

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CARLOS ALBERTO SILVA JÚNIOR

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE DERIVADOS AMINOGUANIDÍNICOS NA
HIPERTROFIA CARDÍACA INDUZIDA EM RATOS

Maceió

2018

CARLOS ALBERTO SILVA JÚNIOR

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE DERIVADOS AMINOGUANIDÍNICOS NA
HIPERTROFIA CARDÍACA INDUZIDA EM RATOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciência da Saúde.

Orientador(a): Prof.^a Dra. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro

Maceió

2018

**Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4-661

S586a Silva Júnior, Carlos Alberto.

Avaliação dos efeitos de derivados aminoguanidínicos na hipertrofia cardíaca induzida em ratos / Carlos Alberto Silva Júnior. – 2018.

147 f.: il.

Orientador(a): Éurica Adélia Nogueira Ribeiro

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Maceió, 2018

Bibliografia. 106-146

1. Hipertrofia cardíaca. 2. Fibrose. 3. Aminoguanidina. 4. Capacidade antioxidante. I. Título

CDU: 616.12-007.61



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária - Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Folha de Aprovação

Carlos Alberto Silva Junior

Avaliação dos efeitos de derivados aminoguanidínicos na hipertrofia cardíaca induzida em ratos.

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 28 de fevereiro de 2018.

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Ana Rosa Almeida Alves (UFAL)

Prof. Dr. Célio Fernando de Sousa Rodrigues (UFAL)

Prof. Dr. Luiz Arthur Calheiros Leite (UNCISAL)

Agradecimentos

Agradeço aos meus Pais, **Carlos Alberto Silva e Tânia Wanderley de Lima Silva**, que sempre me apoiaram em minhas decisões e que estiveram sempre torcendo por mim em todos os momentos, além de fazer o possível para me dar a condição de estudar e, acima de tudo, muito amor e carinho, principalmente quando as manifestações destes sentimentos tão preciosos assumiram um caráter de repreensão, pois, foi aí que ambos me ensinaram a ser quem sou hoje.

Agradeço a minha esposa maravilhosa, **Linda Bárbara**, pela paciência e apoio dispensados nos momentos de necessidade. A ela devo minha vida, pois é com ela que divido todos os momentos, todas as angustias e felicitações, todos os sonhos... Este é o meu maior tesouro: a minha esposa.

Nessa caminhada acadêmica cruzei com pessoas muito importantes a quem devo mencionar. A primeira destas pessoas é a Prof^a Dr^a **Ana Rosa Almeida Alves**. Esta foi a primeira pessoa a ter me dado uma oportunidade de adentrar nessa aventura acadêmica. Ela foi a primeira responsável – através de uma aula prática de fisiologia humana – pela minha investida na ciência até hoje. Na ocasião, a Prof^a Dr^a Ana Rosa exigiu a confecção de um relatório a respeito do tema abordado na aula prática e o desafio de elaborar argumentos para justificar os resultados apresentados, despertou meu interesse pela ciência. De fato, a Prof^a Dr^a Ana Rosa é uma das pessoas mais relevantes na minha caminhada acadêmica. Além disso, lembro muito da pessoa que ela sempre foi: muito simples no seu modo de se relacionar com os outros. Isso, certamente, me inspira até os dias de hoje. A ela devo muito pelas horas investidas no meu “engatinhar” científico.

Outra pessoa de grande relevância para minha vida pessoal e acadêmica é o meu querido amigo **Reidson Beiriz**. Se teve uma pessoa que acreditou em mim e que tem uma grande parcela de contribuição para minha formação científica, essa pessoa é o Reidson. Este acreditou na minha capacidade de uma forma que nem eu mesmo acreditava. Poucos sabem o quanto foi duro acompanhar o ritmo de estudo e discussões que tínhamos na época de graduação. Então, a ele devo muito pelas inúmeras vezes que se dispôs a me ajudar com a fisiologia, a bioquímica, a química e a física.

Devo um agradecimento todo especial a Prof^a Dr^a **Luíza Antas Rabêlo** por ter possibilitado a concretização de um sonho que foi cursar o mestrado, uma etapa essencial para a formação acadêmica. Sou extremamente grato a Prof^a Dr^a Luíza pelo convívio com uma pessoa como ela que respira ciência, e mais ciência, e mais ciência... Este convívio, na

época, me lapidou como pessoa e como aspirante a pesquisador de uma maneira muito gratificante. Então, a ela devo muito por todo investimento feito na minha formação.

Não poderia deixar de agradecer àqueles que fazem parte do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (LFC). Pessoas como Edla Herculano, Cíntia Daniele, Amanda Karine, Emanuel Tenório, Tatiane Dias, Micheline Maria, Roberta e Alessandro trouxeram muitas alegrias, motivação e ensinamentos que, certamente, serão aproveitados tanto na vida pessoal como na acadêmica.

Mesmo ciente de que não há como retribuir os favores e os cuidados dispensados a mim, devo um agradecimento especial à Prof^ª Dr^ª **Éurica Adélia Nogueira Ribeiro** por aceitar o desafio de orientar uma pessoa desconhecida, mesmo em meio às incertezas e adversidades que na época eram obscuras e no decorrer da caminhada tomaram forma. Mesmo assim, em todos os momentos demonstrou firmeza e sabedoria para sustentar a orientação. Para mim, certamente é uma honra admitir que devo o meu doutorado à Prof^ª Dr^ª **Éurica Adélia**. Por isso, sinto que terei uma dívida de gratidão por toda a vida.

Os agradecimentos também se estendem aos professores Dr. **João Xavier** (Laboratório de Química Medicinal) e Dr. **Thiago Aquino** (Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear), bem como o discente Edeildo Ferreira que disponibilizaram as substâncias testadas nesse trabalho. Também cito a importância do Prof. Dr. **Josué Carinhanha** e seu aluno de doutorado Woodland Oliveira que nos auxiliaram com alguns experimentos, além de passar conhecimento que expandiram minha capacidade de pensar em ciência. Agradeço à Prof^ª Dr^ª **Patrícia Sarmiento** pelo auxílio com os experimentos e discussões a respeito da capacidade antiglicante *in vitro*. Cabe um agradecimento especial à UNCISAL, representada na pessoa do Prof. Dr. **Célio Rodrigues** que, como diretor do biotério institucional, contribuiu muito cedendo por empréstimo sacos de ração para os animais que foram mantidos e utilizados durante os experimentos realizados neste trabalho.

Ainda agradeço a todos os professores do programa de pós-graduação que, de alguma forma, contribuíram para a construção do meu pequeno conhecimento e pela minha formação.

Estende-se ainda um agradecimento a Universidade Federal de Alagoas, em especial ao Instituto de Ciências da Saúde (ICSB) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), pela oportunidade de completar minha formação acadêmica. Também devo agradecimentos aos órgãos de fomento FAPEAL e CAPES que tornaram possível a condução e conclusão do curso de doutorado em Ciências da Saúde em caráter de dedicação exclusiva através de concessão de auxílio financeiro, tão necessário para o bom andamento do trabalho executado.

Enfim, agradeço a DEUS por todos estes aqui mencionados, pois, de alguma forma, tiveram uma parcela de contribuição para a formação do meu caráter, seja como pessoa ou como acadêmico. Obrigado a todos por terem feito parte da minha história de vida.

Lista de Figuras

Figura 1- Número Total de Mortes por Doenças Não Transmissíveis	22
Figura 2 - Número de mortes e taxa de mortalidade no Brasil.....	24
Figura 3 - Tipos de Hipertrofia Cardíaca.....	26
Figura 4 – Fenótipo Geométrico da Hipertrofia Cardíaca.....	28
Figura 5 - Mecanismo de Sinalização Intracelular do Fator de Crescimento TGF- β em Fibroblastos	33
Figura 6 - Subtipos de Receptores Adrenérgicos	39
Figura 7 - Cascata de Sinalização dos Receptores β -Adrenérgicos Acoplados as Proteínas G43	
Figura 8 - Mecanismo de Dessensibilização e Internalização de Receptores Acoplados a Proteínas G.	44
Figura 9 - Mecanismo Intracelular de Adaptação Hipertrofica do Miocárdio	47
Figura 10 - Reação de Maillard	49
Figura 11 - Isoformas dos Receptores para AGEs (RAGEs)	51
Figura 12 - Esquema de Síntese dos Derivados Guanidínicos	60
Figura 13 - Derivados Guanidínicos LQM 01 e LQM 03	61
Figura 14 - Derivado Aminoguanidínico PA 83	61
Figura 15 - Esquema dos Testes <i>in vitro</i>	62
Figura 16 - Representação da reação entre o radical DPPH \cdot e uma substância antioxidante genérica (HCA).....	63
Figura 17 - Esquema do Ensaio de Sequestro do Radical DPPH \cdot	64
Figura 18 - Representação Genérica da Formação do Radical ABTS $^{*\cdot}$	65
Figura 19 - Esquema do Ensaio de Sequestro do Radical ABTS $^{*\cdot}$	66
Figura 20 - Representação da Reação de Griess.....	67
Figura 21 - Esquema do Ensaio de Sequestro do Radical \cdot NO	68
Figura 22 - Representação do Ensaio de Avaliação da Capacidade Antiglicante.....	71
Figura 23 - Esquema dos Grupos Experimentais	72
Figura 24 - Capacidade de Sequestrar o Radical \cdot NO	81
Figura 25 - Capacidade de Sequestrar o Radical H ₂ O ₂	82
Figura 26 – Efeitos dos Derivados na Capacidade Antiglicante <i>in vitro</i>	83
Figura 27 - Efeitos dos Derivados Aminoguanidínicos Sobre o Peso Corporal	85
Figura 28 – Efeitos dos Derivados Sobre o Peso Cardíaco Total e Peso do Ventrículo Esquerdo	86

Figura 29 – Efeitos dos Derivados Sobre os Índices de Hipertrofia Cardíaca	88
Figura 30 – Efeitos dos Tratamentos Sobre a Área Total dos Miócitos Cardíacos.....	90
Figura 31 – Efeitos dos Tratamentos Sobre a Deposição de Colágeno Total no Miocárdio....	92
Figura 32 – Efeitos dos Tratamentos Sobre a Deposição de Colágeno Total no Tecido Hepático.....	93
Figura 33 - Representação das Interações Moleculares.....	96

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Efeitos dos Derivados na Capacidade de Sequestrar o Radical DPPH [•]	79
Tabela 2 - Efeitos dos Derivados na Capacidade de Sequestrar o Radical ABTS ^{•+}	80
Tabela 3 - Avaliação da afinidade da aminoguanidina e seus derivados com os domínios hemopexina e catalítico da MMP-2.....	94
Tabela 4 - Avaliação da afinidade da aminoguanidina e seus derivados com os domínios hemopexina e catalítico da MMP-9.....	95

Lista de Siglas e Abreviaturas

- NO –Óxido Nítrico;
- ABTS^{•+} – Radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato);
- AC –Enzima Adenilato Ciclase;
- AG – Aminoguanidina;
- AGEs – Advanced Glycation End-Products (Produtos Finais de Glicação Avançada);
- AGEs – Produtos de Glicação Avançada;
- ANG II – Angiotensina II;
- Ar –Aldeídos Aromáticos;
- AT_{1/2}R – ANG II type 1/2 Receptor (Receptores Para ANG II - tipo 1 e 2);
- ATP –Trifosfato de Adenosina;
- BSA – Bovine Serum Albumin (Albumina Sérica Bovina);
- Ca²⁺/CaM –Complexo Cálcio/Calmodulina;
- CaMK –Proteína Fosfatase Dependente de Ca²⁺/CaM;
- cAMP–Monofosfato de Adenosina Cíclico;
- CDS – Clonidine-Displacing Substance;
- CnA –Subunidade Catalítica da Calcineurina;
- CnB –Subunidade Regulatória da Calcineurina
- DAG – Diacilglicerol;
- DATASUS – Tecnologia da Informação a Serviço do SUS;
- DC – Débito Cardíaco;
- DPPH[•] – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil;
- Endo-R –Receptor Para Endotelina 1;
- ERKs – Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase (Proteína Kinase Regulada por Sinal Extracelular);
- ERNs – Espécies Reativas de Nitrogênio;
- EROs – Espécies Reativas de Oxigênio;
- esRAGE – endogenously secreted RAGE (Receptor para AGE secretadoendogenamente);
- FC – Frequência Cardíaca;
- FE – Fração de Ejeção;
- GHO – Global Health Observatory;
- G_i– G Protein Inhibitory (Proteína GInibitória);

GPCRs – G Protein-Coupled Receptors (receptores acoplados às proteínas G);
GRKs – G-Protein Coupled Receptor Kinases (Kinases dos Receptores Acoplados às Proteínas G);
G_s– Proteína G Estimulatória;
IC – Insuficiência Cardíaca
IL-1 α – Interleucina 1 α
IL-1 β – Interleucina 1 β
IL-6 – Interleucina 6
iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzível;
IP₃– Inositol Trifosfato;
ISO – Isoproterenol;
ISO – Isoproterenol;
LDL – Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de Baixa Densidade);
MAPKs – Mitogen-Activated Protein Kinase (Proteína Kinase Ativa por Mitógeno);
MEC – Matriz Extracelular
MEF2 – Myocyte Enhancer Factor-2 (Fator de Crescimento do Miócito 2);
MeOH –Metanol;
MMP – Matrix Metalloproteinase (Metaloprotease de Matriz);
MG – Metilglioxal;
MMP-2 – Matrix Metalloproteinase 2 (Metaloprotease de Matriz - 2);
MMP-9 – Matrix Metalloproteinase 9 (Metaloprotease de Matriz - 9);
NED–N-(1-Naphthyl)ethylenediamine Dihydrochloride (Cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina);
NFAT – Nuclear Factor of Activated T Cells (Fator Nuclear de Células T Ativadas);
NF- κ B – Nuclear Factor- κ B - Fator Nuclear Kappa-B;
NSAID – Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (Drogas Anti-Inflamatórias Não-Esteroidais);
PDB –Protein Data Bank (Banco de Dados de Proteínas);
PDE – Phosphodiesterase (fosfodiesterase);
PIP₂– Fosfatidilinositol 4,5 Bifosfato;
PKA –Proteína Kinase A;
PKC –Proteínas Kinases C;
PLC – Fosfolipase C;
PP2B –Calcineurina;

PPM/ppm – Partes por Milhão;

QSAR –Quantitative Structure-Activity Relationships;

RAGEs – Receptor for AGEs (Receptores Para AGEs)

RM – Regurgitação Mitral;

R-Smads – Receptor-Smads (Smads Ativadas Por Receptores);

RWT – Relative Wall Thickness (Espessura Relativa da Parede Ventricular)

SHR – Spontaneously Hypertensive Rats (Ratos Espontaneamente Hipertensos);

SNA –Sistema Nervoso Autônomo;

SNP –Sistema Nervoso Parassimpático;

SNS –Sistema Nervoso Simpático;

sRAGE – soluble RAGE – (Receptor para AGE Solúvel);

SSAO – Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase (amina oxidase sensível à semicarbazida);

TGF- β_1 – Transforming Growth Factor-Beta 1 (Fator de Crescimento Transformador beta 1)

TIMP-1 – Inibidor Tecidual de Metaloprotease 1

TIMP-2 – Inibidor Tecidual de Metaloprotease 2

TNF- α – Tumor Necrosis Factor- α (Fator de Neucrose Tumoral- α)

VCAM-1 – Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (Molécula de Adesão Celular Vascular - 1);

VD –Ventrículo Direito;

VE – Ventrículo Esquerdo;

VS – Volume Sistólico;

VSCM – Vascular Smooth Muscle Cells (Células Musculares Lisas Vasculares);

WHO – World Health Organization (Organização Mundial da Saúde);

Resumo

As doenças cardiovasculares podem provocar adaptações morfofuncionais no sistema cardiovascular. A aminoguanidina (AG) foi apontada como uma potencial ferramenta terapêutica para combater a hipertrofia cardíaca e a fibrose miocárdica. A utilização da AG mostrou-se inviável clinicamente devido a riscos hepatotóxicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de derivados aminoguanidínicos (DAG) (PA83, LQM01 e LQM03) no modelo de hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol. A capacidade antioxidante *in vitro* dos DAG e da AG foi avaliada através da capacidade de sequestrar os radicais DPPH[•], ABTS^{•+}, H₂O₂ e [•]NO. Foram utilizados como controles positivos o trolox e a quercetina. Determinou-se a capacidade antiglicante dos DAG e da AG. A hipertrofia cardíaca (HC) foi induzida em ratos Wistar machos (7 a 10 semanas de idade) através da administração de isoproterenol (ISO; 7 mg/kg, *s.c.*) durante 15 dias. Ao mesmo tempo, os animais foram tratados com os DAG e AG em diferentes doses (*i.p.*). A razão entre peso cardíaco e peso corporal (PCard/PCorp) e a razão entre peso do ventrículo esquerdo e peso corporal (PVE/PCorp) foram determinadas e utilizadas como índices de hipertrofia cardíaca. A área total dos cardiomiócitos e a deposição de colágeno tecidual foram determinados histologicamente. Dentre os derivados testados, apenas o PA83 e o LQM01 apresentaram capacidade de sequestrar o radical DPPH[•] (IC_{50/PA83} = 12,86 µg·mL⁻¹; IC_{50/LQM01} = 18,10 µg·mL⁻¹). No entanto, quanto a capacidade de sequestrar o radical ABTS^{•+}, todos os derivados foram efetivos em neutralizá-lo, destacando-se o PA83 e o LQM01 como os que apresentaram os melhores resultados (IC_{50/PA83} = 8,52 µg·mL⁻¹; IC_{50/LQM01} = 7,50 µg·mL⁻¹). O PA83 foi o derivado mais eficiente em reduzir a quantidade de [•]NO e H₂O₂ (23,5% e 87,9%, respectivamente). Quanto à capacidade antiglicante, o derivado LQM03 demonstrou ser o mais eficaz, sendo melhor que a AG nas primeiras 24 horas (58,6±1,5% e 34,3±1,1%, respectivamente). De acordo com os índices de hipertrofia cardíaca (*razão PCard/PCorp. e razão PVE/PCorp.*) o tratamento com os DAG e/ou com a AG não foi capaz de impedir a HC (*** p<0,0001). No entanto, o tratamento com o derivado LQM03 (30 mg/kg) foi capaz de atenuar levemente os efeitos hipertróficos do isoproterenol sobre o miocárdio quando comparado ao tratamento CT (** p<0,01). Quanto a área total relativa dos miócitos cardíacos, tanto o tratamento com AG (50 mg/kg) quanto com o LQM03 (30 mg/kg) apresentaram aumento significativo quando comparados aos grupos CT (*** p<0,00001) e ISO (#### p<0,0001). O tratamento com AG e com o LQM03 não impediu o aumento relativo da deposição de colágeno no miocárdio, observando-se uma elevação de 58,7% no grupo tratado com AG (* p<0,05), enquanto no grupo tratado com LQM03 foi de 140,6% (**** p<0,0001). No fígado, o tratamento LQM03 resultou no aumento significativo de, aproximadamente, 12 vezes na quantidade relativa do colágeno hepático quando comparado aos demais grupos (**** p<0,0001). O estudo de docking molecular mostrou que os derivados apresentaram maior afinidade pelas isoformas MMP-2 e MMP-9 do que a AG. Além disso, observou-se que dentre os derivados, o composto PA 83 foi o que apresentou maior afinidade pelas MMPs. A partir dos resultados obtidos, conclui-se que o derivado PA83 é o composto com melhor perfil antioxidante *in vitro*. No entanto, o composto LQM03 é o derivado com melhor capacidade antiglicante. Embora o derivado LQM03 tenha apresentado um comportamento atenuador dos efeitos hipertróficos do ISO sobre o miocárdio, este composto provoca aumento da deposição de colágeno miocárdico e hepático.

Palavras-chaves: Hipertrofia Cardíaca, Fibrose, Aminoguanidina, Capacidade Antioxidante

Abstract

Cardiovascular diseases can cause morphological and functional adaptations in the cardiovascular system. Aminoguanidine (AG) has been suggested as a potential therapeutic tool to combat cardiac hypertrophy and myocardial fibrosis. The use of AG was clinically unfeasible due to hepatotoxic risks. The objective of this study was to evaluate the effects of aminoguanidine derivatives (DAG) (PA83, LQM01 and LQM03) on the isoproterenol-induced cardiac hypertrophy model. The *in vitro* antioxidant capacity of DAG and AG was evaluated by the ability to sequester radicals DPPH[•], ABTS^{•+}, H₂O₂ and [•]NO. Trolox and quercetin were used as positive controls. The antiglycation capacity of DAG and AG was determined. Cardiac hypertrophy was induced in male Wistar rats (7 to 10 weeks of age) by administration of isoproterenol (ISO, 7 mg/kg, s.c.) for 15 days. At the same time, the animals were treated with DAG and AG in different doses (i.p.). The ratio between heart weight and body weight (HW/BW) and the ratio between left ventricular weight and body weight (LVW/BW) were determined and used as cardiac hypertrophy index. The total area of cardiac myocytes and deposition of tissue collagen were determined histologically. Among the derivatives tested, only PA83 and LQM01 had the ability to sequester the radical DPPH[•] (IC_{50/PA83} = 12.86 μg·mL⁻¹; IC_{50/LQM01} = 18.10 μg·mL⁻¹). However, as for the ability to sequester the ABTS^{•+} radical, all the derivatives were effective in neutralizing it, with PA83 and LQM01 being the most successful (IC_{50/PA83} = 8.52 μg·mL⁻¹; IC_{50/LQM01} = 7.50 μg·mL⁻¹). PA83 was the most efficient derivative in reducing the amount of [•]NO and H₂O₂ (23.5% and 87.9%, respectively). Regarding the anti-coagulant capacity, the LQM03 derivative was shown to be the most effective, being better than AG in the first 24 hours (58.6 ± 1.5% and 34.3 ± 1.1%, respectively). According to the cardiac hypertrophy index (HW/BW and LVW/BW) treatment with DAG and/or AG was not able to prevent cardiac hypertrophy (**** p < 0.0001). However, treatment with LQM03 derivative (30 mg/kg) was able to slightly attenuate the hypertrophic effects of isoproterenol on the myocardium when compared to CT group (* p < 0.01). Regarding the total relative area of the cardiac myocytes, both treatment with AG (50 mg/kg) and LQM03 (30 mg/kg) presented a significant increase when compared to CT groups (**** p < 0.00001) and ISO (#### p < 0.0001). Treatment with AG and LQM03 did not prevent the relative increase of collagen deposition in the myocardium, with an increase of 58.7% in the group treated with AG (* p < 0.05), whereas in the group treated with LQM03 was 140.6% (**** p < 0.0001). In the liver, LQM03 treatment resulted in a significant increase of approximately 12 fold in the relative amount of hepatic collagen when compared to the other groups (**** p < 0.0001). The molecular docking study showed that the derivatives exhibited higher affinity for MMP-2 and MMP-9 isoforms than AG. In addition, it was observed that among the derivatives, the PA 83 compound had the highest affinity for MMPs. From the results obtained, it is concluded that the PA83 derivative is the compound with the best antioxidant profile *in vitro*. However, compound LQM03 is the derivative with the best anti-binding ability. Although the LQM03 derivative showed an attenuating behavior of the hypertrophic effects of ISO on the myocardium, this compound causes an increase in the deposition of myocardial and hepatic collagen.

