raiz dorsal cervical (DRG) e em gânglios cervicotorácicos (n=1), na Veia Cava Inferior (VCI) (n=1), na aorta torácica e células do músculo liso vascular (n=1), células endotéliais do sistema cardiovascular sistêmico (n=1), e no endotélio vascular e rim (n=2).

Em relação ao modo de aferição da pressão arterial, alguns estudos o fizeram por meio de método não invasivo que avalia a PA por meio da artéria caudal (n=3), outros por inserção de cateter em artéria femoral (n=5) e os demais por meio de cateter associado a um transdutor de pressão, sem descrição da artéria de inserção (n=2); por meio da colocação de cânula de um transmissor inserida acima da bifurcação ilíaca (n=1) e via cateter inserido na artéria

femoral direita e conectado a um transdutor de pressão com espectrometria de Viggo TXX-R (n=1).

Entre os 12 estudos selecionados, dez deles demonstraram uma diminuição significativa da pressão arterial média (PAM), variando de -18,3 mmHg a -54,5 mmHg, e dois preveniram o aumento dos níveis pressóricos, alterando o curso natural da fisiopatologia da doença hipertensiva. A redução da PAM observada em cada estudo, de acordo com a molécula administrada, está descrita a seguir.

5. MOLÉCULAS AVALIADAS

As moléculas incluídas na meta-análise apontam tamanho de efeito significativo, isto é, a redução da pressão arterial nos animais que receberam as moléculas anti-hipertensivas teve resultado significativo em relação aos grupos controle. Os estudos apresentam padrão de heterogeneidade relativamente alto ($T^2 = 3,97$, $I^2 = 89,40\%$, $H^2 = 9,43$), conforme já esperado, por se tratarem de ensaios pré-clínicos com diferentes modelos animais, contudo, isso não interferiu no efeito final da análise (fig. 2).

α,β -methylene ATP (α,β -MeATP)

Três estudos avaliaram o efeito da molécula *a,b-methylene* ATP (α,β -MeATP), um análogo de ATP e agonista específico dos receptores P2X (SCISLO *et al.*, 1997). A molécula foi administrada na região subpostremal do núcleo do trato solitário (NTS) de ratos da linhagem *Sprague-Dawley* na dose de 100 pmoles em todos os estudos. Barraco *et al.* (1996) e Kitchen *et al.* (2001) utilizaram 7 animais no grupo analisado, e Scislo *et al.* (1997) realizaram o estudo com 17 animais. Nos três ensaios, os grupos que receberam a molécula α,β -MeATP tiveram uma redução significativa da PAM ($p < 0,001$), em comparação com o grupo controle, e demonstraram uma redução média da PAM de 43,9 mmHg. Os intervalos de confiança para cada estudo foram os seguintes: Barraco *et al.* (IC a 95%: 5.07-11.53), Kitchen *et al.* (IC a 95%: 3.38-9.05), Scislo *et al.* (IC a 95%: 5.10-9.44) (fig. 2).

2-MeSATP

Zhao *et al.* (2000) analisaram o composto 2-MeSATP, um agonista seletivo dos receptores P2Y, que estão presentes em células endoteliais do sistema cardiovascular e são responsáveis por promover vasodilatação. Os animais observados foram divididos em um grupo com insuficiência cardíaca congestiva induzida e outro grupo controle (submetidos a cirurgia placebo). Foi realizada administração intra-aórtica dessa molécula na dose de 3nmol/kg, o que provocou uma redução significativa na PAM do grupo que recebeu 2-MeSATP em comparação com o grupo controle, o que evidenciou, como resposta máxima, uma queda de 46,5 mmHg na PAM (IC a 95%: 0.45-3.57) ($p < 0,001$) (fig. 2).

AF-219

A molécula AF-219 se caracteriza como antagonista específico de receptores P2X3, os quais se localizam especialmente no corpo carotídeo. PIJACKA *et al.* (2016) analisaram o efeito dessa molécula sobre a pressão arterial de ratos da linhagem *winstar*, comparando esses ratos com outros espontaneamente hipertensos. Ambos os grupos eram compostos por 7 animais. A administração da molécula foi feita por via endovenosa, na dose de 8 mg/kg por hora. Após uma hora de experimento, foi observada redução dose-dependente da pressão arterial, associada à redução da frequência cardíaca (FC) e também da frequência respiratória. Ratos espontaneamente hipertensos, ao final do estudo, atingiram uma redução na PA de 28 mmHg (IC a 95%: 1.55-4.02) para PAS e de 26mmHg para PAD (IC a 95%: 1.27-3.42) ($p < 0,001$).

INS45973

Dois estudos observaram os efeitos da molécula INS45963, um agonista do receptor P2Y2/4 (RIEG *et al.*, 2011; RIEG *et al.*, 2015). Ambos os estudos compararam animais da linhagem selvagem e analisaram, após administração da molécula de maneira endovenosa, o comportamento de receptores de purinas localizados no endotélio vascular e nos rins. No primeiro, os animais foram submetidos a uma dose de 1 mg/kg de peso corporal, apresentando, ao final do experimento, uma queda na PA de 35 mmHg (RIEG *et al.*, 2011) (IC a 95%: 1.25-3.37) ($p < 0,001$). O segundo, por sua vez, analisou a mesma linhagem de ratos, mas aplicou doses de 3 mg/kg de massa corporal. Inicialmente, os animais tinham uma pressão arterial de 93 ± 3 mmHg e, ao final do experimento, houve uma redução na PA de 36 mmHg (IC a 95%: 2.20-5.16) ($p < 0,001$) (fig. 2). É válido lembrar que, como a molécula INS45973 não contém adenina, não há metabolismo para adenosina e, consequentemente, os receptores de adenosina (A1, A2A, A2B, A3) não são ativados (RIEG *et al.*, 2015).

Ap4A

A eficácia da Ap4A, um polifosfato de diadenosina, agonista dos receptores P2Y1 e A2, foi avaliada por meio da comparação entre animais que não receberam a molécula e animais que a receberam na dose de 109 nmol/kg por minuto. No estudo em questão, a redução da PAM foi de 29,4 mmHg (IC a 95%: 0.23-3.16); ($p < 0,001$). O modo de administração da molécula foi endovenoso, por meio de aplicação na veia jugular, sendo os receptores P2Y1 e A2, alvos da Ap4A, comumente localizados na Veia Cava Inferior (STEINMETZ *et al.*, 2000).

CGS 21680

A molécula CGS21680, um agonista do receptor de purina A2A, teve sua ação avaliada sobre receptores A2A localizados no subnúcleo postremal do Núcleo do Trato Solitário (NTS). A molécula foi administrada na dose de 20 pmoles, por meio de microinjeções unilaterais no terço médio-caudal do NTS, sendo que os ratos que receberam a aplicação de CGS21680 apresentaram uma redução da PA de 22,8 mmHg (IC 95%: 1.47-4.71) ($p < 0,001$) em comparação ao grupo controle. Para ambos os grupos, a PA foi aferida por meio de cateter inserido em artéria femoral direita (BARRACO *et al.*, 1996).