Keywords: Cardiac Hypertrophy, Fibrosis, Aminoguanidine, Antioxidant Capacity.

Sumário

1	Introdução.....	17
2	Objetivos.....	20
2.1	Geral.....	20
2.2	Específicos.....	20
3	Revisão de literatura.....	21
3.1	O Contexto Epidemiológico das Doenças Cardiovasculares no Mundo.....	21
3.2	A Hipertrofia Cardíaca.....	25
3.3	Os Produtos Finais de Glicação Avançada (<i>AGEs – Advanced Glycation End-products</i>).....	48
3.4	A Química Medicinal e o Desenvolvimento de Novos Fármacos.....	53
4	Materiais e Método.....	60
4.1	Síntese dos Derivados Guanidínicos.....	60
4.2	Delineamento Experimental – Testes <i>in vitro</i>	62
4.3	Testes <i>in vivo</i>	71
4.4	Eutanásia dos Animais.....	74
4.5	Avaliação Morfológica dos Tecidos Cardíacos e Hepáticos.....	74
4.6	Estudo de Docking Molecular.....	76
4.7	Análise Estatística.....	78
5	Resultados.....	79
5.1	Avaliação da Capacidade Antioxidante dos Derivados Aminoguanidínicos.....	79
5.2	Avaliação da Capacidade Antiglicante dos Derivados Aminoguanidínicos.....	83
5.3	Efeitos <i>in vivo</i> dos Derivados Aminoguanidínicos.....	84
5.4	Docking Molecular.....	94
6	Discussão.....	98
7	Conclusão.....	109
8	Referências.....	110

1 INTRODUÇÃO

Estimativas divulgadas pela Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*) indicam que em 2030 as doenças cardiovasculares serão responsáveis por 35% das mortes em todo o mundo (MATHERS; LONCAR, 2006; WHO, 2009). Este cenário faz das doenças cardiovasculares um dos maiores problemas de saúde pública em todo o mundo, produzindo impactos socioeconômicos de grande relevância para os mecanismos administrativos de gestão pública e, conseqüentemente, para o desenvolvimento da sociedade (FERNANDO et al., 2014; BARQUERA et al., 2016). Ilustrando tal panorama, em 2008, os Estados Unidos da América (EUA) tiveram um custo direto com as doenças cardiovasculares de 179,3 bilhões de dólares, três vezes mais do que é investido para atender às despesas com as doenças pulmonares (NIH, 2012).

O combate às doenças cardiovasculares de forma direta é totalmente dependente do desenvolvimento de ferramentas farmacológicas que sejam eficazes. Essa situação se deve ao fato de que muitas condições patológicas sejam decorrentes ou influenciadas por fatores não modificáveis, como os genéticos e mau formações congênitas (SPEGGIORIN et al., 2016; LI; ZHANG, 2017). No entanto, independentemente do fator de risco, uma vez constatada a instalação de qualquer doença cardiovascular, a terapia farmacológica é a primeira estratégia adotada para combater suas complicações. Dessa forma, o desenvolvimento de novos fármacos, principalmente aqueles que possuam atividade farmacológica sinérgica, configura uma situação extremamente necessária, uma vez que muitas doenças cardiovasculares e seus fatores de risco estão associados à outras condições patológicas, tais como diabetes, dislipidemia, obesidade, entre outros (NATARAJAN et al., 2013). Além disso, diante da heterogeneidade clínica das doenças cardiovasculares, o tratamento das suas complicações torna-se de alto custo devido a necessidade de se utilizar diferentes fármacos para as diversas complicações (PUTNAM et al., 2009; BROUWER et al., 2015).

Na maioria dos casos, as doenças cardiovasculares são responsáveis por causar alterações funcionais e/ou morfológicas no coração (SELVETELLA et al., 2004; ROMANO; MACIEL, 2008). Tais alterações podem caracterizar um evento fisiológico chamado remodelamento cardíaco que, por sua vez, envolve modificações nos padrões de expressão gênica, moleculares, celulares e intersticiais (MAASS et al., 2004; ROHINI et al., 2010). Conseqüentemente, estas alterações resultam em adaptações no tamanho, forma e função cardíaca ou vascular em função das doenças que incidem sobre o organismo, sendo a hipertrofia cardíaca uma das principais respostas aos agravos cardiovasculares

(SELVETELLA; LEMBO, 2005; MCMULLEN; JENNINGS, 2007). Este tipo de adaptação quando ocorre a partir de condições patológicas pode ser um indicador muito relevante de morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares, uma vez que a hipertrofia ventricular esquerda (HVE) constitui um fator que precede o surgimento de insuficiência cardíaca congestiva, morte súbita (RIBEIRO et al., 2003), doença isquêmica cardíaca e arritmia ventricular (NOGUEIRA, 1999).

Uma vez estabelecida a relação entre mecanismos intracelulares e as respostas adaptativas do sistema cardiovascular diante de situações patogênicas, o desenvolvimento de novas ferramentas úteis para combater os prejuízos fisiológicos causados compreende uma das estratégias utilizadas para tratar pessoas acometidas por doenças do sistema circulatório (BARRY et al., 2008; BERNARDO et al., 2010). Nesse sentido, a aminoguanidina (AG), um potente antiglicante e inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), tem se mostrado muito eficaz no tratamento das complicações cardiovasculares causadas pelo diabetes mellitus e hipertensão em modelos animais (CHANG et al., 2006; DI NASO et al., 2010), reduzindo os níveis de produtos de glicação avançada (AGEs) e seus intermediários (FORBES et al., 2004; THOMAS et al., 2005). No entanto, embora estudos clínicos tenham mostrado efeitos modestos do tratamento de pacientes diabéticos com AG (BOLTON *et al.*, 2004), também se observou que a terapia com esta substância promoveu danos hepáticos, distúrbios gastrointestinais e anemia em pacientes diabéticos, resultando na descontinuidade do ensaio clínico proposto (FREEDMAN et al., 1999; NENNA et al., 2015).

Diante do exposto, o desenvolvimento de novos derivados guanidínicos, principalmente os que apresentem melhorias das ações biológicas da aminoguanidina, pode proporcionar a disposição de novos candidatos a agentes terapêuticos para tratar as complicações cardiovasculares. Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando no desenvolvimento estratégico de novas moléculas derivadas da aminoguanidina que possam ser utilizadas como ferramentas terapêuticas para diversas condições patológicas, tais como leishmaniose e hipertensão. Recentemente, foi publicado um trabalho descrevendo o potencial terapêutico de uma série de 20 moléculas derivadas da aminoguanidina, onde foi possível observar alguns dos derivados com ação antiproliferativa considerável, sugerindo uma atividade anticâncer (FRANÇA et al., 2016). Contribuindo significativamente com o delineamento estratégico proposto inicialmente, um dos trabalhos realizados por nosso grupo foi capaz de apontar um dos derivados aminoguanidínicos sintetizados como muito promissor para o tratamento da hipertensão, uma vez que se observou efeito vasodilatador *in vitro* e anti-

hipertensivo em modelos animais de hipertensão espontânea em função da ação farmacológica do derivado utilizado(COSTA, 2017).

O desenvolvimento racional de novos derivados da aminoguanidina tem sido alvo de outros grupos de pesquisa, os quais publicaram trabalhos demonstrando a eficácia destas substâncias como agentes anticancerígenos (PINHATTI et al., 2016; SILVA et al., 2016), antifúngicos (AJDAČIĆ et al., 2016) e antiviral (JIN; MCGRATH; XU, 2015).No entanto, estudos voltados para desenvolver substâncias derivadas da aminoguanidina que possam ser utilizadas como fármacos para o tratamento de doenças cardiovascular ainda são escassos. Dessa forma, este trabalho propôs avaliar os efeitos de três derivados aminoguanidínicos no modelo animal de hipertrofia cardíaca patológica.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos de derivados aminoguanidínicos sintéticos no modelo de hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol.

2.2 Específicos

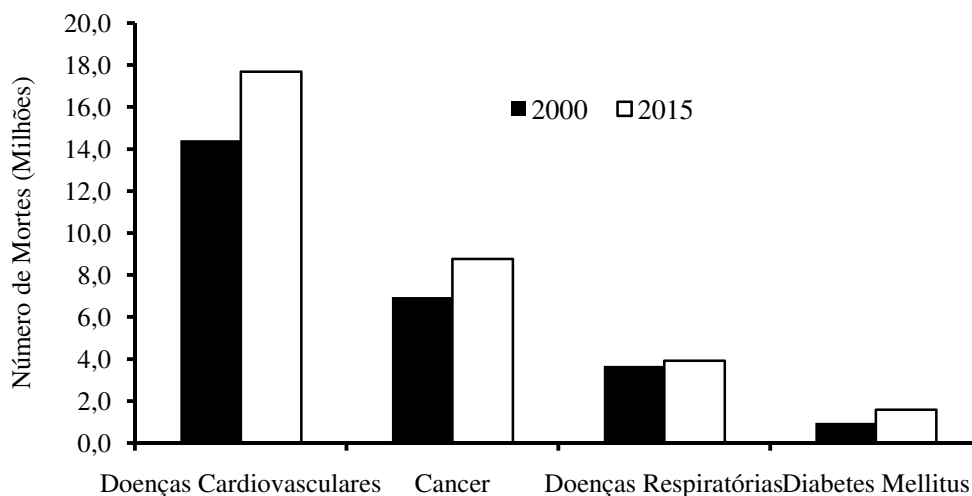
- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* de derivados aminoguanidínicos através dos ensaios de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]), radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS^{•+}), sequestro de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e sequestro de óxido nítrico (•NO);
- Avaliar a capacidade antiglicante dos derivados aminoguanidínicos e da aminoguanidina;
- Induzir a hipertrofia cardíaca e determinar o índice de hipertrofia cardíaca;
- Mensurar a área total de miócitos cardíacos através de análise histológica do coração por meio da coloração com Hematoxilina & Eosina;
- Avaliar a condição fibrótica do tecido cardíaco através de análise histológica do coração por meio da coloração de Gomori;
- Realizar a simulação de interação molecular entre a aminoguanidina e seus derivados e as enzimas MMP-2 e MMP-9 através de *docking* molecular;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O Contexto Epidemiológico das Doenças Cardiovasculares no Mundo

As doenças cardiovasculares são definidas ou caracterizadas como qualquer tipo de injúria que cause prejuízos nas funções cardíacas e/ou vasculares (GAWRYSZEWSKI; SOUZA, 2014). Em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, as doenças cardiovasculares são as principais causas de mortes e morbidades (WHO, 2013a; UTHMAN et al., 2015). Tal afirmativa é constatada pela WHO que publicou dados referentes ao ano de 2012 mostrando que as doenças cardiovasculares provocaram 17,5 milhões de mortes em todo mundo, um número que representou 46,2% do total de óbitos causados por doenças não transmissíveis (MENDIS et al., 2014; SHI et al., 2016). Dados mais recentes demonstram que este cenário não mudou muito em relação ao número total de mortes, de modo que em 2015, aproximadamente, 17,7 milhões de pessoas morreram em decorrência das doenças cardiovasculares, correspondendo à 44,7% das mortes por doenças não transmissíveis (WHO, 2016) (Figura 1). A relevância dos comprometimentos cardiovasculares para o número de mortes no cenário mundial é evidenciado pelo fato das doenças neoplásicas malignas, a segunda maior causa, contribuir com menos de 22% dos óbitos (UTHMAN et al., 2015).

Dentre as doenças cardiovasculares, as isquêmicas cardíacas e as cerebrovasculares são as principais responsáveis pelas mortes no mundo (FERNANDO et al., 2014; AVEZUM et al., 2015). Um estudo realizado por Moran e colaboradores (MORAN et al., 2014), demonstrou um aumento significativo no número de mortes por eventos isquêmicos cardíacos entre os anos de 1990 e 2010, chegando a atingir mais de 7 milhões em todo o mundo. Neste trabalho, os continentes europeu, asiático e parte da África são apontados como as principais regiões de ocorrência de mortes por doenças isquêmicas cardíacas. Em outro trabalho publicado pelo mesmo grupo de pesquisadores, foi relatado que 5,9 milhões de mortes foram atribuídas às injúrias cerebrovasculares no ano de 2010 (FEIGIN et al., 2014). Além disso, destacaram um aumento global de 25% no número de incidência de eventos cerebrovasculares na faixa etária entre 20 e 64 anos de idade. Projeções apontam que estes dois tipos de doenças cardiovasculares continuarão ocupando o posto de maiores causadoras de mortes no mundo no ano de 2030 (WHO, 2013b).

Figura 1- Número Total de Mortes por Doenças Não Transmissíveis

Fonte: Autor, 2017.

Nota –Número total de mortes causadas pelas principais doenças não transmissíveis no mundo. Dados extraídos diretamente do banco de dados da Organização Mundial da Saúde – Sistemas de Informação e Estatística da Saúde.

Embora as injúrias cardiovasculares ocupem, negativamente, um lugar de destaque no contexto mundial, as estratégias adotadas para combater esses agravos conseguiram reduzir em até 22% a taxa de mortalidade no período de 1990 a 2013, contribuindo com o aumento na expectativa de vida no mundo (WHO, 2013b; NAGHAVI et al., 2015). No entanto, na contramão desta tendência, o número de mortes por doenças cardiovasculares passou de 12,3 milhões para 17,3 milhões no mesmo período, um aumento de 41% (ROTH et al., 2015a). Contribuindo com este cenário, a prevalência de doenças cardiovasculares e alguns fatores de risco, tais como a hipertensão, obesidade e diabetes, estão aumentando (SCHNALL et al., 2016). Corroborando com o impacto destes fatores de riscos, estimativas para o ano de 2025, realizadas por Roth e colaboradores (2015b), indicam que as mortes causadas pelas doenças cardiovasculares aumentarão, aproximadamente, 32% em função da elevação da prevalência dos fatores de riscos citados. Além dos fatores já citados, o tabagismo também é apontado como determinante para ocorrência de doenças do aparelho circulatório, principalmente entre os homens (LIM et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015). Além disso, quando não causam a morte, os fatores de risco – comportamentais e/ou metabólicos – são responsáveis pela incapacidade para o exercício normal das atividades laborativas de 71% das pessoas afetadas pelas doenças cardiovasculares em países pobres, enquanto em países ricos, essa proporção aumenta drasticamente para 87% (KWAN et al., 2016).

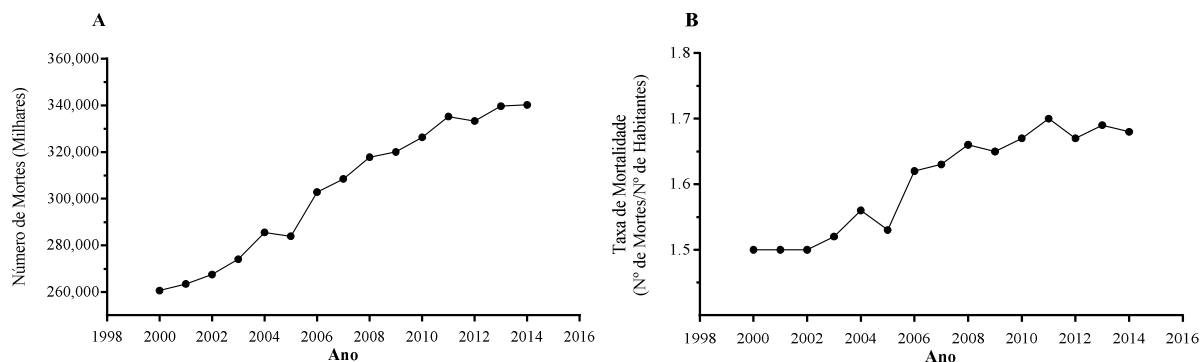
A distribuição mundial das taxas de mortalidades e no número total de mortes por doenças cardiovasculares depende do grau de riqueza e desenvolvimento dos países. Nesse sentido, os países pobres são os que apresentam as maiores taxas de mortalidade do mundo, atingindo índices de até 80%(MENDIS et al., 2014). Além disso, dados recentes publicados por Roth e colaboradores (2015a) apontam que estes países detêm os menores declínios na taxa mortalidade quando comparado aos países desenvolvidos. Neste mesmo trabalho, os autores destacam uma elevação extremamente significativa no número de mortes por doenças cardiovasculares nos países pobres no período de 1990 à 2013, chegando a alcançar 66% das mortes, enquanto os países mais ricos praticamente não variou. Mesmo se observando tanta discrepância em função do grau de desenvolvimento das regiões, os países mais desenvolvidos também têm as doenças cardiovasculares entre as principais causadoras de mortes(ALI et al., 2015). No entanto, entre os anos de 1980 e 2010, apenas o câncer esteve à frente dos agravos cardiovasculares como principal causa de mortes nos países ricos (WHO, 2013a; ARAÚJO et al., 2014).

Nas Américas, segundo Gawryszewski e Souza (2014), entre os anos de 2000 e 2009, a região da América do Norte apresentou as maiores médias anuais de mortes, cerca de 1 milhão de mortes (53% de todas as mortes). Nesse mesmo trabalho, ainda que os números provoquem algum tipo de espanto, os autores destacam que houve uma redução de 29,5% na taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares, seguido da América Latina (14,1%) e da região do Caribe (10,9%) no mesmo intervalo de tempo. Em trabalho mais recente, Ordunez e colaboradores (2015) sustenta estes achados apontando que, no período entre os anos de 2000 e 2010, a taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares caiu 21%.

Dentre os países da América do Sul, as maiores taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares são encontradas no Brasil(STEVENS et al., 2012). Para a Organização Mundial da Saúde, o Brasil está entre os países classificados como de renda média na região das Américas, condição que está diretamente interligada com o quadro de doenças não transmissíveis no país (WHO, 2013b;2015). Dados do Ministério da Saúde referentes ao período de 2000 à 2014, indicam que o número de mortes por doenças cardiovasculares evoluiu negativamente no Brasil, de forma que se observou um aumento de 30,6%(BRASIL, 2015a). Associado a este dado, a taxa de mortalidade apresentou comportamento semelhante, elevando-se em mais de 11,7%no mesmo período (Figura 2). Quanto a mortalidade proporcional por grupos de causas, as doenças cardiovasculares continuam sendo as principais causas de mortes no Brasil, participando com uma parcela de, aproximadamente, 30%(BRASIL, 2015a;RIBEIRO et al., 2016). Corroborando com este cenário, a WHO estima

que há uma probabilidade de 19% de uma pessoa morrer antes dos 70 anos de idade por alguma das 4 principais causas de mortes por doenças não transmissíveis no Brasil, sendo as doenças isquêmicas cardíacas e as cerebrovasculares as mais perigosas (WHO, 2014;2015; RIBEIRO et al., 2016).

Figura 2 - Número de mortes e taxa de mortalidade no Brasil



Fonte: Autor, 2017.

Nota – Número de mortes causadas por doenças cardiovasculares no Brasil (A) e Taxa de Mortalidade por doenças cardiovasculares (B) entre os anos de 2000 e 2014. Dados extraídos do sistema de informações do Ministério da Saúde do Brasil (DATASUS – Tecnologia da Informação a Serviço do SUS).

Dentre as regiões no Brasil, uma discrepância acentuada quanto aos dados referentes a mortalidade é observada. As regiões norte e nordeste do Brasil se destacam negativamente como as que obtiveram as maiores variações na taxa de mortalidade total por doenças do aparelho circulatório entre os anos 2000 e 2011, alcançando 41,6% e 58,5%, respectivamente (BRASIL, 2015a). No entanto, quando padronizada pela faixa etária e pelo número de mortes mal definidas, as regiões norte e nordeste apresentaram um decréscimo na taxa de mortalidade (RIBEIRO et al., 2016).

As doenças cardiovasculares são um dos maiores problemas de saúde pública em todo o mundo, pois são responsáveis por produzir impactos socioeconômicos (FERNANDO et al., 2014; BARQUERA et al., 2016). Em 2008, os Estados Unidos da América (EUA) tiveram um custo direto com as doenças cardiovasculares de 179,3 bilhões de dólares, três vezes mais do que é investido para atender às despesas com as doenças pulmonares (NIH, 2012). Dados recentes referentes ao ano de 2014 revelam que os EUA gastaram, em média, US\$ 9.402,5 por pessoa, enquanto que no Brasil, foi gasto US\$ 947,4 (THE WORLD BANK, 2016; WHO, 2016). Os custos diretos com os prejuízos causados pelos agravos do sistema circulatório estão diretamente associados ao número de fatores de riscos apresentados, de forma que os

gastos em dinheiro podem chegar a ser duas vezes maiores(MCQUEEN et al., 2016). Estimativas atuais, acompanhada do crescimento na hospitalização e das causas de mortes por doenças do aparelho cardiocirculatório, apontam para a necessidade de se desenvolver políticas públicas que combatam os fatores de riscos relacionados aos acometimentos cardiovasculares (HALL et al., 2012; SCHNALL; et al., 2016).

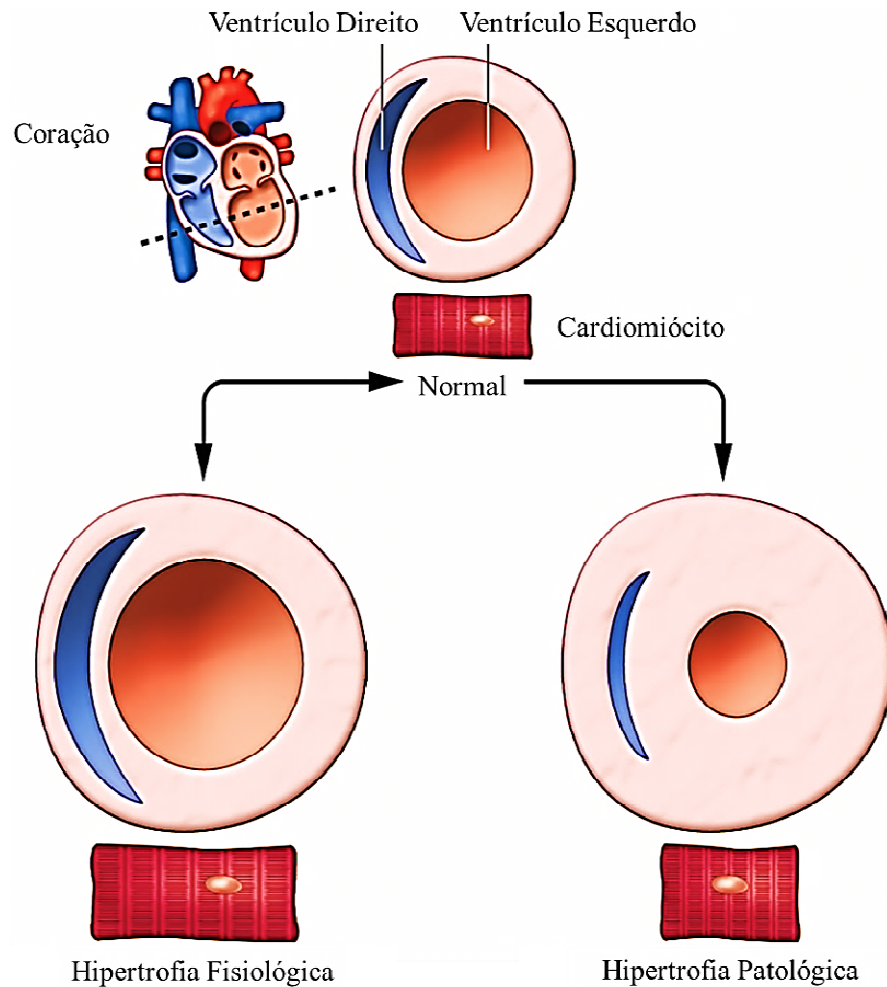
3.2 A Hipertrofia Cardíaca

3.2.1 A Adaptação Hipertrófica do Miocárdio

O coração é um dos primeiros órgãos formados durante o desenvolvimento embrionário, sendo possível detectar seus primeiros batimentos por volta do 22º dia de fecundação(SPÄTER et al., 2014). Quando desenvolvido por completo, este é um órgão constituído, basicamente, por miócitos cardíacos, células endoteliais, mastócitos, fibroblastos e músculo liso vascular (KAMO et al., 2015;PINTO et al., 2016). Além destes tipos de células, o miocárdio contém células progenitoras que participam diretamente dos processos de regeneração tecidual em casos de injúrias(CHONG, 2016; ZHANG et al., 2016).

A grande quantidade de tecido muscular cardíaco confere a este órgão uma capacidade morfológica extremamente adaptável, de forma que as alterações constatadas podem influenciar diretamente no seu funcionamento(MACIVER; CLARK, 2015). Nesse sentido, uma das adaptações mais frequentemente observadas no miocárdio é a hipertrofia cardíaca (HC) que, por sua vez, consiste numa resposta compensatória do coração que pode ocorrer tanto em condições fisiológicas quanto patológicas(SHIMIZU; MINAMINO, 2016) (Figura 3). Tal resposta é caracterizada, de modo geral, por alterações morfofuncionais do miocárdio que resulta em aumento significativo da massa cardíaca, principalmente no ventrículo esquerdo (VE), devido ao crescimento dos miócitos cardíacos(BELL; MITCHELL, 2015). Além deste tipo específico de alteração morfológica, também é possível a ocorrência de mudança funcional de outros elementos celulares que compõem o tecido cardíaco, tais como os fibroblastos(FURTADO et al., 2016; MOORE-MORRIS et al., 2016).

Figura 3 - Tipos de Hipertrofia Cardíaca



Fonte: Adaptado de Van Berlo e colaboradores (2013)

Nota – A hipertrofia cardíaca corresponde a um tipo específico de resposta adaptativa e compensatória do coração que ocorre em função do aumento da demanda metabólica e/ou funcional de outros tecidos biológicos. Quanto ao fator desencadeador da hipertrofia cardíaca, este fenômeno pode ser classificado de duas formas: hipertrofia fisiológica ou hipertrofia patológica. Tal caracterização tem relação direta com os efeitos da resposta adaptativa sobre os parâmetros funcionais do coração, de forma que os estímulos fisiológicos que desencadeiam as adaptações morfológicas do miocárdio não alteram ou até melhoram a mecânica funcional cardíaca. De modo contrário, quando resulta de fatores patológicos, as modificações morfológicas observadas podem prejudicar as funções cardíacas.

A hipertrofia cardíaca do tipo fisiológico ocorre, geralmente, durante o crescimento natural do indivíduo ou em decorrência da prática regular de exercícios físicos (KAMO et al., 2015; DAWES et al., 2016). Em qualquer uma destas situações, este tipo de adaptação é caracterizado pela manutenção das funções miocárdicas em condições normais ou até melhoradas, como ocorre em resposta ao exercício (WEINER; BAGGISH, 2012; WASFY et al., 2015). Na condição patológica da hipertrofia cardíaca, as alterações teciduais observadas estão associadas à morte de miócitos cardíacos e estabelecimento de remodelamento fibrótico

do tecido, além de uma condição inflamatória elevada (HEGER; et al., 2016). Tais mudanças provocam prejuízos funcionais e estruturais no miocárdio, tais como a redução, ou não, da fração de ejeção (FE) e diminuição do diâmetro interno do ventrículo esquerdo (VELAGALETI et al., 2014).

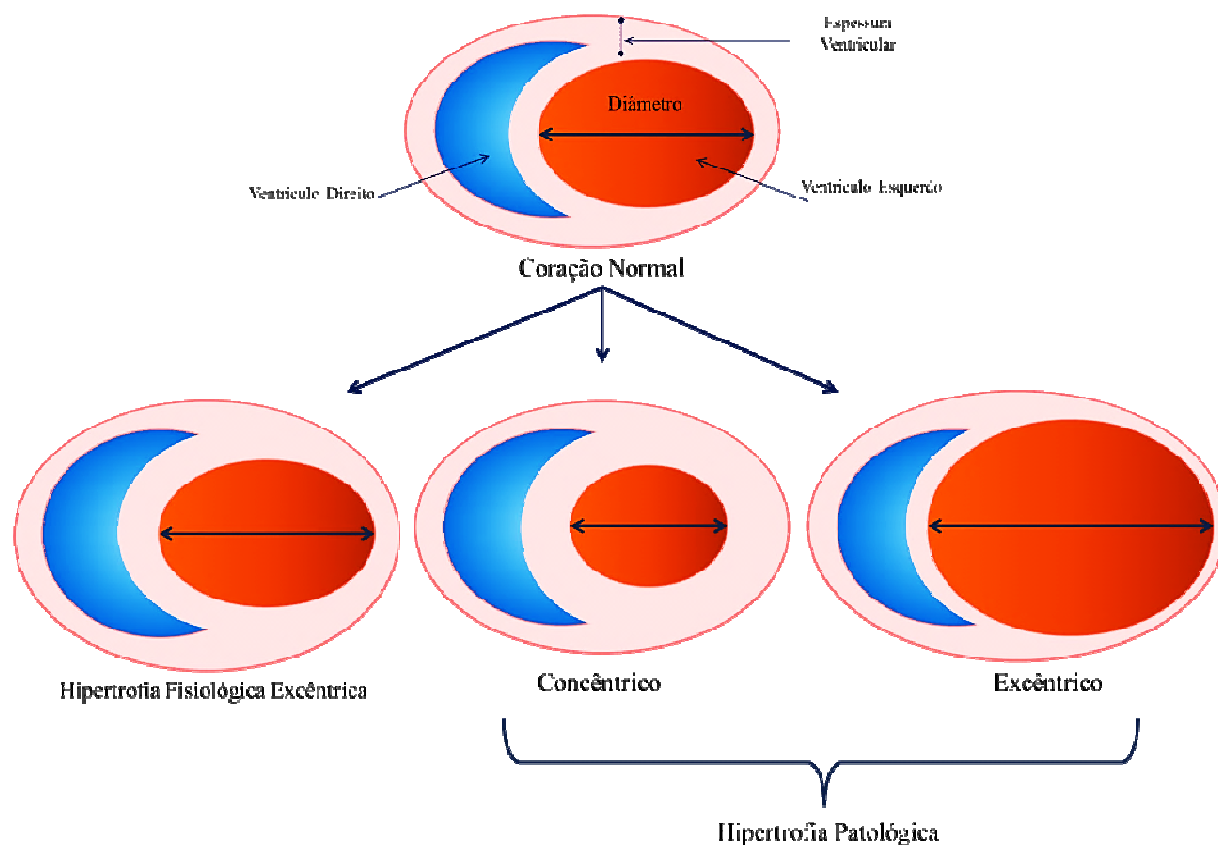
A hipertrofia cardíaca também pode ser classificada como excêntrica ou concêntrica (GARG, SONIA; DRAZNER, 2016) (Figura 4). Tal sistema de classificação é baseado nos fenótipos geométricos observados no ventrículo esquerdo, de forma que a hipertrofia excêntrica pode ocorrer de forma patológica ou fisiológica (VELAGALETI et al., 2014; DAWES et al., 2016), enquanto que a hipertrofia concêntrica ocorre em condições patológicas (NADRUZ, 2015). O fenótipo excêntrico da hipertrofia cardíaca, quando resulta de condições patológicas, é definido como um aumento da massa ventricular esquerda acompanhado de uma dilatação da câmara do ventrículo (GAASCH; ZILE, 2011). Este tipo de adaptação é muito comum em pacientes que desenvolvem insuficiência cardíaca (IC) (MOHAMED et al., 2016). Quando induzida fisiologicamente, a hipertrofia excêntrica é diferenciada pela ocorrência de aumento da espessura da parede ventricular sem dilatação da câmara cardíaca, fenótipo muito frequente em adaptações induzida pelo exercício físico (WEINER; BAGGISH, 2012; WASFY et al., 2015), como resultado da sobrecarga de volume sanguíneo que aumenta a pré-carga ventricular (TOISCHER et al., 2010).

A adaptação miocárdica concêntrica é caracteristicamente definida como um aumento da massa ventricular esquerda seguido da diminuição do volume da câmara cardíaca (COUTINHO et al., 2015; GARG; DRAZNER, 2016). O fator determinante para a progressão concêntrica da hipertrofia é a constatação de elevação da pós-carga ventricular, como ocorre na hipertensão arterial ou na estenose aórtica (KERCKHOFFS et al., 2012; JAROCH et al., 2016), aumentando a resistência a ser vencida pelo ventrículo para a ejeção do sangue (NADRUZ, 2015).

Clinicamente, as adaptações morfológicas do miocárdio, principalmente a hipertrofia cardíaca, podem ser estimadas indiretamente a partir da análise da relação entre a medida da espessura da parede ventricular e as dimensões da câmara ventricular esquerda, conhecida como espessura relativa da parede ventricular (RWT – *Relative Wall Thickness*) (HASHIM et al., 2015). Esta relação é muito utilizada para indicar o fenótipo geométrico do coração, de forma que a geometria é considerada normal quando $RWT \leq 0,42$ e sem ocorrência de hipertrofia cardíaca; quando $RWT > 0,42$ e acompanhada de hipertrofia cardíaca, o fenótipo é classificado como hipertrofia concêntrica, enquanto que $RWT \leq 0,42$ e com hipertrofia cardíaca, o fenótipo é classificado como hipertrofia excêntrica (KATZ et al., 2013; GARG;

DRAZNER, 2016). Esta forma de estimativa ainda permite definir outro tipo de fenótipo geométrico, o remodelamento concêntrico, que é uma adaptação miocárdica onde não se observa aumento da massa ventricular, mas ocorre aumento das dimensões internas do ventrículo esquerdo ($RWT > 0,42$; sem hipertrofia cardíaca)(LANG et al., 2015).

Figura 4 – Fenótipo Geométrico da Hipertrofia Cardíaca



Fonte: Autor, 2017.

Nota – A hipertrofia cardíaca pode ser classificada quanto ao fenótipo geométrico apresentado. Dessa forma, o fenótipo excêntrico corresponde ao aumento da massa muscular miocárdica acompanhada de um alargamento da câmara ventricular esquerda. No entanto, na hipertrofia fisiológica, este tipo de fenótipo apresenta uma característica bem peculiar, de forma que o volume interno do ventrículo esquerdo, praticamente não altera, mesmo que ocorra aumento da massa muscular miocárdica. Quanto ao fenótipo concêntrico, observa-se uma diminuição significativa do volume ventricular esquerdo em função do espessamento da parede muscular do miocárdio.

3.2.2 A Hipertrofia Cardíaca Patológica

Quando ocorre de forma patológica, a hipertrofia cardíaca é considerada um dos principais fatores de riscos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, podendo levar a incapacidade momentânea ou à morte prematura (FREY; OLSON, 2003). A progressão desta adaptação para um estágio patológico depende diretamente dos estímulos

impostos ao coração(MOTOKI et al., 2013; OKOSHI et al., 2016).Dentre os estímulos mais frequentes, a sobrecarga mecânica é considerada um dos mais relevantes para o desenvolvimento patológico da hipertrofia cardíaca(BADIANI et al., 2016; JAROCH et al., 2016), principalmente devido à possibilidade destes resultarem de condições patológicas precedentes.Os estímulos mecânicos, por sua vez, podem ser subdivididos em sobrecarga de volume e sobrecarga de pressão(CARABELLO, 2012; FROHLICH; SUSIC, 2012).Independente do tipo de sobrecarga mecânica imposta, ambas podem promover adaptações cardíacas potencialmente prejudiciais para a mecânica do miocárdio e para as funções sistólicas e diastólicas do coração, como observado na insuficiência cardíaca(HOUSER et al., 2012;SAVINOVA; GERDES, 2012).

Em algumas condições normais e/ou adversas, a necessidade de uma perfusão sanguínea adequada exige respostascirculatóriaspara atenderàs demandas de nutrientes para os tecidos(SIEBENMANN; LUNDBY, 2015). Sendo assim, a elevação do débito cardíaco (DC)caracteriza uma destas respostas do sistema cardiovascular para corresponder às exigências impostas(MONTERO; DIAZ-CANESTRO, 2015). Tal resposta é conceituada como a quantidade de sangue bombeado pelo coração em um minuto. O DC é diretamente proporcional ao volume sistólico (VS) e a frequência cardíaca (FC), ou seja, um produto destes dois parâmetros cardiovasculares ($VS \times FC$) (LOMIVOROTOV et al., 2016). Dessa forma, alterações em qualquer um destes dois parâmetros pode influenciarno DC.

A sobrecarga de volume consiste em um tipo específico de estresse mecânico incidente sobre o miocárdio que resulta de um aumento do débito cardíaco (LOMIVOROTOV et al., 2016).Esta sobrecarga está diretamente relacionada com o volume sistólico – volume de sangue ejetado pelo ventrículo a cada contração – de modo que este parâmetro depende do enchimentodo ventrículo esquerdo durante a diástole, ou seja, quanto maior o enchimento ventricular maior será a capacidade de ejetar sangue durante a sístole e, dessa forma, aumentar o débito cardíaco (NEVES et al., 2016). No entanto, o aumento do enchimento ventricular também eleva as tensões sobre as paredes musculares do ventrículo esquerdo, e estas tensões são responsáveis por caracterizar a sobrecarga de volume (LIU et al., 2013;BARNES; DELL’ITALIA, 2014). Nesta condição, quando as tensões são aplicadas cronicamente, o miocárdio pode sofrer remodelamento e desenvolver um fenótipo geométrico característico da hipertrofia excêntrica(BELL; MITCHELL, 2015).Como exemplo deste processo de remodelamento, a regurgitação mitral (RM) consistenuma condição patológica que pode resultar em sobrecarga de volume e provocar hipertrofia cardíaca excêntrica com característica patológica e, futuramente, evoluir para insuficiência cardíaca(ÖSTÜRK et al.,

2016; MILLERON et al., 2016). Esta doença é caracterizada por uma desordem funcional da válvula mitral que produz anormalidades nos volumes de enchimento ventricular durante a diástole(KUSUNOSE et al., 2015).

A sobrecarga de pressão é outro tipo de estresse mecânico que pode iniciar processos teciduais que resultam em hipertrofia cardíaca e, eventualmente, insuficiência cardíaca (IC)(FROHLICH; SUSIC, 2012). Algumas desordens patológicas, tais como a hipertensão arterial (HA) e estenose aórtica (EA), estão associadas com a hipertrofia cardíaca(GARG; DRAZNER, 2016; BADIANI et al., 2016). A condição comum à estas doenças é a constatação de uma sobrecarga de pressão elevada(NORTON et al., 2002a; HEIN et al., 2003). Tal situação contribui diretamente para um aumento da pós-carga ventricular, impondo, dessa forma, uma pressão ventricular mais acentuada e, conseqüentemente, elevando o estresse mecânico sobre o miocárdio(FROHLICH; SUSIC, 2012; HOUSER et al., 2012).

As conseqüências deste tipo de sobrecarga mecânica é desencadear processos hipertróficos para tentar compensar a cronicidade do estresse incidente sobre o miocárdio, além de causar danos funcionais ao miocárdio, fibrose tecidual e apoptose(TOISCHER et al., 2010; KERCKHOFFS et al., 2012). Dessa forma, o fenótipo compensatório inicial característico da sobrecarga de pressão crônica é a hipertrofia cardíaca concêntrica, podendo reduzir o diâmetro interno da câmara ventricular(BAJPAI et al., 2014). No entanto, assim como é possível observar também na sobrecarga de volume, à medida que o estresse mecânico persiste por tempo prolongado, o quadro funcional do miocárdio pode evoluir para um status de insuficiência cardíaca(SAVINOVA; GERDES, 2012). Nesse sentido, um estudo pioneiro, realizado por Hein e colaboradores (HEIN et al., 2003), mostrou que pacientes com estenose aórtica foram diagnosticados com IC e apresentaram um estado fibrótico elevado e degeneração de miócitos cardíacos. Estes resultados apontam para uma possível justificativa para a disfunção ventricular instalada na IC, de forma que a perda de células musculares cardíacas contribui para a desordem funcional constatada. Sustentando esses resultados, um trabalho realizado por Norton e colaboradores (NORTON et al., 2002b) mostrou que ratos desenvolveram um fenótipo de hipertrofia cardíaca excêntrica após um longo período de sobrecarga de pressão e apresentaram um grau acentuado de IC. Sendo assim, é possível que o prolongamento do estresse miocárdico em função da sobrecarga de pressão altere o padrão de remodelamento do tecido cardíaco nos estágios onde a insuficiência cardíaca já está instalada.

3.2.3 A Fibrose Miocárdica e o Processo de Remodelamento Tecidual

O remodelamento tecidual é uma das principais respostas miocárdicas à eventos isquêmicos (PATTERSON et al., 2013; LINDSEY et al., 2015) e estímulos hipertróficos (CHIN et al., 2016). Tal resposta envolve, principalmente, o balanço entre a síntese e a degradação dos inúmeros tipos de elementos que compõem a matriz extracelular (MEC), tais como colágeno, elastina, glicoproteínas, proteoglicanos e integrinas (BOWERS et al., 2010; ZAMILPA; LINDSEY, 2010). A matriz extracelular consiste numa intrincada rede tridimensional formada pelos elementos mencionados anteriormente que ocupa os espaços intercelulares, servindo como um suporte estrutural para as células (PORTER; TURNER, 2009), além de participar ativamente em diversos mecanismos de sinalização que regulam diversas funções celulares, tais como proliferação, adesão e migração (WELLS et al., 2015; GAGGAR; WEATHINGTON, 2016).