Brilliant blue G (BBG)

Dois estudos investigaram os efeitos da molécula *Brilliant blue G* (BBG) sobre a pressão sanguínea (Tu *et al.*, 2016; Ji *et al.*, 2012). O BBG atua como antagonista específico do receptor P2X7. De acordo com o estudo de Ji *et al.*, a análise se deu por meio dos receptores localizados nos rins dos ratos analisados no estudo. Para isso, foi administrada uma quantidade de 50 mg/kg por dia da droga, durante um período de 4 semanas. Por meio da comparação entre ratos que receberam a molécula de BBG e ratos que receberam somente solução veículo (controle), foi observada, com a administração da molécula, uma prevenção do aumento da Pressão Arterial, isto é, permitiu que a PAS aumentasse em menor proporção quando comparado ao curso natural da doença (IC a 95%: 1.54-4.52) ($p < 0,001$). O estudo de Tu *et al.*, por sua vez, analisaram o efeito da molécula sobre os nervos do gânglio da raiz dorsal cervical (DRG) e gânglio cervicotorácico, comparando quatro grupos de animais: grupo submetido à isquemia miocárdica (MI) que utilizou solução salina; submetidos à isquemia miocárdica que receberam a molécula BBG; ratos submetidos à cirurgia placebo sem administração da molécula e ratos submetidos à cirurgia placebo que receberam BBG. Por meio da aplicação de BBG na dose de 30 mg/kg, dissolvido em solução salina, a uma concentração final de 0,2 mg/ml, administrado diariamente durante 20 dias, notou-se redução da PAS de 18,56 mmHg (IC a 95%: 0.42-2.54) e da PAD de 18,36 mmHg (IC a 95%: 0.52-2.67) nos ratos com lesão isquêmica prévia que receberam a molécula de BBG. O resultado aponta contenção significativa do aumento da PA ($p < 0,001$). Ambos utilizaram métodos não invasivos de aferição da PA por meio da artéria caudal.

PPADS

Wenker *et al.*, (2013) analisaram a molécula PPADS, um antagonista não específico dos receptores P2. O tratamento com essa molécula, na dose de 100 μ M-50 nl, foi aplicado na medula ventrolateral rostral de ratos *Wistar*. Após esse procedimento, houve uma prevenção significativa do aumento da PA ($p < 0,001$), e foi observada uma elevação da PAM de 12 mmHg no grupo de animais que recebeu PPADS e de 25 mmHg no grupo controle (IC a 95%: 0.03-2.33) (fig.2).

MRS2179

A molécula MRS2179 atua como um antagonista dos receptores P2Y1. No estudo de Wenker *et al.* (2013), a administração dessa molécula, na dose de 100 μ M- 50 nl, na medula ventrolateral rostral de ratos *Wistar*, preveniu a elevação da PA significativamente ($p < 0,001$). Ocorreu um aumento na PAM de +15 mmHg no grupo em que foi aplicada a molécula MRS2179, em contraste com o grupo controle, que teve um aumento na escala de +22 mmHg (IC a 95%: 0.59-1.54) (fig. 2).

MRS2578

Nishimura *et al.* (2016) avaliaram os efeitos da molécula MRS2578, um antagonista seletivo dos receptores P2Y6, sobre os níveis pressóricos de camundongos C57BL/6. Essa molécula foi administrada na dose de 2mg/kg por dia, durante quatro semanas, através de uma mini bomba osmótica (ALZET) implantada intraperitonealmente nos camundongos. Ao fim do procedimento, observou-se uma prevenção do aumento da PA estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Assim, a elevação da PAM foi de 8,2 mmHg nos animais que receberam a molécula MRS2578, e de 22,3 mmHg no grupo controle (IC a 95%: 0.39-3.11) (fig. 2).

ANÁLISE DO RISCO DE VIÉS

É de extrema relevância avaliar a qualidade de estudos animais, tendo em vista que eles são uma transição importante para ensaios clínicos. O viés, em qualquer nível, pode comprometer o significado de um trabalho científico. Desse modo, o risco de viés é uma ferramenta de muita importância para avaliar qualquer estudo.

Foi utilizada a ferramenta SYRCLE's para fins de análise do risco de viés dos estudos incluídos nesta meta-análise. Essa é uma ferramenta desenvolvida pela *Cochrane*

Collaboration, criada especialmente para ser utilizada em ensaios pré-clínicos (HOOIJMANS *et al.*, 2014). O risco de viés dos doze estudos incluídos na descrição quantitativa e qualitativa é mostrado na figura 4. O termo “SIM” (S) indica baixo risco de viés, e o “NÃO” (N), alto risco de viés. A expressão “Não Claro” (NC) é usada quando não há informações suficientes no estudo para se fazer o julgamento do risco de viés. Em relação à análise estatística, concluiu-se que o risco de viés não pode ser atribuído à distribuição dos estudos (Fig. 3).

6 DISCUSSÃO

Comprovar a redução da pressão arterial ou inibir seu aumento, em associação à segurança de administração e especificidade do composto, a fim de minimizar efeitos adversos, são características necessárias às moléculas anti-hipertensivas com atuação sobre a sinalização purinérgica, para que possam, futuramente, serem inseridas na prática clínica (PIJACKA *et al.*, 2016). As moléculas incluídas nessa meta-análise apontam resultados promissores, já que elas promovem uma redução da PA. Nesse sentido, moléculas como AF-219, BBG e INS45973 comprovaram, por meio dos estudos pré-clínicos, boa eficácia quanto à redução da pressão arterial, considerando-se a forma de administração, população analisada e metodologias de estudo utilizadas.

A molécula de ATP é liberada das células endoteliais e atua em receptores P2Y2 dessas mesmas células, liberando óxido nítrico (NO), o que resulta em vasodilatação e queda da pressão arterial (WANG *et al.*, 2015). De fato, Rieg *et al.* (2015) demonstraram que uma ativação do receptor P2Y2, após administração da molécula INS45973, gera uma redução da PAM não só pela ação do NO, mas também, possivelmente, através do fator de hiperpolarização derivado de endotélio, o que sugere uma queda dos níveis pressóricos relacionada à resistência periférica, já que não há alteração da frequência cardíaca após a ativação do receptor P2Y2. Dessa forma, como uma ativação sistêmica dos receptores P2Y2 promove uma redução da PA e, ainda, segundo Rieg *et al.* (2011), inibe a reabsorção renal de sódio, a molécula INS45973 e outros agonistas P2Y2 são alvos potenciais para o tratamento da hipertensão arterial sistêmica primária. Além disso, a ativação dos receptores P2Y2 também tem demonstrado resultados promissores em outras enfermidades cardiológicas, uma vez que se associa à redução da hipóxia e isquemia miocárdica (HOCHHAUSER *et al.*, 2013).