Os processos de remodelamentos observados em decorrência da hipertrofia cardíaca têm relação direta com eventos moleculares que alteram o microambiente da matriz extracelular. Nesse sentido, dentre os diferentes tipos celulares que constituem o tecido miocárdico, os fibroblastos cardíacos são um tipo de células mesenquimais especializadas que desencadeiam os processos responsáveis pela homeostase do microambiente extracelular, regulando a produção da MEC que compõe o tecido (PORTER; TURNER, 2009; BAUM; DUFFY, 2011). Recentemente, contrariando estudos anteriores, foi comprovado que dentre os elementos celulares não-miócitos do tecido cardíaco, os fibroblastos compreendem uma proporção muito menor da população de células residentes, aproximadamente 15% (PINTO et al., 2016b). No entanto, a quantidade de fibroblastos ativos pode aumentar significativamente em decorrência de eventos danosos ao miocárdio que favorecem a diferenciação de células mesenquimais residentes (CENCIONI et al., 2016; IVEY; TALLQUIST, 2016) e o recrutamento de células progenitoras endoteliais (ZEISBERG et al., 2007; WIDYANTORO et al., 2010) e circulatórias (AMERONGEN et al., 2008; XIA et al., 2013). De qualquer forma, o aumento da quantidade de fibroblastos cardíacos ativos correspondem a parte dos mecanismos de reparação dos danos teciduais causados por isquemia e/ou estímulos hipertróficos (FURTADO et al., 2016).

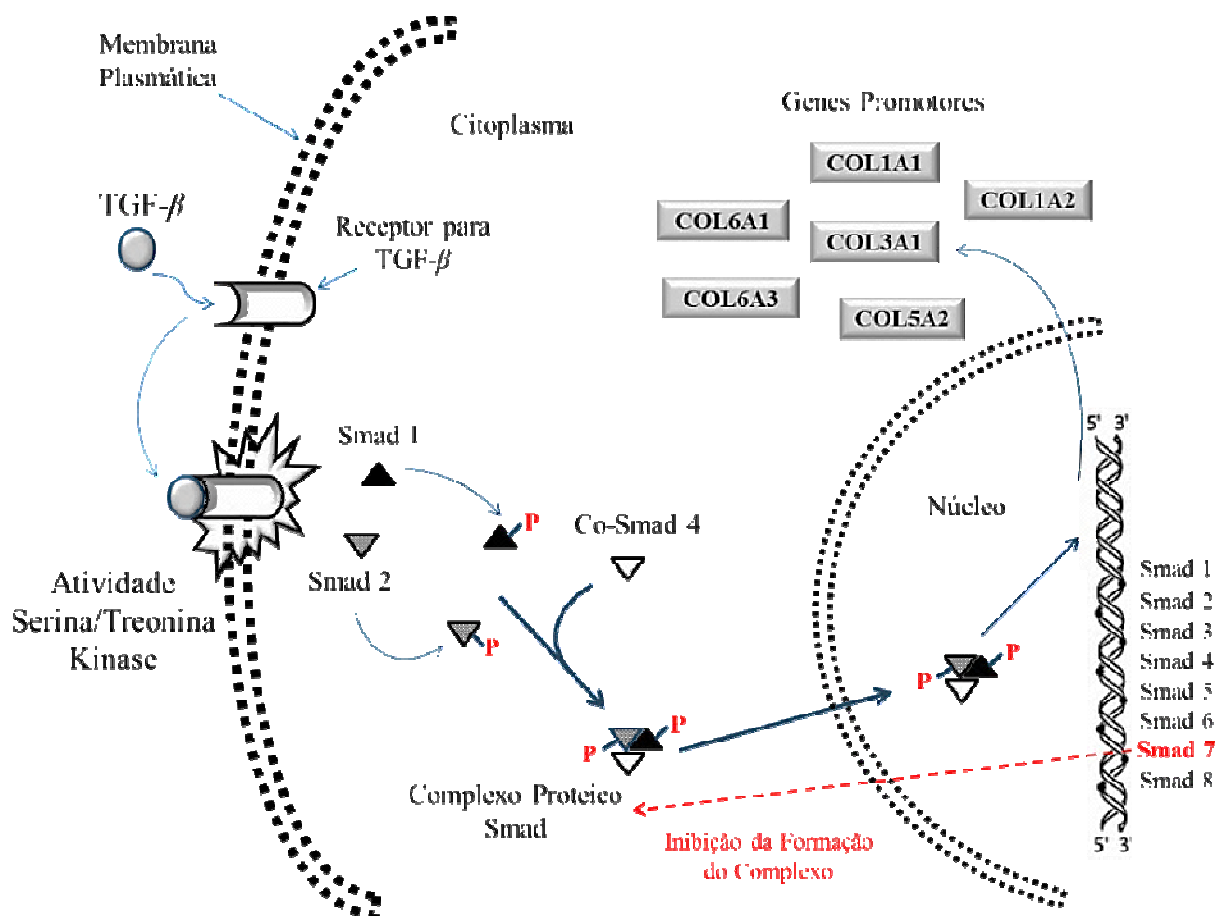
Os fibroblastos são altamente responsivos à grande variedade de estímulos químicos e mecânicos, destacando-se a alta sensibilidade à fatores pró-inflamatórios que medeiam as suas funções (PORTER; TURNER, 2009). Basicamente, para que ocorra remodelamento tecidual os fibroblastos precisam se diferenciar em miofibroblastos, um fenótipo celular ativo com alta

mobilidade e elevada capacidade de produzir proteínas de matriz extracelular (BAUM; DUFFY, 2011; FAN et al., 2012). Este processo de diferenciação celular no miocárdio é mediado, principalmente, pelo fator de crescimento $TGF-\beta_1$ (*Transforming Growth Factor-Beta 1*) que além de promover a transformação dos fibroblastos também aumenta a síntese e a deposição de colágeno no miocárdio, o constituinte mais abundante da MEC (PETROV et al., 2002). Foi demonstrado que a eficiência da sinalização intracelular do $TGF-\beta_1$ envolve a formação de complexos proteicos heteroméricos intracelulares constituídos por Smads ativadas por receptores (R-Smads: tipo 2 e tipo 3) e pela Smad tipo 4 (Co-Smads) que é classificada como um mediador comum (MOUSTAKAS et al., 2001). O complexo formado pelas Smads, após fosforilado pelos receptores para $TGF-\beta$, é translocado para núcleo celular para induzir a transcrição de genes promotores (NAKAO et al., 1997) (Figura 5). Em modelo animal de infarto do miocárdio, foi observado que o aumento da quantidade de colágeno foi associado a elevação do conteúdo do complexo constituído pelas Smads 2, 3 e 4 na região infartada (HAO et al., 1999). Corroborando com estes achados, os complexos Smads foram responsáveis pela expressão dos genes promotores COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A2, COL6A1 e COL6A3 em fibroblastos dérmicos humanos, os quais estão relacionados com o aumento da síntese de colágeno (VERRECCHIA et al., 2001).

Um dos mecanismos intracelulares de regulação da expressão dos genes promotores é a metilação do DNA. Em um estudo pioneiro, realizado por Rhodes e colaboradores (RHODES et al., 1994), foi comprovado que a metilação do DNA suprimiu o gene COL1A1. Em trabalho mais recente, ficou evidente que a cascata de sinalização do $TGF-\beta_1$ promove a inibição da metilação do DNA e favorece o aumento da expressão do gene promotor COL1A1 e, conseqüentemente, estimula a produção do colágeno tipo 1 (PAN et al., 2013). Além do exposto, outras isoformas proteicas da família das Smads têm um papel regulatório nos mecanismos de transcrição gênica (MOUSTAKAS et al., 2001). Uma destas isoformas é a Smad 7 que antagoniza os efeitos do complexo formado pelas Smads 2, 3 e 4 (CUTRONEO, 2007) e inibe a síntese de colágeno tipo 1 e 3 por fibroblastos cardíacos isolados, efeito que pode ser bloqueado quando o miocárdio sofre injúria isquêmica e necessita de reparos para manutenção das funções do tecido (WANG et al., 2002). Foi mostrado recentemente que a Smad 7 liga-se diretamente às R-Smads (tipos 2 e 3) e impede a ativação deste complexo pelos receptores para $TGF-\beta_1$ (LI et al., 2013b; YAN et al., 2016) (Figura 5). No entanto, quando a ativação deste receptor se prolonga, a interação entre a Smad inibitória e as R-Smads se desfaz e favorece a interação entre as Smads 2 e 3 e a Co-Smad tipo 4 (XU et al., 2016). A ubiquitinação das Smads também corresponde a outro mecanismo regulatório da

transcrição de genes promotores da síntese de colágeno, de forma que a adição de ubiquitina à Smad 3, por exemplo, impede a interação desta com as outras proteínas do complexo e impossibilita a expressão gênica (XIE et al., 2014;ZHANG et al., 2014).No entanto, a ubiquitinação da Smad 7 é capaz de regular positivamente a sinalização do TGF- β e mobilizar células epiteliais para diferenciação em células mesenquimais, contribuindo, dessa forma, para o aumento da quantidade fibroblastos ativos(PARK et al., 2015).

Figura 5 - Mecanismo de Sinalização Intracelular do Fator de Crescimento TGF- β em Fibroblastos



Fonte: Autor, 2017.

Nota – Além de influenciar na diferenciação dos fibroblastos, a cascata de sinalização intracelular promove a expressão de genes promotores envolvidos na síntese de colágeno via formação de complexos proteicos citoplasmáticos constituídos por 3 proteínas chamadas Smads: Smad 1 e Smad 2 (R-Smad; são fosforiladas por receptores kinases para TFG- β) e outra Smad conhecida como mediadora do complexo (Smad 4 ou Co-Smad). O complexo formado é translocado para o núcleo celular, onde inicia a transcrição de genes promotores responsáveis pela síntese de colágeno, principalmente os genes COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A2, COL6A1 e COL6A3. Além dos genes envolvidos com a síntese de colágeno, o complexo de Smads também estimula a transcrição de genes promotores de outras isoformas de Smads, dentre as quais destaca-se a Smad 7 que é responsável inibição da formação do complexo formado pelas Smads 1, 2 e 4 e, dessa forma, regulando a síntese de colágeno.

O fato dos fibroblastos também responderem à outras citocinas pró-inflamatórias, tais como $TNF\alpha$ (GOLDBERG et al., 2007; KURUVILLA; KARTHA, 2009), IL-1 e IL-6 (PRABHU; FRANGOIANNIS, 2016; SHI et al., 2017), além do $TGF-\beta_1$, evidencia a interação deste tipo de célula com os eventos inflamatórios observados, por exemplo, após o infarto do miocárdio, de forma que a ativação dos fibroblastos pode exacerbar a resposta inflamatória desencadeada (SHINDE; FRANGOGIOANNIS, 2014; GERARDUZZI; DI BATTISTA, 2016). Tal resposta tem relação direta com a capacidade dos fibroblastos cardíacos, após sua ativação, secretar vários mediadores inflamatórios e fatores de crescimento (CHACAR et al., 2017). As citocinas IL-1 α e IL-1 β são uns destes mediadores secretados quando o miocárdio é sujeito à injúrias de diversas naturezas (FRANGOIANNIS, 2015). No infarto do miocárdio, enquanto a IL-1 α originada de miócitos necróticos é responsável pelo recrutamento de neutrófilos (LUGRIN et al., 2015), a IL-1 β produzida e liberada por monócitos desempenha uma função moduladora da cascata de sinalização do $TGF-\beta$, atenuando seus efeitos sobre os fibroblastos ativados (SAXENA et al., 2013). Além do exposto, a citocina IL-1 α é capaz de induzir a expressão de IL-1 β , IL-6 e $TNF-\alpha$ em miofibroblastos cardíacos humanos, exacerbando, dessa forma, a resposta inflamatória decorrente da isquemia do miocárdio (TURNER et al., 2009).

Outro mediador liberado por fibroblastos é a IL-6, uma citocina muito importante que está envolvida em respostas imunológicas e inflamatórias (LISSILAA et al., 2010; HOGE et al., 2013). Recentemente, foi comprovado que a IL-6 secretada por fibroblastos associados ao câncer é responsável por promover a migração e a transição de células epiteliais para mesenquimais, contribuindo para os processos de metástase de células de câncer gástrico (WU et al., 2017). No miocárdio, a elevação dos níveis de IL-6 está relacionada com o aumento da fibrose tecidual, principalmente em camundongos senescentes, onde se observou uma condição favorável para migração transendotelial e consequente modificação de fenótipo celular de monócito para fibroblasto (CIESLIK et al., 2015). Nos estágios iniciais do infarto do miocárdio a alta quantidade de IL-6 é capaz de influenciar na modulação fenotípica dos fibroblastos cardíacos, tornando-os ativos e promovendo o recrutamento de células inflamatórias via produção de hyaluronan, um polissacarídeo largamente distribuído na MEC (MÜLLER et al., 2014). Este efeito exercido pela IL-6 colabora com os processos de remodelamento cardíaco em diversas condições patológicas, elevando os níveis de colágeno e potencializando as respostas inflamatórias locais, tanto no infarto do miocárdio quanto na hipertrofia cardíaca (ZHOU et al., 2015; ZHANG et al., 2016b).

O TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) é outro mediador inflamatório que tem um papel relevante no remodelamento tecidual. Os níveis circulantes de TNF- α têm se mostrado elevados em pacientes com insuficiência cardíaca severa (KOSAR et al., 2006; ODEH et al., 2006). Inicialmente, estudos pioneiros mostraram que as células miocárdicas expressam o TNF- α (WAGNER et al., 1998) e sua função tem relação com o aumento da motilidade de fibroblastos (DUNLEVY; COUCHMAN, 1995; JACOBS et al., 1999). No entanto, os fibroblastos cardíacos são as principais fontes de TNF- α no miocárdio, chegando a aumentar em até 40 vezes a síntese deste fator em função da elevação do estresse mecânico ou da sinalização da angiotensina II (ANG II) (YOKOYAMA et al., 1999). Nesse sentido, a interação sinérgica do TNF- α com o eixo renina-angiotensina constitui um mecanismo de potencialização dos efeitos da ANG II, de forma que o TNF- α promove aumento da expressão de receptores para ANG II tipo 1 (AT1R – *ANG II type 1 Receptor*) nos fibroblastos cardíacos (GURANTZ et al., 1999, 2005). Dessa forma, os efeitos da ANG II sobre o miocárdio favorece a deposição de colágeno, contribuindo, dessa forma, com a fibrose cardíaca (DUERRSCHMID et al., 2015). Além do exposto, estudos recentes mostraram que a sinalização do TNF- α sobre os fibroblastos também inclui elevar a expressão de moléculas de adesão celular, assim como a VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), um importante mediador de migração celular que proporciona a transmigração de leucócitos para áreas de injúria nos tecidos, aumentando a resposta inflamatória (LIN et al., 2015; LIN et al., 2016).

Diferentemente do que ocorre no infarto do miocárdio, os mecanismos envolvidos no remodelamento tecidual desencadeados pela hipertrofia cardíaca se estendem por um período de tempo maior (CHEMALY et al., 2013). A perda de miócitos cardíacos em decorrência da isquemia observada no infarto induz eventos fibróticos reparativos para ocupar o lugar das células mortas, caracterizando a formação de micro cicatrizes na região afetada (YUE et al., 2011; WEBER et al., 2013). Como na hipertrofia cardíaca, inicialmente, não há perda de miócitos, a fibrose é chamada de reativa, caracterizando-se pela deposição de colágeno nos espaços intercelulares (interstício) do miocárdio (MOORE-MORRIS et al., 2016; PIEK et al., 2016). No entanto, independentemente do tipo de injúria cardíaca que promova a fibrose, o aumento do colágeno no tecido cardíaco pode prejudicar as funções cardíacas e provocar insuficiência cardíaca (ZILE et al., 2015; WANG et al., 2016a).

Embora se observe alterações em estruturas e organelas intracelulares, assim como o citoesqueleto celular e as mitocôndrias (CHRISTIANSEN et al., 2015), a principal característica do remodelamento cardíaco é o aumento da deposição de colágeno intersticial (KHOR et al., 2015; CHIN et al., 2016). O fenótipo ativo dos fibroblastos cardíacos são os

responsáveis teciduais tanto pela síntese quanto pela degradação de colágeno no miocárdio(HU et al., 2016).Os processos de regulação da deposição de colágeno na matriz extracelular são mediados pelas metaloproteases de matriz (MMP - *Matrix Metalloproteinase*), um grupo de enzimas proteolíticas zinco-dependentes,sintetizadas e secretadas pelos fibroblastos, que atuamregulando a deposição da matriz(MA et al., 2014;APTE; PARKS, 2015).Até o momento, já foram caracterizadas 26 enzimas desta classe que podem ser distribuídas em 5 categorias, a saber:colagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas e metaloproteases de membrana (VISSE; NAGASE, 2003). Basicamente, a estrutura de uma MMP consiste em três domínios: o pro-peptídeo/domínio, domínio catalítico e domínio hemopexina, além de uma região dobrada(MORGUNOVA et al., 1999;MURPHY; NAGASE, 2009).

As metaloproteases de matriz extracelular são expressas na forma de um zimogênio (estado inativo) e podem ser ativadasindiretamente por diversas substâncias, principalmente espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio(SIWIK et al., 2001;JACOB-FERREIRA; SCHULZ, 2013), citocinas pró-inflamatórias (CAI et al., 2016)e por ação proteolítica de outras enzimas(FLORES-PLIEGO et al., 2015;GUO et al., 2016). No miocárdio, as isoformas mais abundantes e, conseqüentemente, mais participativas nos mecanismos de controle da deposição da matriz extracelular são as MMP-2 (gelatinase A) e MMP-9 (gelatinase B)(LINDNER et al., 2012;VANDOOREN et al., 2013).A MMP-2humana (EC 3.4.24.24) na forma inativa (proMMP-2) apresenta um peso molecular de 72 kDa e quando totalmente ativada tem 62 kDa (HUGHES; SCHULZ, 2014). Por sua vez, a proMMP-9 tem um peso molecular de 92 kDa, podendo ter de 82 kDa (OGATA et al., 1992) à67kDa(OKADA et al., 1992) na forma ativa(MMP-9; EC 3.4.24.25).

Os miócitos cardíacos, interessadamente, também podem expressar metaloproteases de matriz extracelular, principalmente a MMP-2(COKER et al., 2001). Além dos cardiomiócitos, células tumorais (DOCAMPO et al., 2011;AKKOC et al., 2017) e até microrganismos, como o vírus influenza (UCHIDE et al., 2016), expressam MMP-2 e MMP-9. Tais evidencias tornaram estas metaloproteases possíveis marcadores de doenças, tais como o câncer (RASOOL et al., 2016) e agravos cardiovasculares (BAUTISTA-LOPEZ; SCHULZ, 2014;ISLAM et al., 2015).Na hipertensão, vários estudos confirmam os níveis circulantes elevados da gelatinase B, especificamente, em pacientes hipertensos (FRIESE et al., 2009; FONTANA et al., 2011)ou em modelos animais(NASCIMENTO et al., 2015;RUDDY et al., 2016).A obesidade, quando associada a hipertensão, é outra condição relacionada com o aumento dos níveis séricos da MMP-9, podendo ser um fator relevante para as adaptações

hipertróficas do miocárdio (RITTER et al., 2016). Além da obesidade, relata-se ainda que as concentrações séricas das gelatinases A e B apresentam-se elevadas em pacientes diabéticos e pré-hipertensos (KOSTOV et al., 2016) e também em pessoas com doença de Chagas (GARCIA-SALDIVIA et al., 2014;2015), fortalecendo as estratégias de utilização destas metaloproteases como marcadores biológicos de doenças cardiovasculares.

Além dos níveis circulantes elevados, a atividade enzimática das metaloproteases também pode ser aumentada na hipertensão (GARCIA et al., 2016). Nesse sentido, um estudo clínico apontou uma correlação direta entre o aumento da atividade enzimática das metaloproteases 2 e 9 plasmáticas e a progressão dos prejuízos cardíacos em pacientes com doença de Chagas (BAUTISTA-LÓPEZ et al., 2013). Contribuindo significativamente com a progressão da insuficiência cardíaca, a atividade da pro-MMP-2 apresentou-se elevada em pacientes hipertensos com insuficiência cardíaca (GIANNAKOS et al., 2016). Em modelos animais de hipertensão renovascular, tem-se mostrado que além da elevação da quantidade da metaloprotease, há um aumento significativo da atividade enzimática da MMP-2 na aorta (CASTRO et al., 2008) e miocárdio de ratos (RIZZI et al., 2013). Efeitos estes que são mediados pelo aumento do estresse oxidativo tecidual que pode contribuir com a disfunção vascular (CASTRO et al., 2009) e com a hipertrofia cardíaca desenvolvida no citado modelo (RIZZI et al., 2013b; 2014).

O infarto do miocárdio é outra condição onde a participação das metaloproteases tem um importante papel nos processos de remodelamento cardíaco decorrente do infarto (DELEON-PENNELL et al., 2015; IYER et al., 2016). Um estudo clínico, realizado por Cogni e colaboradores (2013), apontou para uma relação inversa entre os níveis séricos das gelatinases A e B, de forma que enquanto há uma redução da concentração circulante na isoforma inativa da MMP-9, observa-se uma elevação da quantidade da isoforma ativa da MMP-2 em pacientes infartados após 6 meses. Estes resultados foram confirmados por outros pesquisadores, mostrando que os níveis de MMP-2 se elevam em detrimento da redução dos níveis séricos da MMP-9 (FERTIN et al., 2013). Embora outros estudos apontem para a relevância da MMP-2 nas alterações teciduais causadas pelas injúrias isquêmicas resultantes do infarto a longo prazo (HUGHES; SCHULZ, 2014), a MMP-9 parece ter participação nas respostas miocárdicas nos estágios iniciais aos eventos isquêmicos, de modo que além de se apresentar em níveis mais elevados nas áreas infartadas, também tem sua atividade enzimática exacerbada (KWON et al., 2014; REVUELTA-LÓPEZ et al., 2017). O grande escopo de evidências que relacionam as metaloproteases e as doenças cardiovasculares revelam a necessidade de estudos voltados para o desenvolvimento de terapias para o tratamento dos

prejuízos cardiovasculares que tenham como alvos estas enzimas de matriz extracelular(CASTRO; TANUS-SANTOS, 2013).

3.2.4 Simpatomimetismo: O Sistema Nervoso Autônomo e o Modelo Farmacológico de Hipertrofia Cardíaca Patológica

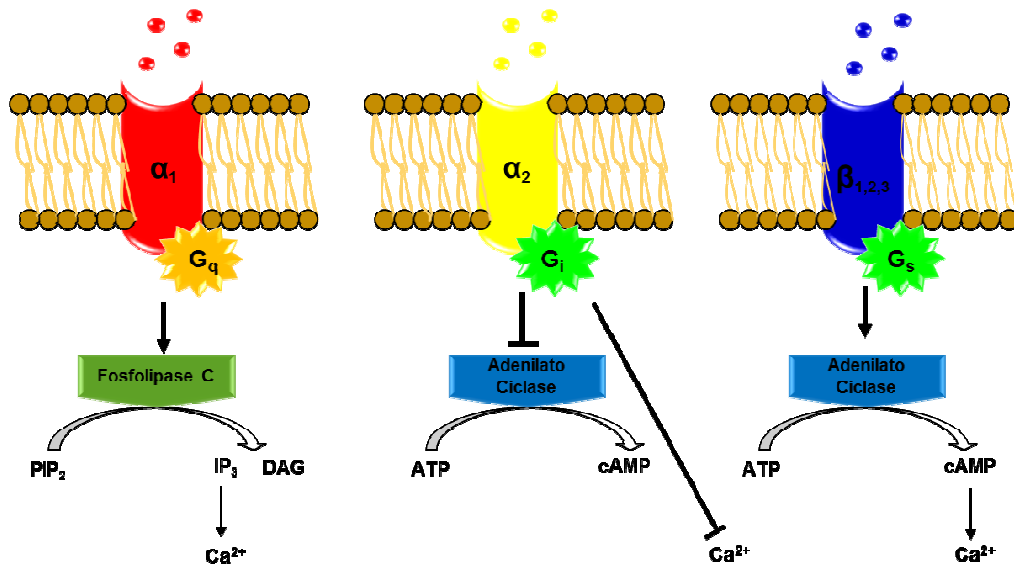
O sistema nervoso autônomo (SNA), composto pelo sistema nervoso simpático (SNS) e pelo sistema nervoso parassimpático (SNP), é responsável pelo controle das funções cardiovasculares, além de outros sistemas no organismo. Este controle é exercido por neurônios localizados em núcleos centrais que compõem o SNA e enviam suas projeções axonais para regiões específicas do coração com o objetivo de promover ajustes sobre os parâmetros funcionais cardíacos (MATSUKAWA, 2012; TAGGART et al., 2016). Sendo assim, a ativação do SNS resulta na elevação da frequência dos batimentos cardíacos e na contratilidade muscular, entre outros efeitos sistêmicos(VINIK, 2012; COOTE; CHAUHAN, 2016). Contrariamente, o sistema nervoso parassimpático, quando mais ativo, pode atenuar os efeitos da ação simpática sobre o miocárdio (GOURINE et al., 2016).

A modulação autonômica das funções cardíacas consiste numa interação sincrônica e antagônica entre as atividades das subdivisões simpática e parassimpática do sistema nervoso autônomo. Enquanto o SNS exerce sua influência a partir da liberação de catecolaminas (*noradrenalina e adrenalina*) pelas terminações nervosas e pelas glândulas adrenais, o SNP atua a partir da ação da acetilcolina liberada pelos seus terminais axonais (KISHI, 2012). As catecolaminas são agonistas dos receptores adrenérgicos, expressos na membrana plasmática dos cardiomiócitos sob dois subtipos: α -adrenérgicos(α_1 e α_2) e β -adrenérgicos(β_1 , β_2 e β_3), sendo os subtipos β_1 e β_2 os mais abundantes e relevantes para a modulação das funções cardíacas(TRIPOSKIADIS et al., 2009; O'CONNELL et al., 2014)(Figura 6). A acetilcolina, por sua vez, é um agonista colinérgico que desencadeia a ativação de cascatas de sinalização intracelulares a partir do acionamento de receptores muscarínicos presentes nas membranas plasmáticas das células miocárdicas(FREELING; LI, 2015;ROY et al., 2015).

Muitas condições fisiológicas adversas podem ser desenvolvidas em função de um desequilíbrio entre as atividades das subdivisões simpáticas e parassimpáticas do SNA. Esta condição caracteriza um quadro de disfunção autonômica que pode ser tanto um fator de predisposição quanto uma consequência de muitas doenças (BALCIOĞLU; MÜDERRISOĞLU, 2015; CARROLL et al., 2015). A neuropatia autonômica cardíaca é um exemplo claro de disfunção autonômica, onde se observa um aumento do tônus simpático em

detrimento da atividade parassimpática (DESAI et al., 2012). Esta condição é muito comum em pacientes com diabetes mellitus (DIMITROPOULOS et al., 2014) e pacientes obesos (DEVENDRAN et al., 2014), contribuindo significativamente para o desenvolvimento de complicações cardiovasculares, tais como a insuficiência cardíaca e outros danos cardiovasculares observados em pacientes diabéticos (METELKA, 2014).

Figura 6 - Subtipos de Receptores Adrenérgicos



Fonte: Autor, 2013.

Nota -Os receptores adrenérgicos fazem parte de uma família de receptores de membrana que estão acoplados às proteínas tipo G. Há dois tipos de receptores adrenérgicos: alfa (α_1 e α_2) e beta (β_1 , β_2 e β_3). Estes podem apresentar diferentes efeitos quando estimulados devido ao subtipo de proteína G que cada tipo de receptor pode estar acoplado. Quando os receptores α_1 são ativados pelas catecolaminas ou análogos, a proteína G_q ativa uma proteína de membrana chamada Fosfolipase C que hidrolisa o fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2) para formar trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O aumento de IP_3 ocasiona a elevação intracelular de cálcio (Ca^{2+}), resultando na contração o músculo liso. A ativação do receptor α_2 estimula uma proteína G inibitória (G_i) que inibe a enzima adenilato ciclase (AC) e diminui a concentração intracelular de Ca^{2+} e promove o relaxamento do músculo liso e a inibição de liberação de neurotransmissor. O acionamento dos receptores β -adrenérgicos ativa a proteína G estimulatória (G_s) que, por sua vez, estimula a AC que utiliza trifosfato de adenosina (ATP) para sintetizar monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), resultando no aumento de Ca^{2+} intracelular, ocasionando aumento da contração do músculo cardíaco, relaxamento do músculo liso e glicogenólise.

Aspectos Gerais do Modelo Farmacológico

O desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para combater qualquer processo patológico depende diretamente de modelos que mimetizem tais condições. Além disso, o

entendimento da fisiopatologia em questão é outro fator relevante que sustenta a necessidade de utilização de modelos patológicos, de modo que o conhecimento aprofundado a respeito da condição patológica pode fornecer subsídios para expandir a compreensão acerca das possibilidades terapêuticas para o tratamento ou, até mesmo, a cura de doenças.

Nesse sentido, muitos modelos animais foram desenvolvidos para mimetizar várias condições patológicas relacionadas com as doenças cardiovasculares, uma vez que estas são as principais causas de mortes no mundo (RIBEIRO et al., 2016; SHI et al., 2016). Dentre os modelos mais utilizados com o objetivo de induzir a hipertrofia cardíaca patológica destacam-se os simpatomiméticos. Estes modelos são assim chamados por reproduzir características semelhantes às observadas durante a hiperativação do sistema nervoso simpático (SNS), onde se observa a elevação sistêmica ou local das catecolaminas (FURNIVAL; LINDEN; SNOW, 1971; HAFT, 1974).

Dentre os modelos simpatomiméticos, a administração diária de isoproterenol (ISO) é utilizada como estratégia farmacológica para indução da hipertrofia cardíaca (WANG et al., 2016; ZHU et al., 2016) e outros danos cardiovasculares, como o infarto do miocárdio (GARG; KHANNA, 2014; SAGOR et al., 2015). Os primeiros trabalhos científicos, relatando algum tipo de injúria ao tecido cardíaco em função da administração de ISO, foram publicados há, aproximadamente, 5 décadas (STANTON, 1966; MUELLER et al., 1968). Em um desses trabalhos, Rona e colaboradores (1958) desenvolveram uma técnica farmacológica para induzir necrose miocárdica, uma característica bem peculiar do infarto cardíaco, a partir da administração de ISO por dois dias consecutivos. Foi postulado que a injúria tecidual observada foi consequência de um *status* isquêmico desenvolvido pela combinação entre o aumento na demanda de oxigênio e a diminuição do fluxo sanguíneo coronariano. Tempos mais tarde, foi mostrado que a técnica proposta resultou em danos cardíacos crônicos, de forma que 18 meses após a estimulação miocárdica provocada pelo ISO foi suficiente para desenvolver fibrose miocárdica e insuficiência cardíaca congestiva (RONA et al., 1961). Estudos mais recentes comprovam que as alterações funcionais e o remodelamento tecidual constatados estão associados há uma acentuada elevação do estresse oxidativo sistêmico e tecidual (LI et al., 2013; SAGOR et al., 2015).

A utilização do ISO como ferramenta farmacológica para indução da hipertrofia cardíaca deu-se a partir da adaptação de protocolos experimentais de estudos pioneiros que priorizaram o desenvolvimento de modelos animais voltados para mimetizar alterações cardíacas semelhantes ao infarto do miocárdio (GARG, MONIKA; KHANNA, 2014). Nestes trabalhos, a indução do infarto do miocárdio ocorre em função de altas doses de ISO (85 –

100 mg·kg⁻¹) por períodos de tempo que variam de 2 à 15 dias (RONA et al., 1958; ZBINDEN; MOE, 1969). Um dos primeiros estudos, realizado por Stanton (STANTON, 1966), mostrou que baixas doses de ISO (0,08 – 1,25 mg·kg⁻¹), administradas por dois dias consecutivos, foi capaz de promover hipertrofia cardíaca sem ocorrências de lesões do tecido miocárdico. Posteriormente, Alderman e Harrison (ALDERMAN; HARRISON, 1971) relataram que doses ainda menores de ISO (0,02 mg·kg⁻¹) administradas por um período de tempo maior também poderia provocar aumento da massa cardíaca, além de promover taquicardia aguda. Nesse sentido, os trabalhos citados revelam que além da dose escolhida, o tempo de administração do ISO é um fator determinante para o processo de hipertrofia cardíaca (OSADCHII et al., 2007). Além disso, pesquisas recentes mostram que a forma de tratamento ou indução também tem papel determinante no processo de remodelamento cardíaco. Esta condição foi avaliada por Ma e colaboradores (2011) que observaram que, mesmo que tenha ocorrido hipertrofia cardíaca, a administração intermitente (injeção subcutânea diária) de ISO foi capaz de provocar, agudamente, maiores aumentos na frequência cardíaca do que a administração contínua (bombas de infusão), além de elevar a área de fibrose no miocárdio.

O Mecanismo de Ação

A ação do ISO sobre o miocárdio envolve a ativação de receptores adrenérgicos presentes nas membranas plasmáticas dos miócitos cardíacos (OSADCHII, 2007; ZHU et al., 2016). Dentre os receptores, destaca-se a importância das isoformas β_1 e β_2 -adrenérgicos para regulação da função cardíaca (SANTULLI; IACCARINO, 2016). Distribuídos de modo diferente no miocárdio, a isoforma β_1 -adrenérgico é proporcionalmente mais abundante do que a isoforma β_2 -adrenérgico (BRODDE; MICHEL, 1999; WALLUKAT, 2002; BRODDE et al., 2006). No entanto, mesmo sendo um agonista não seletivo desta classe de receptores de membrana, o ISO tem uma afinidade maior pela isoforma β_2 -adrenérgico (BAKER, 2010).

Os receptores β -adrenérgicos são exemplos clássicos de receptores acoplados às proteínas G (GPCRs – *G Protein-Coupled Receptors*), constituindo parte da família das rodopsinas (LATEK et al., 2012; ZHANG et al., 2015). Esta classe de receptores é responsável por iniciar cascatas de sinalização intracelulares em resposta à inúmeros mensageiros extracelulares (MIAO; MCCAMMON, 2016). As respostas intracelulares desencadeadas pela ativação destes receptores dependem, basicamente, do subtipo de proteína G que está acoplada a estes receptores. Sendo assim, tais receptores podem estar conectados através

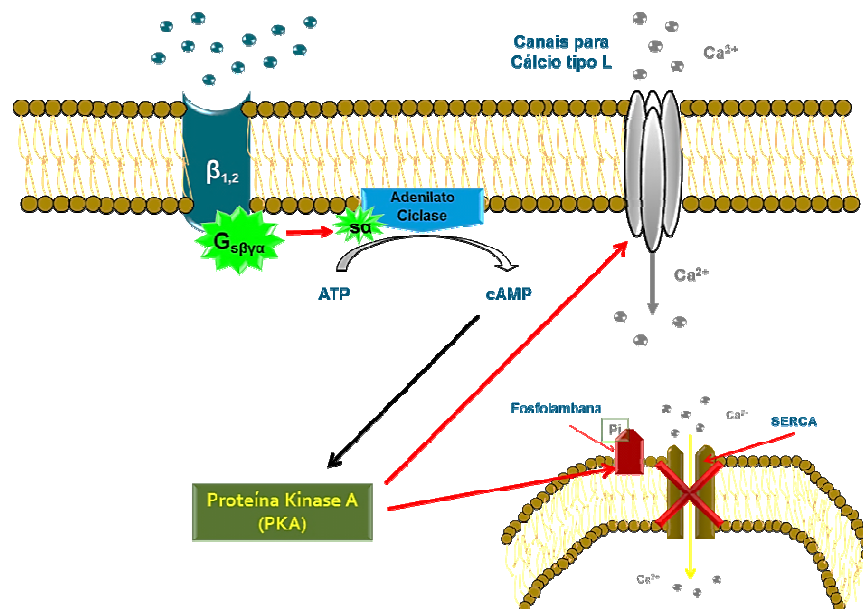
diferentes subtipos de proteínas G: G_s (*stimulatory* – estimulatória), G_i (*inhibitory* – inibitória) e G_q (estimulatória)(LATEK et al., 2012).

Dentre os receptores β -adrenérgicos, apenas a isoforma β_2 ativa, simultaneamente, os subtipos G_s e G_i (XIAO, 2001;MUSA ZAMAH et al., 2002). No entanto, a isoforma β_1 está associada, apenas, ao acionamento do subtipo G_s (KILTS et al., 2000).Uma vez ativados os receptores β -adrenérgicos (β_1 e/ou β_2), as proteínas G_s acopladas à estes são acionadas e estimulam a ativação da enzima adenilil ciclase (AC) que, por sua vez, promove a elevação dos níveis intracelulares de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP)(WALLUKAT, 2002; STARK et al., 2004). O aumento da concentração citoplasmática do cAMP configura o segundo nível da sinalização intracelular iniciada pela ativação do receptor de membrana, sendo chamado, dessa forma, de segundo mensageiro intracelular(TUTEJA, 2009). Este, por sua vez, ativa a proteína kinase A (PKA), enzima responsável pela fosforilação de uma série de proteínas citoplasmáticas, principalmente canais iônicos para cálcio (Ca^{2+}) do tipo L e a fosfolambam, proteína moduladora da liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático(KAPILOFF et al., 2009; EFENDIEV; DESSAUER, 2011). O efeito da fosforilação destes alvos intracelulares acaba por resultar em aumento do influxo citoplasmático de Ca^{2+} e, concomitantemente, na redução da recaptção deste íon pelo retículo sarcoplasmático(IRIE et al., 2015)(Figura 7). No miocárdio, dessa forma, o resultado final da ativação de receptores β -adrenérgicos pelo ISO eleva a concentração intracelular de Ca^{2+} que, por sua vez, aciona os mecanismos contráteis nos miócitos cardíacos (ZHANG et al., 2013; BRISTON et al., 2014).

Um estudo pioneiro, realizado por Zou e colaboradores (1999),apontou que os efeitos hipertróficos da estimulação de receptores β -adrenérgicos com ISOdepende diretamente da ativação da proteína G_i , além das vias intracelulares mediadas pelo subtipo G_s .Os autores relataram que a inibição de intermediários em diferentes níveis da cascata de sinalização foi capaz de suprimir os efeitos do ISO sobre as proteínas kinases intracelulares responsáveis pela fosforilação de outras proteínas citoplasmáticas. Nesse sentido, Kilts e colaboradores (2000), interessados em confirmar os resultados anteriores em miócitos cardíacos humanos, comprovaram que o acionamento específico dos receptores β_2 -adrenérgicos ativa, simultaneamente, as proteínas G_s e G_i , de modo que a ação do subtipo G_i é capaz de modular os efeitos intracelulares da ativação do subtipo G_s .Dessa forma, a ativação dos receptores acoplados às proteínas G_i envolve, basicamente, cascatas de sinalização intracelulares que resultam na redução da concentração citoplasmática de cAMP (SYROVATKINA et al., 2016). Tal efeito é mediado através da interação entre a proteína G_i com a enzima fosfolipase

C (PLC) que, a partir da hidrólise de um fosfolípido de membrana, fosfatidilinositol (PIP_2), produz dois mensageiros intracelulares, o trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG) (TEWSON et al., 2014). Enquanto o IP_3 modula o influxo de cálcio para o citoplasma através da abertura de canais do retículo endoplasmático (RE) (HISATSUNE et al., 2005), o DAG ativa as proteínas kinases C (PKC) que são responsáveis pela fosforilação de outras proteínas intracelulares (SMRCKA, 2015). De todo modo, o acoplamento duplo dos receptores β_2 -adrenérgicos aos dois subtipos de proteínas G (G_s e G_i) configura um mecanismo de proteção da célula, regulando a atividade das proteínas kinases intracelulares (XIAO, 2001; MUSA ZAMAH et al., 2002).

Figura 7 - Cascata de Sinalização dos Receptores β -Adrenérgicos Acoplados as Proteínas G



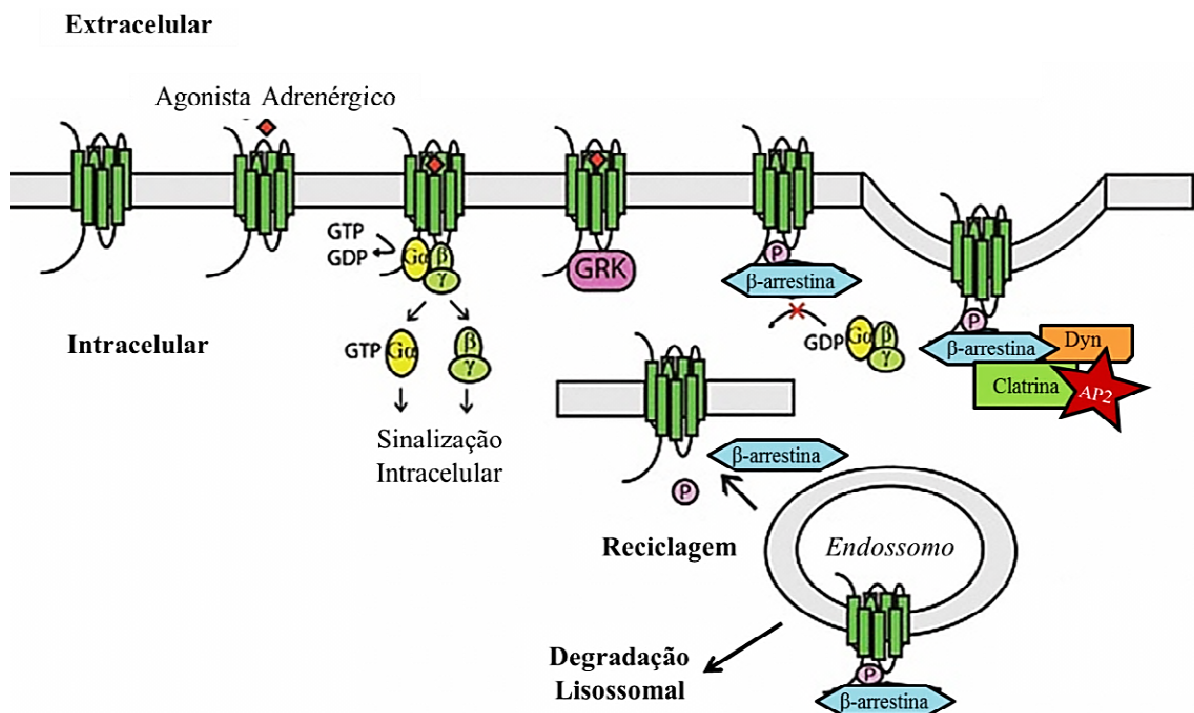
Fonte: Autor, 2013.

Nota - A estimulação dos receptores β_1 e β_2 -adrenérgicos resulta na ativação de proteínas G estimulatória (G_s) e/ou inibitória (G_i), neste último caso, apenas o subtipo β_2 pode estar acoplado. O acionamento dos receptores ligados a G_s promove a ativação da enzima de membrana adenilato ciclase que, por sua vez, ocasionam o aumento dos níveis intracelulares de cAMP (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico). Este induz a ativação da PKA (proteína kinase A), enzima que fosforila várias proteínas intracelulares, principalmente canais iônicos para cálcio tipo L e a proteína moduladora de liberação de cálcio no retículo sarcoplasmático, a fosfolambam.