A molécula *gefapixant* (AF-219), antagonista do receptor P2X3, demonstrou aplicabilidade, especialmente, na doença hipertensiva primária, que cursa com hiperativação simpática por meio dos corpos carotídeos como mecanismo fisiopatológico (MCBRYDE *et al.*, 2017). Um efeito comum aos antagonistas não seletivos dos receptores P2X3 e P2X2 é a alteração do paladar, efeito que parece não ocorrer na administração de AF-219, já que tem alta especificidade ao receptor P2X3 (MARUCCI *et al.*, 2019). No estudo de Pijacka *et al.* (2016), houve administração da molécula por via endovenosa, o que pode, por se tratar de

administração sistêmica, estender a ação da molécula a outros sítios, que devem ser melhor avaliados em casos de possíveis efeitos adversos. Todavia, como já mencionado anteriormente, a molécula AF-219 tem demonstrado alta seletividade ao receptor alvo, mostrando-se como uma boa opção terapêutica, no caso de sucesso em futuros ensaios clínicos, o que também já foi destacado por Burnstock (2017) previamente. Além disso, de acordo com os estudos, o AF-219 também não foi capaz de atingir o leito arterial do sistema nervoso central (PIJACKA *et al.*, 2016). A molécula já foi aplicada, inclusive, em ensaio clínico, que analisou a eficácia da droga no tratamento de tosse crônica refratária. As maiores dificuldades do estudo foram determinar a dose terapêutica adequada e segurança em longo prazo. Alguns dos voluntários também apresentaram efeitos adversos de alteração do paladar (ABDULQAWI *et al.*, 2015).

Um papel importante no desenvolvimento da hipertensão é representado pelo receptor P2X7, o que ocorre, provavelmente, porque uma estimulação desse receptor gera uma ação pró-inflamatória, levando à liberação de IL-1 beta, IL-18 dos macrófagos e IL-2 das células T. Voned *et al.* (2004) já haviam relatado uma maior expressão do receptor P2X7 nos glomérulos de ratos transgênicos hipertensos, quando comparados a ratos normais. A hemodinâmica glomerular é restaurada quando um antagonista dos receptores P2X7 é administrado em ratos infundidos com angiotensina II (FRANCO *et al.*, 2017). A molécula *Brilliant Blue G* (BBG), nesse sentido, demonstrou respostas otimistas, dado sua baixa toxicidade e alta seletividade para receptores P2X7 localizados tanto nos rins dos animais estudados (JI *et al.*, 2012) quanto em nervos do gânglio da raiz dorsal cervical (DRG) e gânglios cervicotorácicos (Tu *et al.*, 2013). Nesse contexto, são necessários estudos mais consolidados para avaliar os efeitos dessa molécula em outros órgãos e sistemas nos quais o receptor P2X7 está localizado.

A molécula α,β -MeATP, agonista específico dos receptores P2X, e a molécula CGS21680, agonista específico dos receptores A2A, demonstrou efeito importante sobre a redução da pressão arterial. Microinjeções dessa molécula no núcleo do trato solitário (NTS), principal sítio integrativo no tronco encefálico envolvido no controle autonômico central, geram grande redução dose-dependente na PAM. Quanto ao mecanismo de ação da molécula α,β -MeATP, isso ocorre, provavelmente, porque a ativação dos purinoreceptores P2X no NTS promove inibição da atividade simpática e, na dose estudada (descrita nos resultados), tanto o débito cardíaco quanto a resistência periférica total são reduzidos, o que contribui para a queda da pressão arterial. O mecanismo de ação da molécula CGS21680 ocorre de modo

semelhante à do α,β -MeATP, porém com ação anti-hipertensiva mais prolongada (SCISLO *et al.*, 1997; BARRACO *et al.*, 1996; KITCHEN *et al.*, 2001). No entanto, como a intenção nesses estudos incluídos na meta-análise era avaliar a relação entre o sistema nervoso simpático e o tônus vasomotor, essas moléculas foram administradas em um local altamente específico no sistema nervoso central, e não de forma sistêmica, o que traz muitas limitações quanto a seu possível uso na prática clínica, visto que os receptores purinérgicos estão distribuídos em vários órgãos e sistemas, o que implicaria em respostas diversas, tanto de ativação quanto de inibição da sinalização purinérgica (BURNSTOCK, 2014).

O receptor para angiotensina (Ang) do tipo I também tem envolvimento na progressão da hipertensão, uma vez que esse receptor tem relação importante com a homeostase vascular. Uma expressão desequilibrada dos receptores para angiotensina tipo I pode culminar em elevação da pressão arterial. Na busca de compreender como ocorre essa transição entre estado fisiológico para patológico, Nishimura *et al.* (2016) observaram que o receptor P2Y6 promove hipertensão induzida por Ang II, de modo que esse receptor purinérgico forma um heterodímero estável com o receptor de angiotensina I, levando a uma hipertrofia vascular. Para confirmar essa análise, foi realizada a ruptura desse heterodímero com o antagonista do receptor P2Y6, MRS2578, administrando-o sistemicamente, e, como resultado, houve supressão da hipertensão induzida por Ang II nos camundongos estudados. Esse mesmo resultado não foi obtido com a losartana, antagonista do receptor de angiotensina do tipo I. Alguns estudos, no entanto, embora tenham limitações de trabalho evidentes, apontam que esse mesmo antagonista do receptor P2Y6 (MRS2578) seja fator importante no desenvolvimento e progressão desfavorável de aneurismas de aorta abdominal. Nesse sentido, estudos mais consistentes merecem ser realizados a fim de avaliar tal relação e identificar o envolvimento da ativação ou inativação do receptor purinérgico em diferentes tecidos vasculares (Xiao DU *et al.*, 2020).

A resposta simpático-estimulatória à ativação quimiorreceptora periférica está diretamente ligada aos neurônios catecolaminérgicos C1 da medula rostral ventrolateral (RVLM), de modo que uma ativação desse reflexo parece estar envolvida na gênese da hipertensão, conforme relataram Wenker *et al.* (2013). Os autores demonstraram que uma inibição do receptor P2Y1, na RVLM, através do antagonista seletivo MRS2365, diminui a ativação dos quimiorreceptores periféricos relacionados à pressão arterial, o que, conseqüentemente, reduz os níveis pressóricos. Nesse mesmo estudo, o antagonista não específico de receptores P2, PPADS, também foi aplicado na mesma região e obteve resultados similares à molécula

MRS2365. Todavia, por se tratar de uma aplicação em região altamente específica do sistema nervoso central, não é plausível, através deste estudo, sugerir um possível ensaio clínico com essas moléculas, já que elas não foram administradas de maneira sistêmica, o que limita o conhecimento de possíveis respostas purinérgicas em outros tecidos.

Já é bem estabelecido também que, em um estado de insuficiência cardíaca congestiva (ICC), ocorrem mudanças neuro-hormonais que se caracterizam por uma atividade simpática periférica acentuada, o que provoca um aumento na liberação de ATP, além de outras substâncias. De acordo com esse mecanismo, que também influi na progressão da doença hipertensiva, Zhao *et al.* (2000) demonstraram uma queda na PAM de ratos com ICC induzida, em comparação ao grupo placebo, após administração da molécula 2-MeSATP, sugerindo uma vasodilatação dependente de endotélio, visto que essa molécula é um agonista P2Y. Tal achado pode ser fonte de buscas terapêuticas tanto para ICC quanto para HAS e, assim como outras moléculas, também teria indicação para populações selecionadas portadoras de hipertensão arterial.

O composto Ap4A (polifosfato de diadenosina), um neurotransmissor associado a ATP e catecolaminas, é liberado de plaquetas humanas e se caracteriza como um potente agente vasoativo. A princípio, conforme Steinmetz *et al.* (2000), os efeitos vasoativos dessa molécula parecem ser restritos a condições de tônus basal, no entanto, devido a seu efeito hipotensivo sistêmico, o Ap4A e seus metabólitos se tornam fortes candidatos para a redução da PA em humanos (STEINMETZ *et al.*, 2000).

Nesse contexto, a despeito dos resultados anti-hipertensivos positivos em relação à atuação das moléculas que atuam sobre a sinalização purinérgica, avaliações quanto aos possíveis efeitos adversos sistêmicos merecem ser feitas. Na sua maioria, as moléculas possuem administração sistêmica, o que pode desencadear outros efeitos na sinalização de receptores diversos, localizados em outros tecidos e sistemas. Dessa forma, estudos mais consolidados são necessários, a fim de avaliar os efeitos sistêmicos desses compostos para que, em breve, possam ser considerados em estudos clínicos.

Ademais, de acordo com essa meta-análise, todas as moléculas deste estudo promovem uma redução significativa da PA (fig. 2). Também é possível observar que os estudos pré-clínicos incluídos na meta-análise têm elevado grau de heterogeneidade, conforme esperado, comprovada qualitativa e estatisticamente, isto é, as diferenças entre as populações de animais estudadas não permitem fazer uma comparação direta entre os

benefícios e fragilidades de cada molécula. Para tal, é necessário padronizar uma população de animais específica, além da quantidade de dose infundida e via de administração da molécula, a fim de fazer análises diretas em relação ao tamanho do efeito de cada molécula.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A meta-análise realizada neste estudo confirmou que todas as moléculas com alvo em receptores purinérgicos analisadas são eficazes em reduzir a pressão arterial ou em impedir a progressão da pressão arterial, em estudos pré-clínicos. Considerando-se a análise qualitativa elaborada sobre os estudos da presente revisão sistemática, é possível destacar que, principalmente, as moléculas BBG (antagonista do P2X7), INS45973 (agonista do P2Y2) e AF-219 (antagonista do P2X3) apontam eficácia importante sobre a redução da pressão arterial em modelos animais, devido à forma de administração, mecanismos moleculares e metodologias de estudo aplicadas. São necessários, no entanto, estudos mais consistentes e homogêneos para avaliar efeitos sistêmicos e dose de segurança dessas moléculas, além de analisar modelos de estudo que permitam a comparação direta entre essas moléculas. Além disso, é preciso avaliar, ainda, se as respostas induzidas são sustentadas e compatíveis para o manejo da hipertensão arterial sistêmica.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver quaisquer conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- ABDULQAWI, R. et al. P2X3 receptor antagonist (AF-219) in refractory chronic cough: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 study. *The Lancet*, v. 385, n. 9974, p. 1198–1205, 28 mar. 2015.
- BARRACO, R. A. et al. Activation of purinergic receptor subtypes in the nucleus tractus solitarius elicits specific regional vascular response patterns. *Journal of the Autonomic Nervous System*, v. 59, n. 3, p. 113–124, jul. 1996.
- Borenstein, M., Hedges, L.V., Higgins, J.P.T., Rothstein, H.R.: A basic introduction to fixed-effect and random-effects models for meta-analysis. *Res. Synth. Methods*. 1, 97–111 (2010). <https://doi.org/10.1002/jrsm.12>
- BURNSTOCK, G.; PELLEG, Amir. Cardiac purinergic signalling in health and disease. *Purinergic Signalling*, [s.l.], v. 11, n. 1, p.1-46, 20 dez. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11302-014-9436-1>.
- BURNSTOCK, G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Frontiers in Pharmacology*, v. 8, p. 661, 25 set. 2017.
- BURNSTOCK, G. The therapeutic potential of purinergic signalling. *Biochemical Pharmacology*, [S.L.], v. 151, p. 157-165, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2017.07.016>.
- Cohen, J.: Statistical power analysis. *Curr. Dir. Psychol. Sci.* 1, 98–101 (1992). <https://doi.org/10.1111/1467-8721.ep107687>
- DOMINGUEZ RIEG, J. A. et al. P2Y₂ receptor activation decreases blood pressure via intermediate conductance potassium channels and connexin 37. *Acta Physiologica*, v. 213, n. 3, p. 628–641, mar. 2015.
- Duval, S., Tweedie, R.: Trim and fill: A simple funnel-plot-based method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis. *Biometrics*. 56, 455–463 (2000). <https://doi.org/10.1111/j.0006-341x.2000.00455.x>
- Egger, M., Davey Smith, G., Schneider, M., Minder, C.: Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ*. 315, 629–634 (1997). <https://doi.org/10.1136/bmj.315.7109.629>
- FRANCO, M. et al. Physiopathological implications of P2X1 and P2X7 receptors in regulation of glomerular hemodynamics in angiotensin II-induced hypertension. *American Journal Of Physiology-renal Physiology*, [s.l.], v. 313, n. 1, p.9-19, jul. 2017. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00663.2016>.
- FRANCO, M. et al. Renal angiotensin II concentration and interstitial infiltration of immune cells are correlated with blood pressure levels in salt-sensitive hypertension. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 293, n. 1, p. R251–R256, 1 jul. 2007.
- Higgins, J.P.T., Thompson, S.G., Deeks, J.J., Altman, D.G.: Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ*. 327, 557–560 (2003). <https://doi.org/10.1136/bmj.327.7414.557>

HOCHHAUSER, E. et al. P2Y₂ receptor agonist with enhanced stability protects the heart from ischemic damage in vitro and in vivo. **Purinergic Signalling**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 633-642, 5 jul. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11302-013-9374-3>.

HOOIJMANS, C.R. et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. **BMC Medical Research Methodology**, v. 14, n. 1, p. 43, Dez 2014.

JI, X. et al. P2X₇ receptor antagonism attenuates the hypertension and renal injury in Dahl salt-sensitive rats. **Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 35, n. 2, p. 173–179, fev. 2012.

KITCHEN, A.M. et al. Mechanisms mediating NTS P_{2x} receptor-evoked hypotension: cardiac output vs. total peripheral resistance. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 281, n. 5, p. H2198–H2203, 1 nov. 2001.

MARUCCI, G. et al. Update on novel purinergic P2X₃ and P2X_{2/3} receptor antagonists and their potential therapeutic applications. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v. 29, n. 12, p. 943–963, 2 dez. 2019.

MCBRYDE, F.D. et al. Evaluating the carotid bodies and renal nerves as therapeutic targets for hypertension. *Autonomic Neuroscience, Role of the Renal Nerves in Normal and Pathophysiological Conditions*. v. 204, p. 126–130, 1 maio 2017.

NISHIMURA, A. et al. Purinergic P2Y₆ receptors heterodimerize with angiotensin AT1 receptors to promote angiotensin II-induced hypertension. **Science Signaling**, v. 9, n. 411, p. ra7–ra7, 19 jan. 2016.

PIJACKA, W. et al. Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. **Nature Medicine**, v. 22, n. 10, p. 1151–1159, out. 2016.

RIEG, T. et al. P2Y₂ receptor activation decreases blood pressure and increases renal Na⁺ excretion. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, n. 2, p. R510–R518, ago. 2011.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.409-430, 30 maio 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11302-006-9003-5>.