Os efeitos nocivos da estimulação sustentada dos receptores β -adrenérgicos, como ocorre no modelo de indução da hipertrofia cardíaca induzida pela administração de ISO, podem ser atenuados, inicialmente, pela ação de enzimas chamadas kinases dos receptores acoplados às proteínas G (GRKs - *G-Protein Coupled Receptor Kinases*) (VAYTTADEN et

al., 2010; LIN; SCOTT, 2012). Estas enzimas são responsáveis pela fosforilação dos receptores acoplados às proteínas G (GPCRs) quando ativadas pelos seus agonistas extracelulares (WATARI et al., 2014). Quando fosforilados pelas GRKs, os receptores transmembrana perdem ou diminuem a sua capacidade de se acoplar às proteínas G, promovendo um estado de dessensibilização dos GPCRs (BOGUTH et al., 2010). Além disso, a ativação das GRKs aumenta significativamente a afinidade dos GPCRs por uma proteína intracelular chamada arrestina (ZHENG et al., 2012; TIAN et al., 2014). As arrestinas, por sua vez, são uma família de proteínas (α -arrestinas e/ou β -arrestinas) que têm o papel de modular os mecanismos de internalização dos GPCRs (PARK et al., 2016; SMITH; RAJAGOPAL, 2016) (Figura 8). Sabe-se que a estimulação de receptores β_2 -adrenérgicos está associada ao recrutamento da isoforma β -arrestina-2, cuja função primordial é promover a endocitose dos receptores mencionados (LOHSE et al., 1990; HAN et al., 2013), envolvendo processos de desnitrosilação (OZAWA et al., 2008) e ubiquitinação (MARCHESE; TREJO, 2013; JEAN-CHARLES et al., 2016). Além disso, sabe-se que, quando ativadas, as β -arrestina-2 também acionam as fosfodiesterases (PDE – *Phosphodiesterase*), enzimas responsáveis pela degradação do cAMP citoplasmático, modulando, dessa forma, a atividade da PKA (BAILLIE et al., 2003; PERRY et al., 2002).

Figura 8 - Mecanismo de Dessensibilização e Internalização de Receptores Acoplados a Proteínas G.



Fonte: Adaptado de Stadel e colaboradores (STADEL et al., 2011)

Nota – A estimulação sustentada de receptores de membrana acoplados a proteínas G, assim como os receptores β -adrenérgicos, pode desencadear o acionamento de mecanismos de *feedback* negativo, tal como os de internalização dos receptores de membrana. O processo se inicia com ação de enzimas quinases de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) que fosforilam resíduos de aminoácidos intracelulares dos receptores de membrana, provocando a dessensibilização dos receptores e elevando a afinidade entre estes receptores e a β -arrestina, uma proteína responsável pela internalização do receptor.

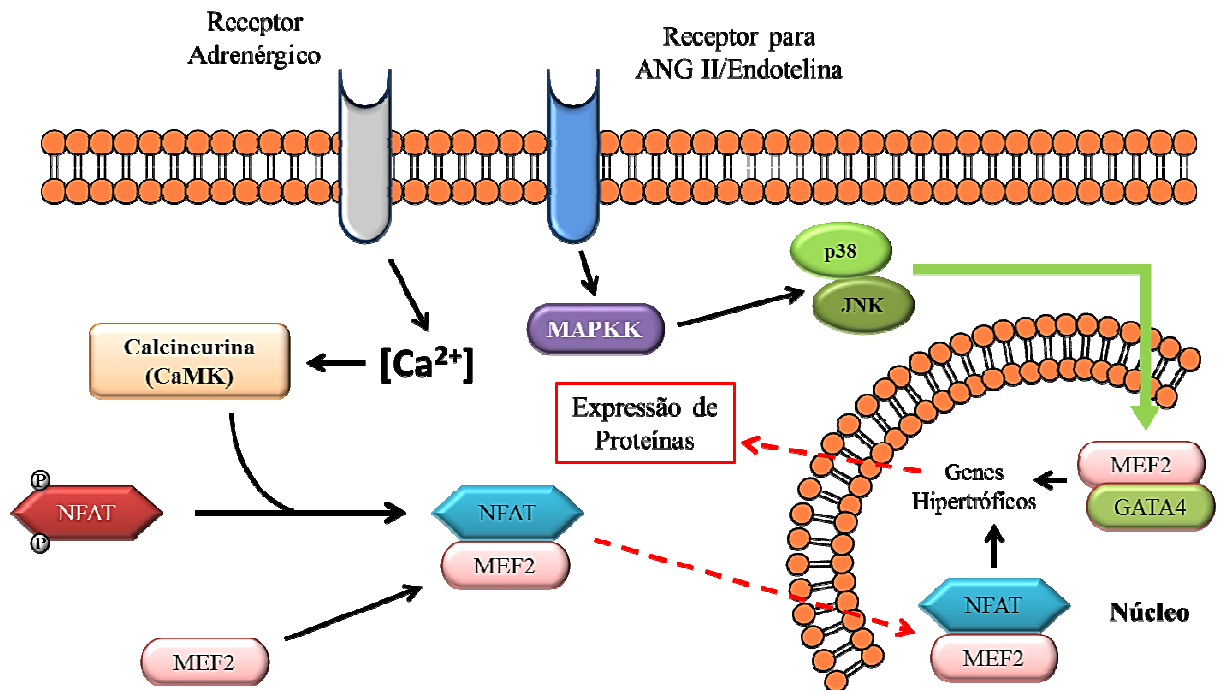
Dessa forma, a ativação das GRKs configura um mecanismo homeostático que pode estar envolvido em vários processos patológicos relacionados às vias de sinalização mediada pelos receptores acoplados às proteínas G, assim como os receptores β -adrenérgicos. Sustentando esta afirmativa, um estudo realizado recentemente mostrou que os mecanismos de dessensibilização e internalização mediados pelas GRKs são dependentes do modo como os receptores β_2 -adrenérgicos são estimulados, de forma que a ativação dos receptores β_2 -adrenérgicos de modo sustentado (60 minutos, continuamente) com epinefrina e/ou norepinefrina resultou em dessensibilização e internalização dos receptores β_2 -adrenérgicos de cardiomiócitos (FAN et al., 2016). Além disso, estudos mostram que na insuficiência cardíaca (IC) ocorre um aumento da síntese das isoformas GRK2 e GRK5 (AGÜERO et al., 2012). Estes achados reforçam o papel deletério destas isoformas de quinases nos parâmetros funcionais cardíacos (RAAKE et al., 2008; LYMPEROPOULOS et al., 2012), de forma que a elevação da concentração e do recrutamento destas enzimas potencializa a dessensibilização e a internalização dos receptores β -adrenérgicos, contribuindo para diminuição da contratilidade miocárdica, como é observado na IC (RAAKE et al., 2012; SALAZAR et al., 2013). Estes fatos apontam para importância das GRKs como potenciais alvos terapêuticos para o tratamento de diversas doenças cardíacas, principalmente as adaptações funcionais estabelecidas na IC.

Mecanismo Intracelular da Resposta Hipertrófica Miocárdica

O aumento do volume do miócito cardíaco é o fator principal para levar ao incremento do tamanho do coração. Embora esta resposta possa ser desencadeada por estímulos mecânicos ou humorais, os mecanismos intracelulares envolvidos induzem a elevação da síntese proteica. Nesse sentido, destaca-se a participação de proteínas fosfatases e/ou quinases intracelulares como fatores de transdução de sinais que regula a expressão de genes relacionados com a resposta hipertrófica (MOLKENTIN, 2004). Uma das proteínas fosfatases mais relevantes para a adaptação hipertrófica do miocárdio é a calcineurina (PP2B) (CHUNG

et al., 2013), uma fosfatase que remove grupamentos fosfatos de resíduos de aminoácidos serina/treonina presentes em outras moléculas proteicas(FIEDLER; WOLLERT, 2004;WILKINS; MOLKENTIN, 2004). A calcineurina é constituída de duas subunidades: uma catalítica (CnA – 60 kDa), codificada pelos genesPPP3CA e PPP3CB, e outra subunidade regulatória (CnB – 19 kDa) que é codificadapelo gene PPP3R1 no miocárdio dos mamíferos(PARRA; ROTHERMEL, 2017).

Figura 9 - Mecanismo Intracelular de Adaptação Hipertrófica do Miocárdio



Fonte: Autor, 2017.

Nota – As adaptações patológicas da hipertrofia cardíaca induzida pelo acionamento sustentado de receptores adrenérgicos são mediadas, de modo geral, pela via calcineurina/NFAT/MEF2. Esta via de sinalização intracelular é acionada pela elevação da concentração citoplasmática do cálcio (Ca^{2+}). O Ca^{2+} em altas concentrações forma o complexo cálcio/calmodulina ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) que ativa a calcineurina, uma proteína fosfatase dependente $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (CaMK). A calcineurina é responsável pela desfosforilação do fator nuclear de células T ativadas (NFAT – *Nuclear Factor of Activated T Cells*). Quando os fosfatos são removidos, o NFAT forma um complexo com o fator de crescimento do miócito 2 (MEF2 – *Myocyte Enhancer Factor-2*) e este complexo é translocado para o núcleo celular onde inicia a transcrição de genes fetais envolvidos com o aumento da síntese de proteínas contráteis e, dessa forma, aumenta a massa muscular do miocárdio. Os receptores para ANG II ($\text{AT}_{1/2}\text{R}$) e endotelina 1 (Endo-R) também desencadeiam vias de transcrição gênica que envolvem MEF2 e outro cofator, o GATA4, que são ativados pela via das MAPK/p38/JNK.

A ativação da calcineurina é totalmente dependente da concentração intracelular de cálcio (ANDERSEN et al., 2015; LI et al., 2015). A elevação citoplasmática do cálcio possibilita a formação de complexos cálcio/calmodulina ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) que, por sua vez, aciona a atividade enzimática da calcineurina (BUENO et al., 2002). O alvo intracelular da calcineurina é o fator nuclear de células T ativadas (NFAT – *Nuclear Factor of Activated T Cells*), de forma que os grupos fosfatos presentes são removidos pela calcineurina, possibilitando a complexação do NFAT ao fator de crescimento do miócito 2 (MEF2 – *Myocyte Enhancer Factor-2*) (PUTT et al., 2009; ZARAIN-HERZBERG et al., 2011). O complexo NFAT/MEF2, dessa forma, é translocado para o núcleo celular e induz a

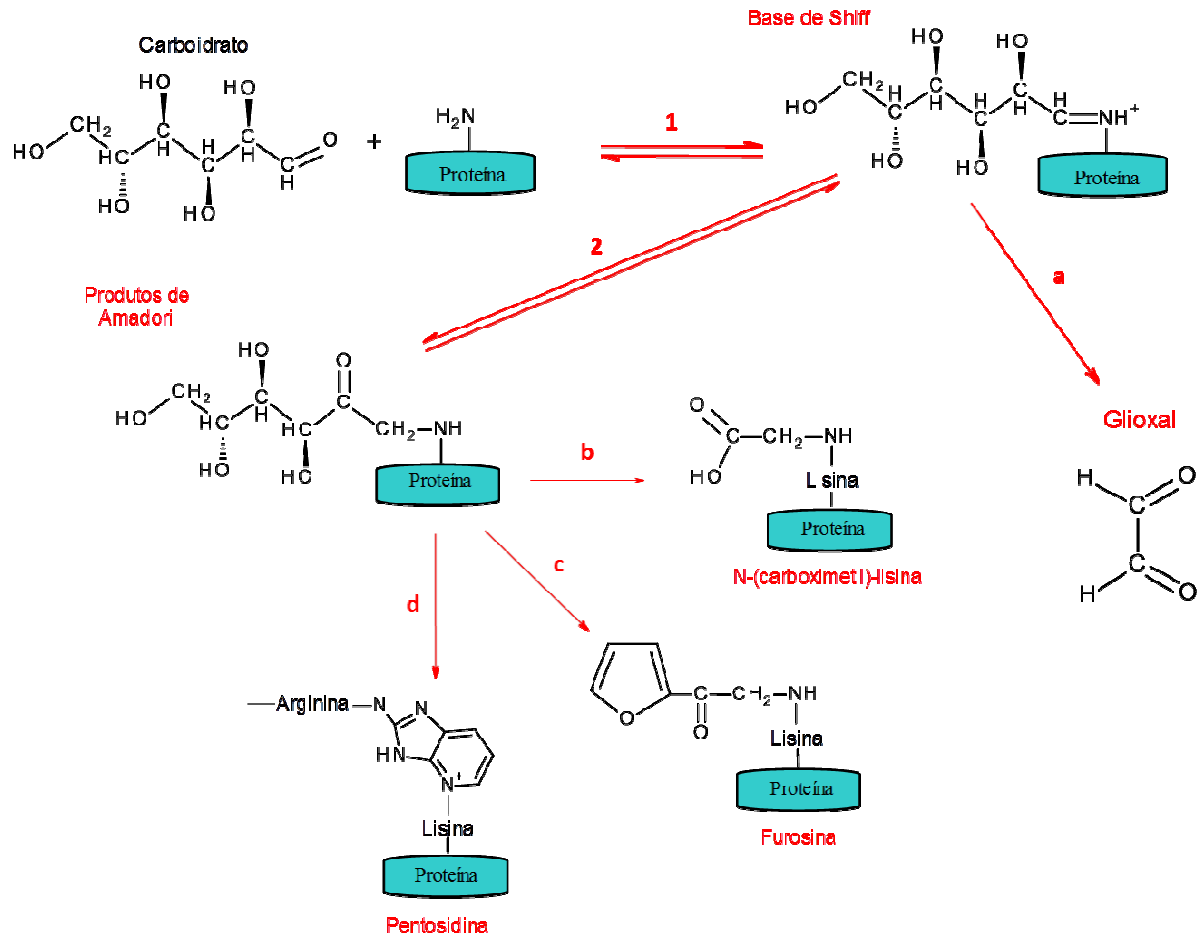
transcrição de genes pró-hipertróficos que, em seguida, ativa a síntese de proteínas intracelulares nos cardiomiócitos (THAM et al., 2015)(Figura 9).

3.3 Os Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs – *Advanced Glycation End-products*)

3.3.1 A Identidade Molecular dos AGEs

Os AGEs são uma classe de compostos que resultam de um complexo conjunto de reações não-enzimáticas que foram inicialmente descritas por Louis-Camille Maillard e, por isso, passaram a ser denominadas reação de Maillard (NAMIKI, 1988). Basicamente, a formação de AGEs ocorre em diferentes etapas, iniciando-se com uma reação de condensação de um grupamento amino de aminoácidos, peptídeos ou proteínas a um grupamento carbonílico pertencente à açucares redutores (SHARMA et al., 2015). O produto da primeira etapa da reação de Maillard é um composto intermediário com características carbinolamina que, ao ser desidratado, forma um aduto instável, chamado de base de Schiff. Este aduto pode sofrer alteração estrutural e gerar uma glicosilamina como produto final e com estabilidade maior que suas versões intermediárias. No entanto, em condições fisiológicas, a base de Schiff formada poderá sofrer mudanças estruturais e constituir substâncias precursoras dos produtos de Amadori (WRODNIGG; EDER, 2001). Estes produtos, por sua vez, podem tomar rotas diferentes que dependem, basicamente, do pH do meio: 1) em pH baixo, forma-se 1,2-dicarbonílicos e em seguida sofre desidratação e gera derivados de furfural; 2) em pH elevado, o produto de Amadori é convertido à 2,3-dicarbonílico e ao ser desidratado pode produzir redutonas, furanonas, piranonas e compostos α -dicarbonílicos (BARBOSA et al., 2016; YU et al., 2016) (Figura 10). Os compostos α -dicarbonílicos são altamente reativos e, por isso, são os principais precursores dos AGEs (SINGH et al., 2014).

Figura 10 - Reação de Maillard



Fonte: Autor, 2017.

Nota – A formação de AGEs é resultado de um conjunto de reações conhecidas como Reação de Maillard. A ocorrência destas reações não depende de ação enzimática, tornando-as um processo praticamente natural, dependendo apenas da presença das substâncias reativas iniciais, tais como carboidratos redutores e proteínas. Basicamente, o processo inicia-se com a condensação entre os grupamentos amina de resíduos de aminoácidos presentes nas proteínas e o grupamento carbonila de açúcares redutores. Esta reação resulta na formação dos primeiros intermediários, as Bases de Shiffs (1). A depender das condições fisiológicas, tais como o pH, a base de Schiff pode ser convertida em glioxal (a), uma substância altamente reativa que pode ainda reagir com outras proteínas, ou seguir a rota de síntese de intermediários mais estáveis chamados produtos de Amadori (2). Neste último caso, os produtos de Amadori que constituem substâncias precursoras dos produtos de glicação avançada (AGEs), tais como a N-(carboximetil)-lisina (b), a furosina (c) e a pentosidina (d). A síntese dos intermediários (Bases de Shiffs e Produtos de Amadori) podem levar alguns dias, enquanto que os produtos finais (AGEs) levam semanas a meses.

3.3.2 Mecanismo de Ação

Muitas complicações presentes em várias condições patológicas estão associadas ao acúmulo de AGEs. Seu papel patofisiológico depende da sua ação através de dois principais mecanismos: a) interação direta com proteínas endógenas; e b) ativação de receptores para AGEs (*RAGEs* – *Receptor for AGEs*) (OTT et al., 2014; KHANGHOLI et al., 2015). Além

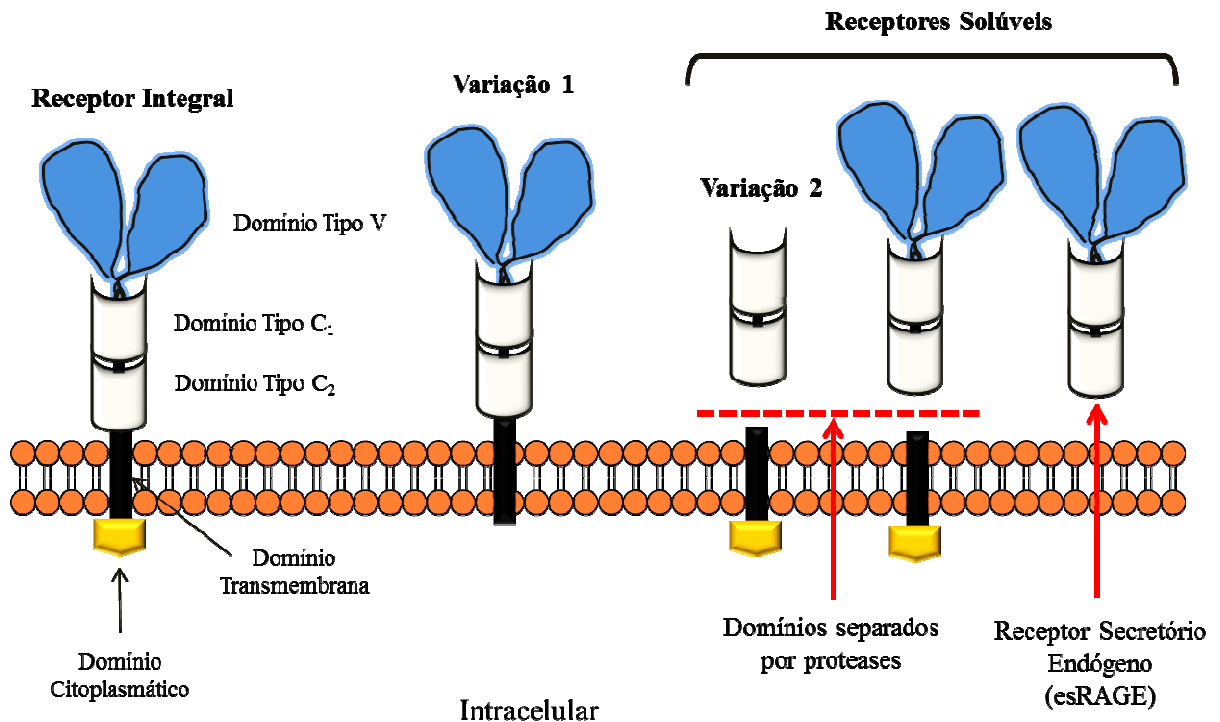
destes mecanismos, os produtos de glicação avançada também podem afetar as funções celulares através da indução do estresse oxidativo, estresse carbonílico, inibição enzimática e oxidação de ácidos nucleicos ou lipídios (MIYASHITA et al., 2016; SUANTAWEE et al., 2016).

A interação AGEs-proteínas endógenas pode constituir uma malha molecular responsável por alterar o fenótipo estrutural do tecido biológico, conferindo um aspecto de deformação do tecido (KHANGHOLI et al., 2015). Este tipo de mecanismo é muito comum no diabetes mellitus, uma doença metabólica crônica que é caracterizada por um estado de hiperglicemia. A alta concentração de glicose circulante favorece a um aumento na formação de AGEs, contribuindo, dessa forma, para o desenvolvimento e/ou estabelecimento de várias situações adversas que ocorre em indivíduos diabéticos. Uma dessas situações, que pode constar como uma consequência do aumento da síntese de AGEs, é a formação e deposição de placas de ateroma nos vasos e o enrijecimento vascular, fenótipo característico da aterosclerose (WANG et al., 2012; BRODEUR et al., 2014). Destaca-se ainda a capacidade dos produtos de glicação avançada induzir proliferação e apoptose de células musculares lisas e, dessa forma, contribuir para instauração do quadro aterosclerótico (KOIKE et al., 2016).

Os efeitos danosos dos AGEs sobre as funções celulares também podem ocorrer através da interação direta com receptores de membrana não-específicos (SINGH et al., 2014). Estes receptores fazem parte da classe das imunoglobulinas e, quando dotados da sua integridade molecular estrutural (*full length RAGE*), são compostos de 3 domínios extracelulares, a saber: um domínio com sítio de ligação tipo-V (*V-type*) e outros dois domínios tipo-C (C_1 e C_2 ; *C-type*) (DATTILO et al., 2007) (Figura 11). Existem ainda outros dois domínios, sendo um transmembrana, responsável pelo atracamento do receptor à membrana, e outro intracelular/citosólico que está envolvido com o mecanismo de transdução do sinal (YAMAGISHI; MATSUI, 2015).