ROSSI, G. P. et al. Drug-related hypertension and resistance to antihypertensive treatment: a call for action. **Journal of Hypertension**, v. 29, n. 12, p. 2295–2309, dez. 2011.

SCISLO, T. J. et al. Activation of P2x-purinoceptors in the nucleus tractus solitarius elicits differential inhibition of lumbar and renal sympathetic nerve activity. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 62, n. 1–2, p. 103–110, jan. 1997.

SINGH, S.; SHANKAR, R.; SINGH, G. P. Prevalence and Associated Risk Factors of Hypertension: A Cross-Sectional Study in Urban Varanasi. **International Journal Of Hypertension**, [s.l.], v. 2017, p.1-10, 2017. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/5491838>.

TU, G. et al. P2X7 inhibition in stellate ganglia prevents the increased sympathoexcitatory reflex via sensory-sympathetic coupling induced by myocardial ischemic injury. **Brain Research Bulletin**, v. 96, p. 71–85, jul. 2013.

UNGER, T. et al. 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines. **Hypertension**, v. 75, n. 6, p. 1334–1357, jun. 2020.

Viechtbauer, W.: Conducting Meta-Analyses in R with the metafor Package. *J. Stat. Softw.* 36, 1–48 (2010). <https://doi.org/10.18637/jss.v036.i03>

VIRGILIO, F. di. Purines, Purinergic Receptors, and Cancer. **Cancer Research**, [s.l.], v. 72, n. 21, p.5441-5447, 22 out. 2012. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-12-1600>.

VONEND, O. et al. Glomerular expression of the ATP-sensitive P2X7 receptor in diabetic and hypertensive rat models. **Kidney International**, [s.l.], v. 66, n. 1, p.157-166, jul. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00717.x>.

Xiao Du et al. "The Role of a Selective P2Y₆ Receptor Antagonist, MRS2578, on the Formation of Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysms", **BioMed Research International**, vol. 2020, Article ID 1983940, 15 pages, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1983940>

WEBER, M. A. et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Hypertension in the Community. **The Journal Of Clinical Hypertension**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.14-26, 17 dez. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jch.12237>.

WENKER, I. C. et al. P2Y1 Receptors Expressed by C1 Neurons Determine Peripheral Chemoreceptor Modulation of Breathing, Sympathetic Activity, and Blood Pressure. **Hypertension**, v. 62, n. 2, p. 263–273, ago. 2013.

WU, Y. et al. Association between carotid atherosclerosis and different subtypes of hypertension in adult populations: A multiethnic study in Xinjiang, China. **Plos One**, [s.l.], v. 12, n. 2,15 fev. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0171791>. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0171791>>. Acesso em: 07 ago. 2020.

YEGUTKIN, G. G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. **Critical Reviews In Biochemistry And Molecular Biology**, [s.l.], v. 49, n. 6, p.473-497, nov. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/10409238.2014.953627>.

ZHANG, T. et al. Tonic contraction develops in the colon during anaphylactic hypotension in anesthetized rats. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 69, n. 6, p. 953–960, nov. 2019.

ZHAO, X. H. et al. Downregulation of adenosine and P2X receptor-mediated cardiovascular responses in heart failure rats. **Blood Pressure**, v. 9, n. 2–3, p. 152–161, 2000.

TABELAS E FIGURAS

Tabelas

Tabela 1: Estratégia de busca para a revisão sistemática

BASE DE DADOS	ESTRATÉGIA DE BUSCA	RESULTADOS
Medline PUBMED	<p>#1 (P2X[All Fields] AND ("Receptor"[Journal] OR "receptor"[All Fields])) OR (P2Y[All Fields] AND ("Receptor"[Journal] OR "receptor"[All Fields]))</p> <p>#2 "blood pressure"[MeSH Terms] OR ("blood"[All Fields] AND "pressure"[All Fields]) OR "blood pressure"[All Fields] OR "blood pressure determination"[MeSH Terms] OR ("blood"[All Fields] AND "pressure"[All Fields] AND "determination"[All Fields]) OR "blood pressure determination"[All Fields] OR ("blood"[All Fields] AND "pressure"[All Fields]) OR "blood pressure"[All Fields] OR "arterial pressure"[MeSH Terms] OR ("arterial"[All Fields] AND "pressure"[All Fields]) OR "arterial pressure"[All Fields] OR ("blood"[All Fields] AND "pressure"[All Fields])</p> <p>#3 #1 AND #2</p>	188
EMBASE	<p>#1 'p2x receptor'/exp OR 'p2x receptor' OR (p2x AND ('receptor'/exp OR receptor)) OR 'p2y receptor'/exp OR 'p2y receptor' OR (p2y AND ('receptor'/exp OR receptor))</p> <p>#2 'blood pressure'/exp OR 'blood pressure' OR (('blood'/exp OR blood) AND ('pressure'/exp OR pressure))</p> <p>#3 #1 AND #2</p>	451
SCOPUS	<p>((TITLE-ABS-KEY (p2x AND receptor) OR TITLE-ABS-KEY (p2y AND receptor))) AND (TITLE-ABS-KEY (blood AND pressure))</p>	286
TOTAL		925

Tabela 2: Características dos artigos incluídos na meta-análise. ACF, líquido cefalorraquidiano artificial; BBG, brilliant blue G; NTS, núcleo do trato solitário; ICC, insuficiência cardíaca crônica; VCI, veia cava inferior.

AUTOR	CIDADE E PAÍS DE PUBLICAÇÃO	PERIÓDICO E ANO DE PUBLICAÇÃO	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA	GRUPO CONTROLE	NÚMERO DE GRUPOS	NÚMERO DE ANIMAIS POR GRUPO	STATUS DA PRESSÃO ARTERIAL
Wenker <i>et al.</i>	São Paulo, Brasil	AHA Journals, 2013	Ratos linhagem <i>Winstar</i> , machos, adultos, com peso entre 250 e 280g	Solução salina	4 (Grupo que recebeu MRS2179 e seu grupo controle; grupo que recebeu PPADS e seu grupo controle)	Controle PPADS= 6	Hipertensão induzida por cianeto
						PPADS= 6	
						Controle PPADS= 6	
						Grupo MRS2179 = 6	
Rieg <i>et al.</i>	San Diego, CA, EUA	American Journal of Physiology, 2011	Camundongos 129Sv/J, machos, adultos	Solução veículo	1 (Ratos <i>Wild Type</i>)	Ratos Wild Type = 7	Não houve indução de hipertensão (normotensos)
Dominguez Rieg <i>et al.</i>	San Diego, CA, EUA	Acta Physiologica, 2015	Camundongos SV129/C57BL6, machos, adultos	Solução veículo	1 (Ratos SV129/C57BL6 - linhagem <i>Wild Type</i>)	Ratos Wild Type = 8	Não houve indução de hipertensão (normotensos)
Pijacka <i>et al.</i>	Bristol, Reino Unido	Acta Physiologica, 2016	Ratos <i>Winstar</i> , machos, com idade entre 4 e 5 ou 14 e 16 semanas, e peso entre 70 e 100 g	Solução veículo	2 (Ratos <i>Winstar</i> e ratos espontaneamente hipertensos)	Winstar = 7	Animais espontaneamente hipertensos
						Espontaneamente hipertensos = 7	
Ji x <i>et al.</i>	Osaka, Japão	Nature, 2012	Ratos <i>Dahl</i> Sensível ao sal (DS) e <i>Lewis</i> , entre 4 e 6 semanas de idade	Solução veículo	2 (Ratos que receberam BBG+ solução NaCl 8%) e ratos que receberam solução NaCl 8% (controle)	BBG +(NaCl 8%) =7	Dieta rica em sal (8% NaCl) durante 4 semanas
						(NaCl 8%) = 7	
Tu <i>et al.</i>	Jiangxi, China	Brain Research Bulletin, 2013	Ratos da linhagem <i>Sprague Dawley</i> , com peso entre 180 e 230g	Solução salina	2 (Grupo submetido à isquemia miocárdica (MI) + solução salina (controle); grupo submetido à isquemia miocárdica + BBG)	Isquemia miocárdica + solução salina (controle) = 8	Hipertensão secundária à oclusão da artéria coronária esquerda (ACE)
						Isquemia miocárdica + BBG = 8	

Nishimura <i>et al.</i>	Fukuoka, Japão	Science Signaling, 2016	Ratos com <i>background</i> C57BL/6, machos, com idade entre 6 e 8 semanas	Solução veículo	2 (Grupo controle (DMSO -Ang II; grupo que recebeu MRS2578 + Ang II)	DMSO-Ang II = 5 MRS2578 + Ang II = 5	Hipertensão induzida por Ang-II
Scislo <i>et al.</i>	Detroit, MI, EUA	Journal of the Autonomic Nervous System, 1997	Ratos <i>Sprague Dawley</i> , machos, com peso entre 350 e 400g	Veículo - ACF	2 (animais que recebem solução veículo (controle) e ratos que receberam α,β -MeATP nas doses de 100 pmols)	Solução veículo (controle) = 8 α,β -MeATP na dose de 100 pmols = 17	Não houve indução de hipertensão (normotensos)
Zhao <i>et al.</i>	Göteborg, Suécia	Blood Pressure, 2000	Ratos linhagem <i>Sprague Dawley</i> , machos, com peso entre 160 e 200g	Cirurgia placebo	2 (Ratos submetidos à cirurgia placebo e ratos induzidos a ICC)	Cirurgia placebo = 4 Indução a ICC = 8	Disfunção arterial secundária à insuficiência cardíaca isquêmica
Kitchen <i>et al.</i>	Detroit, MI, EUA	American Journal of Physiology, 2001	Ratos linhagem <i>Sprague Dawley</i> , machos, com peso entre 325 e 375g	Solução veículo	1 (animais que receberam a molécula na dose de 100 pmols)	Dose de 100 pmols = 7	Não houve indução de hipertensão (normotensos)
Barraco <i>et al.</i>	Detroit, MI, EUA	Journal of the Autonomic Nervous System, 1996	Ratos <i>Sprague Dawley</i> , machos, com peso entre 350 e 400g	Veículo-ACF	3 (Controle (comum), ratos que receberam CGS21680; ratos que receberam α,β -MeATP)	SD controle (comum) = 7 SD (CGS21680) = 7 SD (α,β -MeATP) = 7	Não houve indução de hipertensão (normotensos)
Steinmetz <i>et al.</i>	Münster, Alemanha	Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2000	Ratos da linhagem Winstar, com peso entre 250 e 400g	Solução salina isotônica	1 (Animais wild type)	Ratos <i>wild type</i> = 3 a 6	Hipertensão induzida por α, β -MeATP

Tabela 3: descrição dos resultados dos artigos incluídos na revisão sistemática. BBG, brilliant blue G; DRG, gânglio da raiz dorsal cervical, ICC, insuficiência cardíaca congestiva; NTS, núcleo do trato solitário; PAD, pressão arterial diastólica; PAS, pressão arterial sistólica; RVLM, medula rostral ventrolateral; VCI, veia cava inferior; WR, *Winstar Rats*.

AUTOR	MOLÉCULA DE ESTUDO	RECEPTOR ALVO	LOCALIZAÇÃO DO RECEPTOR	QUANTIDADE DE COMPOSTO INFUNDIDA	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	PAM INICIAL (mmHg)	PAM FINAL (mmHg)	MÉTODO DE AFERIÇÃO DA PA
Wenker <i>et al.</i>	PPADS	Antagonista P2	Neurônios catecolaminérgicos C1 RVLM	100uL-50nl por 5s.	Local (RVLM)	Grupo que recebeu MRS2179 = 119	Grupo que recebeu MRS2179 = 131	Canulação da artéria femoral com cateter de polietileno
				-	-	Controle = 121	Controle = 146	
	MRS2179	Antagonista P2Y1		100 uL-50 nl por 5s	Local (RVLM)	WR (MRS2179)= 123	WR (MRS2179) = 138	
				-	-	Controle = 122	Controle= 144	
Rieg <i>et al.</i>	INS45973	Agonista P2Y2	Endotélio e rim	1 mg/kg	Sistêmica (endovenosa)	INS45973 = 108 ± 5	INS45973 = 73	Canulação em artéria femoral
Rieg <i>et al.</i>	INS45973	Agonista P2Y2	Endotélio e rim	3 mg/kg	Sistêmica (endovenosa)	SV129/C57BL6= 93 ±3	SV129/C57BL6 = 57	Cateter em artéria femoral
Pijacka <i>et al.</i>	AF-219	Antagonista P2X3	Corpo carotídeo	8 mg/kg/h	Sistêmica (endovenosa)	PAS=151; PAD= 109	PAS=123; PAD= 83	Cânula inserida acima da bifurcação ilíaca
				-	-	Controle (não informado)	Sem alterações significativas	
Ji <i>et al.</i>	Brilliant blue G (BBG)	Antagonista P2X7	Rins	50 mg/kg/ dia, por 4 semanas	Sistêmica (endovenosa)	BBG + (NaCl 8%): PAS= 97,85	PAS= 168,3	Método não invasivo em artéria caudal
					-	(NaCl 8%) = 97,85	PAS= 194,1	
Tu <i>et al.</i>	Brilliant blue G (BBG)	Antagonista P2X7	Nervos do gânglio da DRG e gânglio cervicotorácico	30 mg/kg/dia, por 20 dias	Sistêmica (intraperitoneal)	PAS=120,96; PAD=89,76	PAS= 102,4; PAD=71,4	Método não invasivo em artéria caudal
Nishimura <i>et al.</i>	MRS2578	Antagonista P2Y6	Aorta torácia e células	2 mg/kg/dia por 4 semanas	Sistêmica (endovenosa)	DMSO-Ang II (controle) = 91,6	DMSO-Ang II (controle)= 113,7	Método não invasivo em