Estes receptores podem, ainda, apresentar-se na superfície da membrana celular em duas variações: 1) *Variação 1* – esta variação não apresenta o domínio citosólico e, devido a esta condição impossibilita a transdução do sinal, mesmo que o ligante se acople ao domínio tipo-V; 2) *Variação 2* – diferente da variação 1, esta não contém o sítio de ligação, o domínio tipo-V, não permitindo o acionamento do receptor (XIE, JIANLING et al., 2013) (Figura 11). Muitos tipos de células expressam os RAGEs em suas membranas, tais como células endoteliais (ZHANG et al., 2016), células musculares lisas (SIMARD et al., 2015), miócito cardíaco (NEVIERE et al., 2016), neurônios (PIRAS et al., 2016), células hepáticas (YUE et al., 2015) e monócitos (UHLE et al., 2015).

Figura 11 - Isoformas dos Receptores para AGEs (RAGEs)



Fonte: Autor, 2017.

Nota – Os receptores para AGEs (RAGEs) podem ser encontrados em 5 isoformas: receptor integral (*full length RAGE*), variação tipo 1 e solúveis. O receptor integral é constituído de 5 domínios: domínio tipo V que contém o sítio de ligação para os AGEs; domínios tipo C (C₁ e C₂); domínio transmembrana, responsável pela fixação do receptor à membrana e domínio citoplasmático, envolvido no mecanismo de transdução do sinal intracelular. Todas as outras isoformas são incapazes de desencadear a transdução do sinal intracelular, ou por não apresentarem o domínio citoplasmático (variação 1) ou o domínio tipo V (variação 2). As isoformas solúveis são assim chamadas devido a possibilidade de detecção nos fluídos extracelulares. Estas isoformas podem resultar de uma variação genética, como é o caso do receptor secretório endógeno (*esRAGE – endogenously secreted RAGE*) que é expresso sem a presença de domínio transmembrana, ou pela ação de metaloproteases que podem clivar os receptores integrais ou os receptores *Variação 2*, exatamente no domínio transmembrana, impedindo sua fixação à membrana e aumentando, dessa forma, a concentração plasmática dos RAGEs.

Os receptores para AGEs também podem ser encontrados nas formas solúveis, no meio extracelular (YAMAGISHI; MATSUI, 2010). Estes receptores são subdivididos em duas isoformas: RAGE solúvel (*sRAGE – soluble RAGE*) e RAGE endogenamente secretado (*esRAGE – endogenously secreted RAGE*) (MORIYA et al., 2014). Ambas isoformas tem uma característica estrutural em comum que consiste em não apresentarem o domínio transmembrana e a região C-terminal do receptor, tornando a sinalização intracelular impossível (PRASAD, 2014). No entanto, o que diferencia uma isoforma da outra é o fato do sRAGE não apresentar o domínio tipo-V, impossibilitando, dessa forma, a ligação de

moléculas sinalizadoras ao receptor(KOYAMA; YAMAMOTO, 2007). Embora o sRAGE tenha uma forte semelhança com a viação tipo 2 do receptor, por não apresentarem o sitio de ligação do receptor, este último apresenta-se inserido na membrana plasmática através do domínio transmembrana, enquanto a isoforma solúvel está desconectada da membrana plasmática, podendo ser detectado na circulação sanguínea (YAMAGISHI; MATSUI, 2010;SAITO et al., 2017)(Figura 11).

Dentre as várias respostas evocadas pela ativação dos receptores para AGEs, uma vez que estes são sensíveis à uma diversidade grande de moléculas sinalizadoras extracelulares, pode-se destacar a elevação do estresse oxidativo e os consequentes efeitos adversos que acompanham a produção de espécies reativas (WAUTIER et al., 2016; XU et al., 2016). Nesse sentido, o acionamento dos RAGEs desencadeia processos inflamatórios via ativação de uma série de mecanismos intracelulares, tais como a via dasMAPKs/ERKs (*Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase*) (ISHIHARA et al., 2003), que induzem a síntese de fatores de transcrição pró-inflamatórios, como o fator nuclear kappa-B (*NF-κB – Nuclear Factor-κB*) (CHEN et al., 2016; HAO et al., 2016). Consequentemente, o aumento intracelular de NF-κB estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e IL-8, e resulta numa condição de inflamação exacerbada(RASHEED et al., 2011; SERBAN et al., 2015). Tal resposta é uma ilustração clássica e característica dos comprometimentos vasculares observados na aterosclerose, uma doença crônica que pode se desenvolver como consequência do diabetes mellitus(CHUNG et al., 2016). Associado a isso, a disfunção endotelial, uma alteração funcional constatada nos vasos em decorrência da aterosclerose, pode ser induzida pela ativação dos RAGEs, sendo o TNF-α uma das citocinas pro-inflamatórias expressas que está envolvida com o mecanismo de ativação do NF-κB, potencializando os processos inflamatórios no diabetes mellitus (GAO et al., 2008).

Muitos trabalhos foram realizados com o objetivo de investigar a relação da ocorrência dos receptores solúveis para AGE e doenças cardiometabólicas (KOYAMA et al., 2007). Nesse sentido, um trabalho pioneiro realizado por Park e colaboradores (1998) foi um dos primeiros a revelar o papel terapêutico dos receptores solúveis para AGE no tratamento da aterosclerose. Os autores provaram que o tratamento de camundongos, susceptíveis geneticamente ao desenvolvimento da aterosclerose, com sRAGE foi capaz de suprimir as lesões aterogênicas induzidas pelo diabetes. Na sequência, outro estudo comprovou que o tratamento com a isoforma sRAGE foi capaz de diminuir a formação da placa aterogênica e atenuar processos inflamatórios induzidos pelo diabetes (BUCCIARELLI et al.,

2002;YAMAGISHI; MATSUI; NAKAMURA, 2007). Além destes, estudos posteriores elevaram o nível de evidências relacionando o papel benéfico do sRAGE exógeno na progressão das complicações diabéticas, sugerindo uma função “*scavenger*” para esta isoforma de receptor, ou seja, eliminando e/ou impedindo a ligação dos AGEs circulantes aos receptores integrais (*full length RAGE*) nas membranas plasmáticas das células-alvos (JURANEK et al., 2016; SAITO et al., 2016). Para considerar esta possibilidade, vale destacar que a única possibilidade para o efeito terapêutico atribuído a isoforma solúvel do RAGE é se este for o esRAGE que apresenta o domínio de ligação para AGEs intacto na sua estrutura molecular (PRASAD, 2014). Sendo assim, o efeito terapêutico dos receptores para AGEs é totalmente dependente da sua isoforma, sendo o receptor esRAGE o mais efetivo no combate às complicações causadas pela elevação da produção de AGEs.

3.4 A Química Medicinal e o Desenvolvimento de Novos Fármacos

3.4.1 Estratégias de Desenvolvimento de Novos Fármacos

O avanço no desenvolvimento de novos fármacos tem uma relação direta com a evolução da Química Medicinal (QM). De acordo com a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), a Química Medicinal é uma disciplina ou área de estudos da química que relaciona outras ciências, tais como as biológicas, as médicas e as farmacêuticas (WERMUTH et al., 1998). Tal conjugação de áreas e suas interações reflete num objetivo claro para a QM que corresponde a planejar, descobrir, desenvolver, identificar e preparar compostos com ação biológica que possibilitem entender e/ou estudar o metabolismo, mecanismos de ação molecular e instituir relações entre a estrutura química do composto desenvolvido e a sua atividade farmacológica (LIMA, 2007).

O desenvolvimento de um novo fármaco é compreendido em três etapas bem definidas: descoberta, otimização e o desenvolvimento do protótipo (SANGI, 2016). Embora o processo seja compreendido em diferentes etapas, em todas elas a QM faz uso de estratégias que possibilitam realizar alterações nas estruturas moleculares. Tais estratégias podem ser baseadas em dois tipos de métodos de modificações moleculares: 1) métodos clássicos e 2) métodos modernos. Dentre os métodos clássicos, destacam-se o bioisosterismo, a simplificação e a hibridação molecular (GAIKWAD et al., 2012). Já os métodos modernos envolvem o uso de técnicas computacionais, tais como a modelagem molecular e o QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships*), um modelo matemático de análise quantitativa da relação

entre a estrutura molecular e a sua atividade biológica (TINBERG et al., 2013; CHERKASOV et al., 2014).

O bioisosterismo é definido como uma técnica de síntese de compostos químicos com atividade biológica, onde diferentes substituintes ou grupos atômicos são introduzidos na estrutura molecular sem alterar as propriedades químicas ou físicas dos compostos, de modo que a atividade biológica seja preservada (GAIKWAD et al., 2012). Este tipo de estratégia de modificação molecular é baseado no conceito de isosterismo criado por Langmuir em 1919, onde ele considerou que dois elementos são isósteres se os mesmos possuírem o mesmo número e organização dos elétrons e duas moléculas seriam isósteres se apresentassem o mesmo número de átomos (SETHY et al., 2013). Por sua vez, a simplificação molecular consiste em outro método racional de alteração ou síntese de moléculas onde uma substância protótipo é utilizada para identificação de suas subunidades farmacofóricas e a partir destas subunidades são produzidas novas moléculas mais simples com as propriedades bioativas preservadas (BARREIRO, 2002).

O desenvolvimento de ligantes ou moléculas protótipos a partir da técnica de hibridação molecular configura uma ferramentaracional muito segura, onde subunidades farmacofóricas de duas ou mais moléculas com propriedades bioativas conhecidas são fundidas e formam novas estruturas moleculares híbridas com as características farmacofóricas preservadas (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007). Uma das principais vantagens apontadas com o uso desta técnica é a possibilidade de otimizar a afinidade entre moléculas, tais como um receptor de membrana e um ligante (FRAGA, 2009; SUN et al., 2014). Destaca-se ainda como objetivos para utilização da hibridação molecular: a) possibilidade de sinergismo da ação farmacológica; b) terapia farmacológica de ação dupla e c) modulação de efeitos colaterais (NEPALI et al., 2014). Basicamente, a ação sinérgica de um híbrido se dá quando o mesmo atua em vias bioquímicas distintas para incrementação da mesma atividade farmacológica (ARAÚJO et al., 2015). Quanto ao híbrido de ação dupla, atribui-se uma característica simbiótica, de modo que exerce duas ações farmacológicas distintas, combatendo os sintomas e causas decorrentes da doença. Por fim, o composto com função moduladora é obtido quando um protótipo, ou grupo farmacofórico, com ação terapêutica e um efeito indesejável associado é fundido a outro fármaco, ou grupamento farmacofórico, que terá a função de atenuar ou anular o efeito colateral do primeiro (HWANG et al., 2013; LEITE, 2015).

3.4.2 Os Derivados Guanidínicos e o Tratamento das Doenças Cardiovasculares

Os Derivados Guanidínicos (DG) constituem uma classe de compostos químicos com diversas atividades farmacológicas (SACZEWSKI; BALEWSKI, 2013). Nesse sentido, há relatos científicos atribuindo aos derivados guanidínicos uma importante função moduladora de algumas funções cerebrais, sugerindo uma potencial ferramenta no tratamento de doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer (PETRONILHO et al., 2015). Outra importante ação farmacológica pertencente aos derivados guanidínicos é a capacidade antiproliferativa (FRANÇA et al., 2016; SILVA et al., 2016), atacando linhagens de células tumorais, e também anti-HIV, impedindo a interação entre o DNA viral e o DNA da célula hospedeira (JIN; MCGRATH; XU, 2015). Além das atividades destacadas, os compostos guanidínicos ainda apresentam ação antibacteriana e antifúngica (LI et al., 2015; WEI et al., 2016).

Além dos variados efeitos farmacológicos citados, os compostos guanidínicos também são eficientes moduladores do sistema cardiovascular, podendo ser utilizados como ferramentas para o tratamento de doenças cardiovasculares. Nesse sentido, o guanabenz surge como um importante representante dos derivados guanidínicos com ação anti-hipertensiva (HOLMES et al., 1983). O guanabenz é um agonista de receptores α_2 -adrenérgico que atua no sistema nervoso central, modulando negativamente a atividade simpática e, dessa forma, reduzindo a pressão arterial e a frequência cardíaca (HASHIMOTO et al., 2003; SICA, 2007). Estudos mostram que a ação farmacológica do guanabenz sobre o sistema nervoso simpático é diretamente dependente da ativação de proteínas G_i (WAINFORD; KAPUSTA, 2012). Além dos efeitos diretos sobre os parâmetros cardiovasculares, essenciais para o tratamento da hipertensão, este derivado guanidínico também apresenta efeitos sobre o metabolismo lipídico, reduzindo os níveis totais de colesterol e a síntese de triglicerídeos em hepatócitos (CAPUZZI, 1984).

Assim como o guanabenz, o fármaco clonidina é um agonista α_2 -adrenérgico que apresenta ação farmacológica vasorrelaxante através da elevação dos níveis de óxido nítrico e, assim, contribuindo para atividade anti-hipertensiva (HASHIMOTO et al., 2003; PIMENTEL et al., 2007). A clonidina, além de ativar também receptores α_2 -adrenérgicos no sistema nervoso central, também é um agonista de receptores imidazoline, onde a interação sinérgica

de ativação destes receptores pelo derivado mencionado é responsável pela modulação autonômica na resposta hipotensora (HEAD et al., 1998). Nesse sentido, recentemente foi mostrado uma relação direta entre o tratamento com baixas doses de clonidina (25µg ou 50µg) em pacientes jovens com síndrome da fadiga crônica e a diminuição dos níveis circulantes de catecolaminas (FAGERMOEN et al., 2015). Além dos efeitos cardiovasculares, a clonidina surge como uma proposta terapêutica para modulação do metabolismo ósseo, uma vez que já foi mostrado que este composto pode aumentar a reabsorção óssea (LIMONARD et al., 2016). Também já foi mostrado que a clonidina, em baixas doses (40 ou 80 µg/kg de peso corporal), pode reduzir a ingestão de álcool em modelos animais via ativação noradrenérgica (RASMUSSEN et al., 2014). No entanto, o mecanismo de modulação do comportamento que controla a ingestão de álcool necessita ser esclarecido, pois outros trabalhos sugerem que antagonistas de receptores α_1 -adrenérgicos são capazes de promover os mesmos efeitos da clonidina sobre a ingestão de álcool (O'NEIL et al., 2013; RASMUSSEN et al., 2014b).

Melero e colaboradores (MELERO et al., 1998) desenvolveram derivados guanidínicos que apresentaram efeitos farmacológicos cardiovasculares antagônicos. Dentre os compostos sintetizados, enquanto alguns demonstraram reduzir a força de contração do miocárdio, um dos derivados foi eficaz em provocar efeito inotrópico positivo, uma ação farmacológica essencial para o tratamento da insuficiência cardíaca. Em um estudo pioneiro, foi mostrado que a agmatina, uma amina sintetizada endogenamente que compete com a clonidina pelos receptores α -adrenérgicos e imidazoles (*CDS - Clonidine-Displacing Substance*) (ATLAS; BURSTEIN, 1984), foi capaz de reduzir a pressão arterial de ratos sob efeito de anestesia quando administrado por via intravenosa (SUN et al., 1995). Baseado nesta característica farmacológica da agmatina, Yang e colaboradores (YANG et al., 2005) mostraram que esta substância tem efeitos equivalentes ao derivado clonidina, de modo que a administração da agmatina em núcleos bulbares resultou em redução da frequência cardíaca e da pressão arterial. Mais recentemente, foi demonstrado que esta substância apresenta ação cardioprotetora (YARMOHMMADI et al., 2017) e suprime o tônus simpático periférico via ativação de receptores imidazoline (KIM et al., 2016). Ao se observar as potencialidades farmacológicas da agmatina, derivados foram sintetizados a partir desta substância com inclusão de anéis guanidínicos na estrutura molecular, resultando em análogos com maior afinidade pelos receptores α -adrenérgicos e imidazoline (TREDER et al., 2011).

3.4.3 Aminoguanidina: Uma Proposta Terapêutica Para o Tratamento de Doenças Cardiovasculares e a Hipertrofia Cardíaca

A aminoguanidina (AG; CH_6N_4) é, quimicamente, uma substância compostapor uma hidrazina nucleofílica(- NHNH_2) associada à uma fração guanidina [$-\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$] que podem interagir facilmente com os grupamentos carbonilas ($R=\text{C}=\text{O}$) de diversas moléculas biológicas (NIGST et al., 2012). Esta característica confere à AG uma propriedade muito útil para inibir enzimas que apresentam o grupamento carbonila como cofatores, assim como a óxido nítrico sintase(*NOS – Nitric Oxide Synthase*)(ANAEIGOUDARI et al., 2016; LAFIONIATIS et al., 2016) e a amina oxidase semicarbazida-sensível (*SSAO – Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase*)(CIONI et al., 2006; PRÉVOT et al., 2007). No entanto, a capacidade de inibir a formação de produtos finais de glicação avançada (*AGEs – Advanced Glycation End-products*) é a atividade mais pronunciada da AG(LO et al., 1994; THORNALLEY, 2003). Nesse sentido, a ação farmacológica da AG tem sido avaliada em condições patológicas onde os AGEs estão relacionados com as complicações observadas, tais como no diabetes mellitus (NENNA et al., 2015).

Embora muitos trabalhos publicados atualmente tenham mostrado o potencial farmacológico da AG no tratamento de complicações diabéticas, esta substância foi inicialmente proposta como um agente terapêutico para os efeitos adversos do formaldeído em sistemas biológicos(KALÁSZ, 2003). O formaldeído (CH_2O) é considerado uma molécula simples, porém, de muita relevância para muitos processos celulares, tais como proliferação e diferenciação celular(SZENDE; TYIHÁK, 2010), além de apoptose (NIE et al., 2007) e neurodegeneração (SONGUR et al., 2010; TULPULE; DRINGEN, 2013). Um dos primeiros estudos mostrando a relevância da AG no metabolismo do formaldeído foi realizado por Berheim (BERNHEIM, 1950). Neste trabalho, foi mostrado que a AG contribuiu com o aumento da taxa de oxidação do formaldeído quando misturado com extrato de tecido hepático de ratos. Posteriormente, Mchels e colaboradores (1962) mostraram que o produto da oxidação do formaldeído na presença da AG em extrato de tecido hepático é o ácido fórmico, colaborando para a neutralização dos possíveis efeitos tóxicos do formaldeído e/ou seus metabólitos (YU et al., 2002, 2003; SONGUR et al., 2010).

O uso da AG no tratamento do diabetes e das complicações cardiovasculares associadas ao envelhecimento vêm ganhando destaque, principalmente pela sua capacidade antiglicante(CANTINI et al., 2001; STADLER et al., 2005). O trabalho realizado por Brownlee e colaboradores (1986) foi o primeiro a chamar a atenção para a relação entre os

efeitos da AG no tratamento do diabetes. Na ocasião, foi mostrado que além de prevenir a formação de AGEs, a AG também reduziu a formação de ligações cruzadas entre moléculas de colágeno e glicose em artérias de ratos diabéticos, uma condição estrutural do tecido que está relacionado com os comprometimentos vasculares, tais como a diminuição da complacência dos vasos (MONNIER et al., 1988; ARONSON, 2003). Em seguida, foi comprovado por Huijberts e colaboradores (1993) que o tratamento de ratos diabéticos com AG melhorou os parâmetros funcionais vasculares, de forma que a complacência dos vasos foi restaurada. Desde então, um grande número de evidências científicas surgiram e demonstraram os efeitos terapêuticos da AG em diversos modelos animais de diabetes e problemas associados ao envelhecimento, inibindo o desenvolvimento da retinopatia e nefropatia diabética (HAMMES et al., 1991; ELLIS; GOOD, 1991), prevenindo a ocorrência da disfunção leucocitária (SANNOMIYA; OLIVEIRA; FORTES, 1997), preservando a função erétil (USTA et al., 2003; 2004), promovendo neuroproteção (ZIMMERMAN et al., 1995; COCKROFT et al., 1996) e protegendo contra danos cerebrais isquêmicos (CHAN et al., 2004).

Um estudo pioneiro, realizado por Corman e colaboradores (1998), foi um dos primeiros a mostrar as possibilidades terapêuticas da AG para tratar complicações cardiovasculares advindas com o envelhecimento. Neste trabalho, os autores mostraram que ratos não-diabéticos envelhecidos apresentaram redução da hipertrofia cardíaca e do enrijecimento vascular arterial quando tratados com AG. Embora o tratamento não tenha alterado a produção de colágeno, foi sugerido que o composto tenha revertido a ligação cruzada entre as moléculas de colágeno e AGEs. Esta hipótese foi testada posteriormente por Herrmann e colaboradores (HERRMANN et al., 2003), onde foi comprovado que a AG reverteu a produção de ligações cruzadas entre colágeno e AGEs no modelo de hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga mecânica. A função anti-fibrótica da AG foi testada também em modelos animais para diabetes, de forma que a sua eficácia foi relacionada com a diminuição da atividade de metaloproteases de matriz (MMPs) (VADLA; VELLAICHAMY, 2012). Estes achados apontam para os efeitos benéficos da AG na complacência miocárdica, prevenindo a disfunção diastólica que pode ocorrer a partir do aumento da deposição de colágeno e a produção de AGEs no tecido cardíaco (CHAN et al., 2006; WU et al., 2008).