			musculares lisas dos vasos			MRS2578-Ang II = 90,1	MRS2578-Ang II = 98,3	artéria caudal
Scislo <i>et al.</i>	α,β -MeATP	Agonista P2X	Subnúcleo postremal do NTS	100 pmol	-	α,β -MeATP = 79,6	α,β -MeATP = 38,3	Cateter arterial associado a um transdutor de pressão
					Local (Região subpostremal do NTS)	Grupo controle = 79,6	Sem alterações significativas	
Zhao <i>et al.</i>	2-MeSATP	Agonista P2Y	Sistema cardiovascular	3 nmol/kg	Sistêmica (Intra-aórtica)	Cirurgia placebo = 123 \pm 20	Cirurgia placebo = 73,5	Cateter arterial associado a um transdutor de pressão
						Indução à ICC = 126 \pm 30	Indução à ICC = 79,5	
Kitchen <i>et al.</i>	α,β -MeATP	Agonista P2X	Subnúcleo postremal do NTS	100 pmol/50 nl	Local (Região subpostremal do NTS)	Animais que receberam a molécula = 90,9	Animais que receberam a molécula = 36,4	Cateter em artéria femoral direita conectado a um transdutor de pressão
Barraco <i>et al.</i>	α,β -MeATP	Agonista P2X	Subnúcleo postremal do NTS	100 pmoles	Local (Região subpostremal do NTS)	Controle (comum) = 73	Sem alterações significativas	Cateter inserido na artéria femoral direita
						α,β -MeATP = 73	37,1	
	CGS 21680	Agonista A2A		20 pmoles	Local (terço médio-caudal do NTS)	Controle (comum) = 73	Sem alterações significativas	
						CGS21680 = 73	CGS21680 = 50,2	
Steinmetz <i>et al.</i>	Ap4A	Agonista P2Y1 e A2	Veia Cava Inferior (VCI)	109 nmol/kg/min.	Sistêmica (endovenosa)	Ratos <i>wild type</i> = 115 \pm 8 mmHg	Ratos <i>wild type</i> = 85,6	Cateter em artéria carótida direita

Figuras

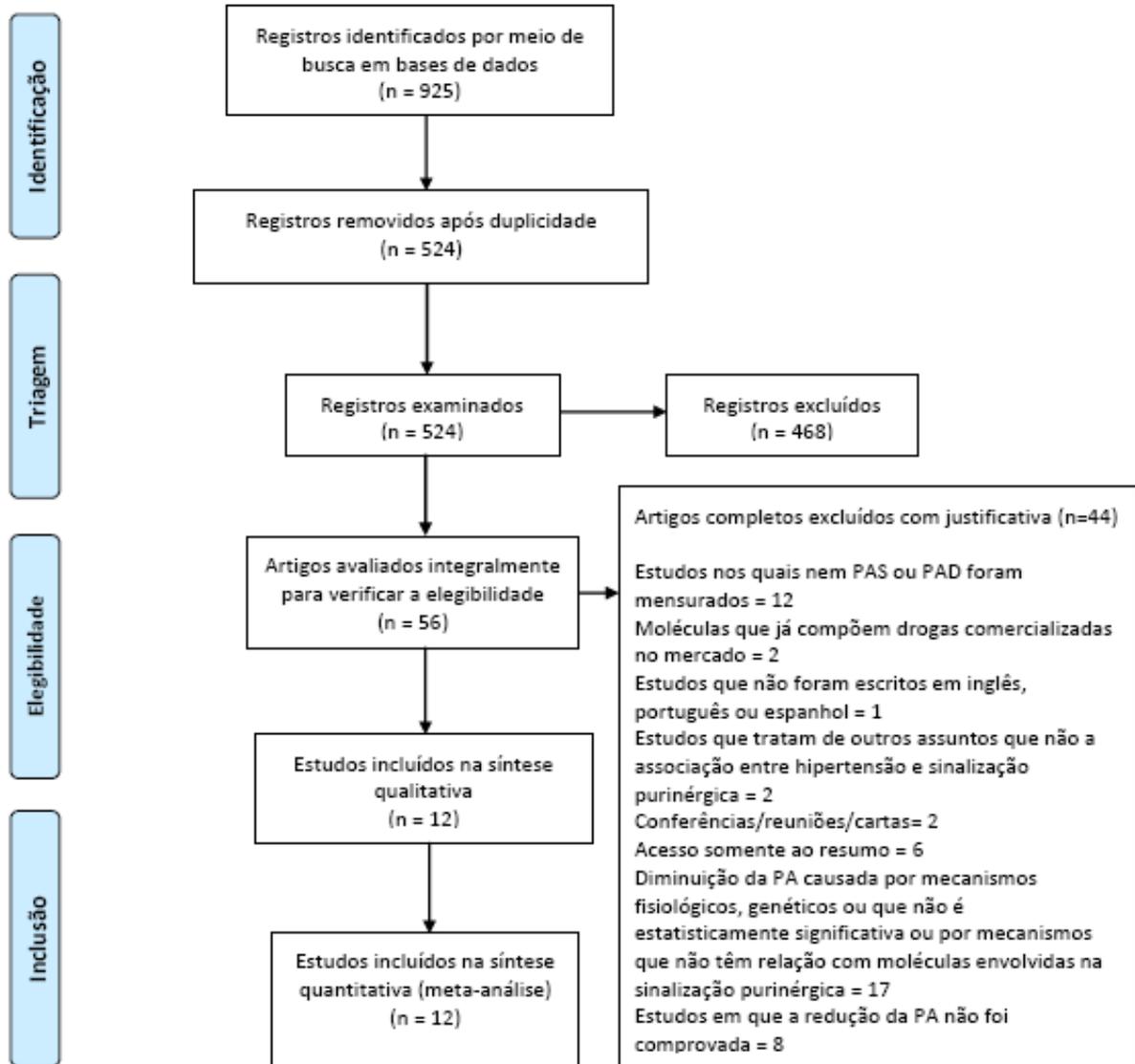


Figura 1: Fluxograma PRISMA de seleção de artigos para inclusão na meta-análise.

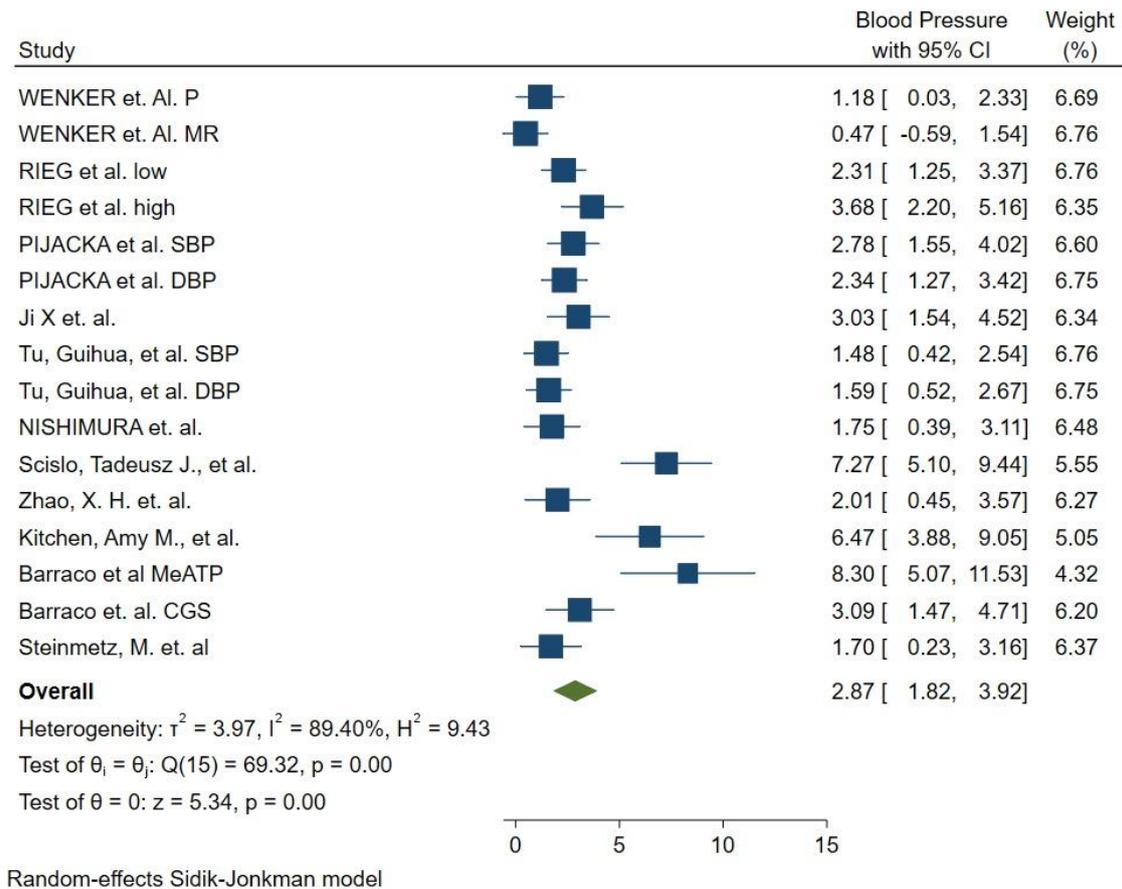


Figura 2: Gráfico de *Forest Plot* para comparação entre as diferentes moléculas anti-hipertensivas e o tamanho do efeito (analisado por meio das diferenças das médias). Foram descritos os 12 estudos incluídos na meta-análise e seus respectivos resultados quantitativos.

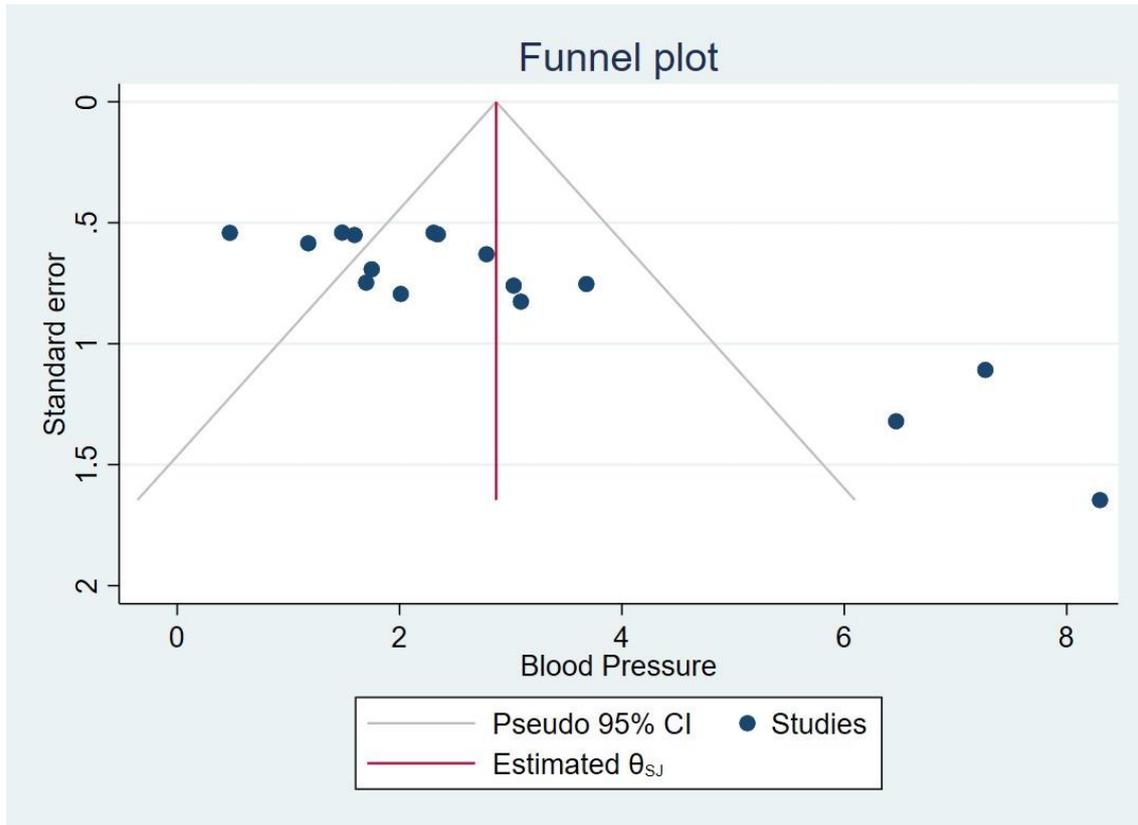


Figura 3: Gráfico de *Funnel plot* (funil invertido) para avaliação da sensibilidade do estudo. Resultado: o risco de viés não pode ser atribuído à distribuição dos estudos.

ESTUDO	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Wencker et. al., 2013	S	S	NC	NC	NC	S	S	S	S	S
Rieg et. al., 2011	S	S	NC	NC	NC	NC	S	S	S	N
Rieg et. al., 2015	S	S	NC	NC	NC	NC	NC	S	S	S
Pijacka et. al., 2016	S	S	N	NC	S	NC	NC	S	S	S
Ji X et. al., 2012	S	S	NC	S	NC	S	NC	S	S	S
Tu, Guihua, et al., 2013	S	S	NC	S	NC	S	NC	S	S	S
Nishimura et. al, 2016	N	S	N	NC	NC	NC	NC	NC	S	S
Scislo, Tadeusz J., et al., 1997	NC	S	N	NC	NC	NC	NC	NC	S	S
Zhao, X. H. et. al., 2000	NC	S	NC	NC	NC	NC	NC	NC	S	S
Kitchen, A. M. et al., 2001	NC	S	N	S	NC	NC	S	NC	S	S
Barraco et. al., 1996	N	S	N	NC	NC	NC	NC	NC	S	S
Steinmetz, M. et. al., 2000	S	S	N	S	NC	NC	NC	NC	S	S

S = SIM; N=NÃO; NC = NÃO FICOU CLARO

- 1) A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente?
- 2) Os grupos eram semelhantes no início do estudo ou foram ajustados para fatores de confusão na análise?
- 3) A alocação aos diferentes grupos foi ocultada adequadamente durante o experimento?
- 4) Os animais foram alojados aleatoriamente durante o experimento?
- 5) Os pesquisadores foram cegados quanto ao conhecimento de qual intervenção cada animal recebeu durante o experimento?
- 6) Os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação dos resultados?
- 7) O avaliador do resultado foi cegado?
- 8) Os dados de resultados incompletos foram tratados de forma adequada? (*)
- 9) Os relatórios do estudo são isentos de relatórios de resultados seletivos? (*)
- 10) O estudo estava aparentemente livre de outros problemas que poderiam resultar em alto risco de viés? (*)

Figura 4: Risco de viés para os artigos incluídos na revisão sistemática e meta-análise (SYRCLE's).