A elevação da produção de AGEs e seus intermediários em modelos animais de hipertensão ou em pacientes humanos sugere ou justifica o interesse pelos efeitos da AG como estratégia farmacológica para o tratamento da hipertensão. Nesse sentido, um estudo com ratos espontaneamente hipertensos (SHR – *Spontaneously Hypertensive Rats*), realizado

por Wu e Juurlink (2002), mostrou que os níveis basais de metilglioxal (MG), um dos intermediários de AGEs mais conhecidos e altamente reativo (BANERJEE et al., 2016), e AGEs encontra-se extremamente elevados em células musculares lisas vasculares (*VSCM – Vascular Smooth Muscle Cells*). Além disso, quando incubadas com MG exógeno, as *VSCM* de ratos hipertensos apresentaram aumento na produção de AGEs e ativação exacerbada de NF- κ B, sugerindo uma participação significativa do eixo AGEs/RAGEs/NF- κ B na patogênese da hipertensão. Na sequência, foi comprovado por Wang e colaboradores (2004) que os níveis plasmáticos e renais de MG estiveram aumentados em ratos SHR. Tais alterações observadas, onde há aumento na concentração tecidual ou plasmática de MG e/ou AGEs, estão associadas à um incremento no estresse oxidativo, contribuindo, dessa forma, para o agravamento da hipertensão (WANG et al., 2005; CHANG; WU, 2006). Estudos mais recentes com animais, têm mostrado que o aumento da formação de MG ou AGEs não está condicionado apenas à um quadro de hipertensão. Já se sabe que o aumento da ingestão de frutose, um carboidrato precursor do MG, favorece a síntese deste intermediário em ratos normotensos e acarreta em aumentos na pressão arterial através da ativação do sistema renina-angiotensina (VASDEV et al., 2010; DHAR et al., 2013).

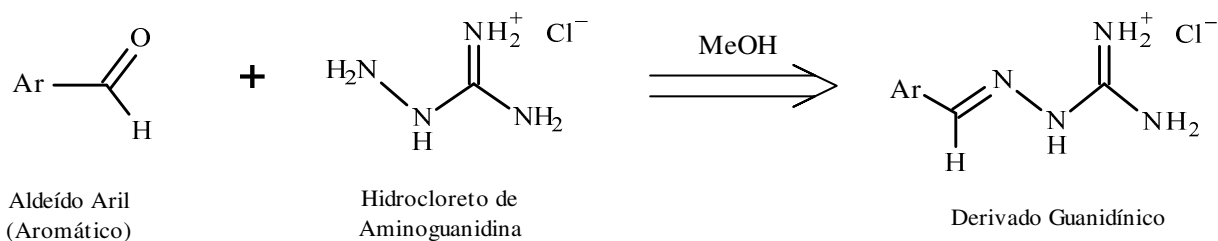
Desde então, muitos estudos foram realizados com o objetivo de investigar o potencial terapêutico da AG no tratamento da hipertensão. Nesse sentido, Dhar e colaboradores (2010) observaram que a incubação de anéis aórticos de ratos normotensos com AG preveniu os efeitos adversos do MG na reatividade vascular. Em outro trabalho, Mukohda e colaboradores (2012) constataram que o tratamento de ratos SHR com o composto foi capaz de atenuar a hipertensão e reduziu o acúmulo de MG em vasos mesentéricos. Huang e colaboradores (2013) sugerem que os efeitos da AG no controle da hipertensão, além de reduzir a deposição de MG e AGEs, ocorre através do aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico, uma vez que observaram uma elevação dos níveis de L-arginina em função do tratamento. Diante do exposto e do grande número de evidências científicas, a AG assume um papel relevante entre as ferramentas farmacológicas para o tratamento das complicações causadas pelo diabetes mellitus e a hipertensão arterial.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Síntese dos Derivados Guanidínicos

A síntese dos derivados seguiu como descrito por França e colaboradores (2016). Brevemente, a reação de síntese consistiu em proporcionar a condensação de um aldeído aril com hidrocloreto de aminoguanidina ($\text{NH}_2\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$) na proporção 1:1,25 (Figura 12).

Figura 12 - Esquema de Síntese dos Derivados Guanidínicos

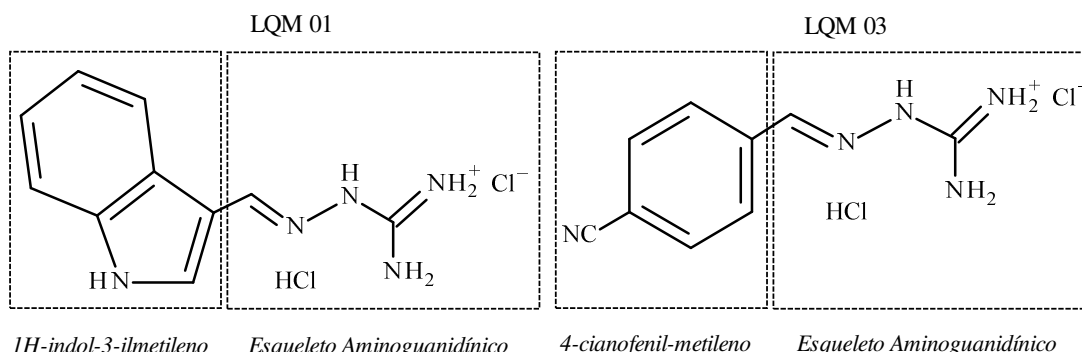


Fonte: Autor, 2017.

Nota – Esquema geral de síntese dos derivados guanidínicos utilizados. A síntese dos derivados consistiu em uma simples reação de condensação entre aldeídos aromáticos (Ar) com hidrocloreto de aminoguanidina em metanol (MeOH).

Os compostos foram dissolvidos em metanol (MeOH), aquecidos sob refluxo e agitados de um dia para o outro. Após resfriar a temperatura ambiente, o produto cristalizado foi separado da solução de metanol através secagem à vácuo por uma noite. Na sequência, os cristais obtidos foram triturados com acetato de etila ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) para produzir os compostos na forma de pó. Os derivados LQM 01 e LQM 03 foram obtidos a partir do mesmo esqueleto aminoguanidínico condensado a dois aldeídos aromáticos diferentes (Ar): *1H-indol-3-ilmetileno* e *4-cianofenil-metileno*, respectivamente (Figura 13).

Figura 13 - Derivados Guanidínicos LQM 01 e LQM 03

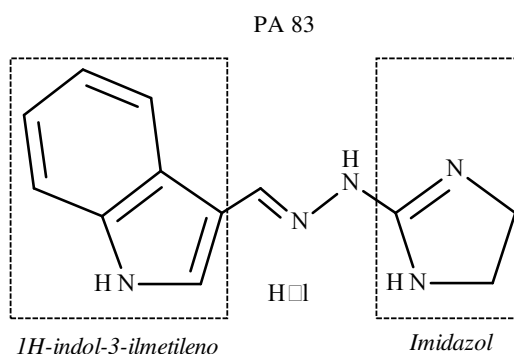


Fonte: Autor, 2017.

Nota – Os derivados aminoguanidínicos LQM 01 ($C_{10}H_{14}ClN_5$; PM = 239,70 g/mol) e LQM 03 ($C_9H_{12}ClN_5$; PM = 225,68 g/mol) foram sintetizados a partir da condensação entre aminoguanidina e *1H-indol-3-ilmetileno* e *4-cianofenil-metileno*.

O derivado PA83, diferentemente dos compostos anteriores, foi obtido a partir do derivado LQM 01, substituindo-se o grupamento guanidínico por um aldeído (Figura 14).

Figura 14 - Derivado Aminoguanidínico PA 83



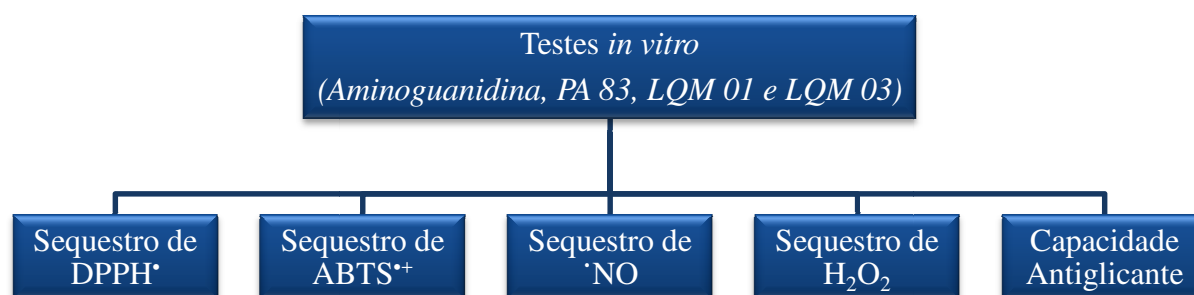
Fonte: Autor, 2017.

Nota – A síntese do derivado PA 83 ($C_{12}H_{13}N_5$; PM = 227,26 g/mol) deu-se a partir da condensação entre o composto LQM 01 e um anel imidazol, substituindo o grupamento guanidínico da molécula anterior.

4.2 Delineamento Experimental – Testes *in vitro*

O delineamento experimental inicial consistiu em realizar uma série de experimentos *in vitro* para se avaliar a capacidade antioxidante da aminoguanidina e de 3 substâncias sintéticas derivadas da aminoguanidina: PA83, LQM01 e LQM03. A capacidade antioxidante dos derivados mencionados foi avaliada através de quatro métodos diferentes: sequestro de radical DPPH[•], sequestro de radical ABTS^{•+}, sequestro de óxido nítrico ([•]NO) e sequestro de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Além da capacidade antioxidante, os derivados também foram submetidos à avaliação da capacidade antiglicante *in vitro*.

Figura 15 - Esquema dos Testes *in vitro*



Fonte: Autor, 2017.

Nota – A aminoguanidina e os derivados guanidínicos PA83, LQM01 e LQM03 foram submetidos à avaliação da capacidade antioxidante e antiglicante.

4.2.1 Avaliação da Capacidade Antioxidante

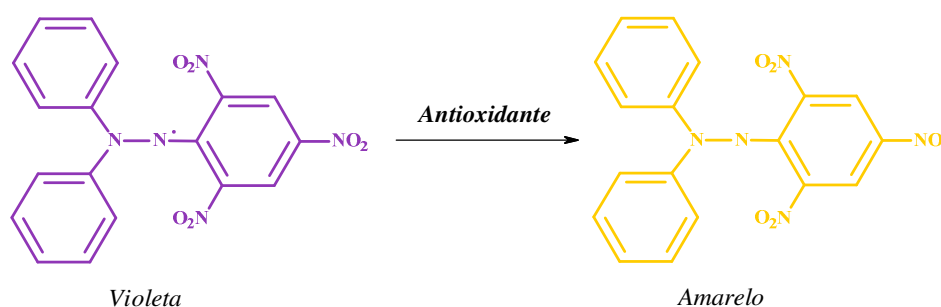
4.2.1.1 Sequestro do Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil(DPPH[•])

Um dos métodos mais utilizados para avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* é o de sequestro do radical DPPH[•](SHARMA; BHAT, 2009). Neste método, a substância-teste é submetida a uma análise da sua capacidade de reduzir a molécula radicalar DPPH[•] e a formação de hidrazina através da doação de átomos de hidrogênio (ANTOLOVICH et al., 2002). A cinética de reação da formação de hidrazina a partir da redução do radical DPPH[•] favorece a mudança da cor violeta para amarelo (MOLYNEUX, 2004)(Figura 16).

Nesse sentido, avaliou-se a capacidade dos derivados guanidínicos reduzir o radical DPPH[•]. Para este fim, inicialmente, soluções dos derivados foram preparadas a uma concentração de 400 mg·L⁻¹ em metanol 30%. Em seguida, a partir destas soluções, procedeu-

se a preparação de diferentes diluições a fim de se obter uma curva de calibração/padrão em função de diferentes concentrações dos derivados (1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 mg·L⁻¹). Além dos derivados, utilizou-se também a aminoguanidina para avaliar sua capacidade antioxidante *in vitro* e comparar com os derivados.

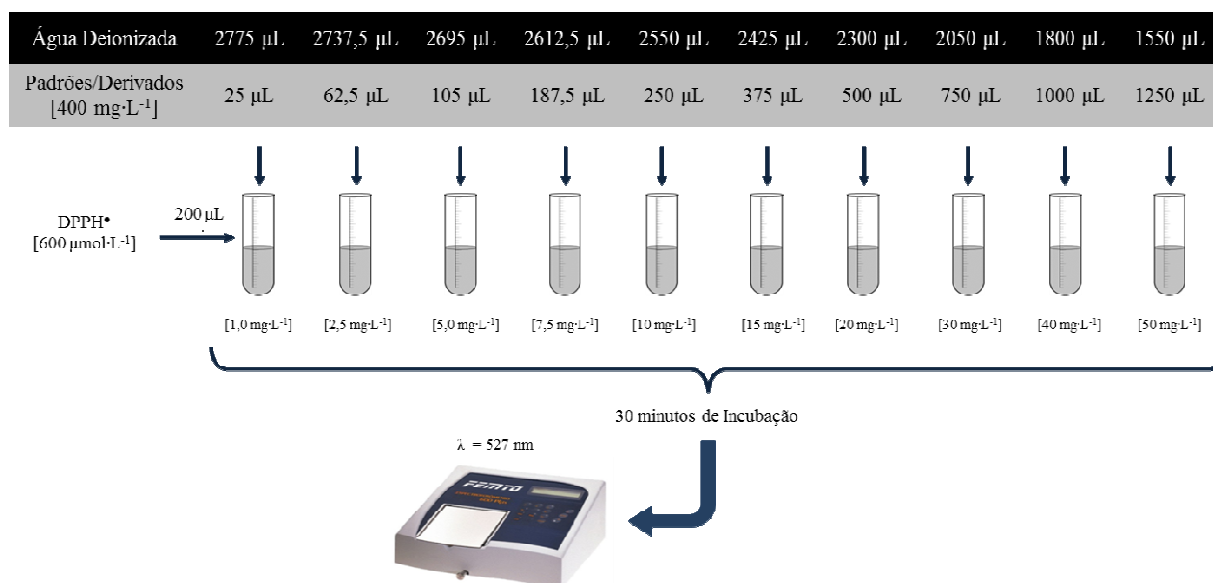
Figura 16 - Representação da reação entre o radical DPPH[•] e uma substância antioxidante genérica (HCA)



Fonte: Adaptado de Oliveira(2013).

Nota – A reação de redução do radical DPPH[•] a partir de outra molécula ou agente antioxidante (HCA) favorece a mudança colorimétrica do violeta para o amarelo. Tal resposta antioxidante pode ser monitorada através da mensuração da absorvância da solução a um comprimento de onda de 527 nm.

O ensaio consistiu em adicionar 0,20 mL de solução DPPH[•] (600 μmol L⁻¹), 1,0 mL de cada uma das amostras (derivados ou aminoguanidina) ou solução de referência (Trolox) e 2,80 mL de água deionizada, nesta ordem, totalizando um volume final de 4,0 mL. Após incubação de 30 minutos à temperatura ambiente, realizou-se a mensuração da absorvância ($\lambda = 527$ nm) com cubetas de vidro (1,0 cm de caminho óptico) em um espectrofotômetro (Femto® 600 plus) (Figura 17). O sinal de referência (Branco) foi obtido a partir de uma solução semelhante a anterior, no entanto, a amostra foi substituída por água. O trolox, um potente antioxidante, foi usado como substância controle ou de referência e os resultados da capacidade antioxidante foram expressos em equivalentes (mg·L⁻¹) do mesmo.

Figura 17 - Esquema do Ensaio de Sequestro do Radical DPPH[•]

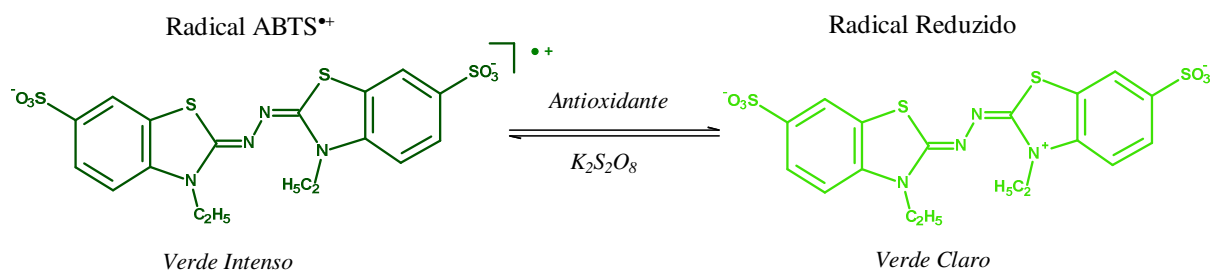
Fonte: Autor, 2017.

Nota – O ensaio da capacidade de sequestrar o radical DPPH[•] foi utilizado para avaliação da capacidade antioxidante dos derivados aminoguanidínicos. A partir de uma solução estoque (400 mg·L⁻¹; MeOH 30%), procedeu-se a diluição para formação da curva de calibração com os derivados PA 83, LQM 01 e LQM 03. O trolox e a quercetina foram utilizados como controles positivos (padrões) a fim de comparação dos resultados. A reação foi iniciada com a adição de 200 µL de DPPH[•] (600 µmol·L⁻¹) à cada tubo e após 30 minutos de incubação, realizou-se a mensuração da absorbância a $\lambda = 527$ nm.

4.2.1.2 Sequestro do Radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato) (ABTS^{•+})

O ensaio de sequestro do radical ABTS^{•+} é mais um método, muito utilizado, para avaliação do potencial antioxidante de substâncias de diversas naturezas, sejam elas hidrossolúveis ou lipossolúveis (ANTOLOVICH et al., 2002). Neste método, diferentemente do DPPH[•], é necessária a geração do radical ABTS^{•+} (Figura 18). Nesse sentido, 16 horas antes do ensaio, foi preparada uma solução estoque do radical ABTS^{•+} (5,0 mmol·L⁻¹) a partir da adição de 4,0 mg de persulfato de potássio (K₂S₂O₈; Merck[®]) e 26,0 mg de ABTS (Sigma Aldrich[®]) em 10,0 mL de água deionizada. Após 16 horas de incubação e protegida da luz, preparou-se uma solução de tampão fosfato (2,0 mmol·L⁻¹; pH 7,4). O radical ABTS^{•+} formado apresenta uma coloração verde intensa, cuja absorbância pode ser mensurada a um comprimento de onda (λ) de 734 nm (GUPTA et al., 2009). Dessa forma, a neutralização do radical ABTS^{•+} em função de um antioxidante é mensurada a partir da diminuição da intensidade colorimétrica da solução.

Figura 18 - Representação Genérica da Formação do Radical ABTS^{•+}

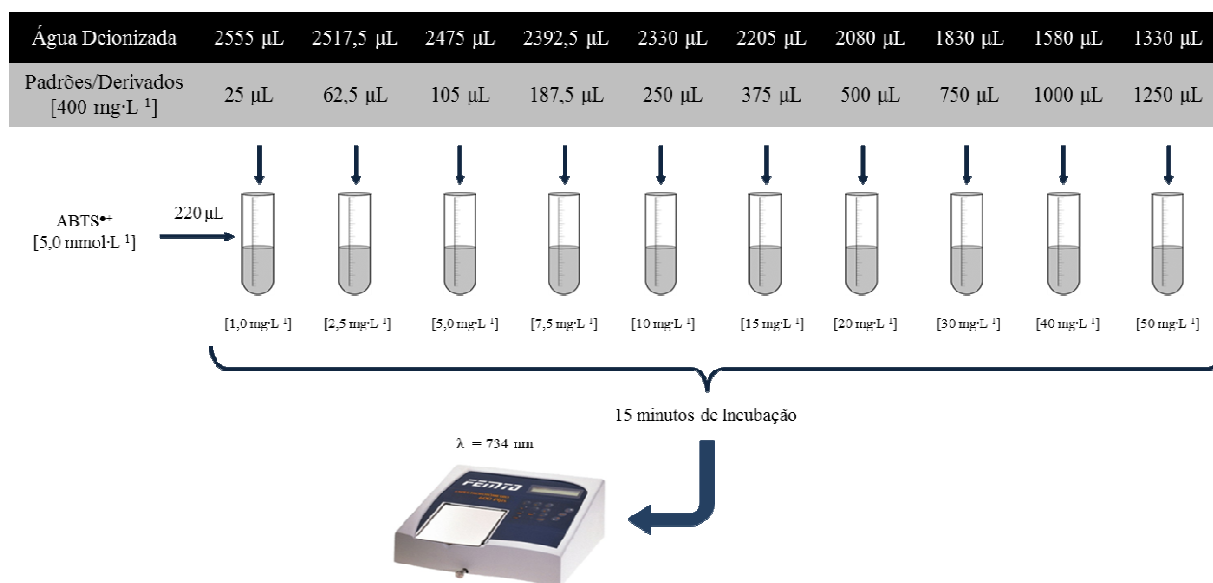


Fonte: Autor, 2017.

Nota –A formação do radical ABTS^{•+} consiste em reagir persulfato de potássio (K₂S₂O₈) com ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)), apresentando uma coloração verde intensa que pode ser mensurada a comprimento de onda (λ) de 734 nm.

Semelhantemente ao método do radical DPPH[•], em um tubo foram adicionados 0,22 mL da solução estoque do radical ABTS^{•+}, 1,0 mL da solução padrão ou das amostras previamente diluídas e completou-se com água deionizada até o volume final de 5,0 mL. Após 15 minutos de incubação procedeu-se a medida da absorbância (λ=734 nm) em um espectrofotômetro (Femto[®] 600 plus) com cubetas de vidro (1,0 cm de caminho óptico) (Figura 19). O sinal de referência (Branco) foi obtido a partir de uma solução semelhante a anterior, no entanto, a amostra foi substituída por água. A curva analítica para o procedimento empregando ABTS^{•+} foi construída empregando-se Trolox como padrão de calibração, sendo usado como referência e os resultados da capacidade antioxidante foram expressos em equivalentes (mg L⁻¹) do mesmo.

Figura 19 - Esquema do Ensaio de Sequestro do Radical ABTS^{•+}



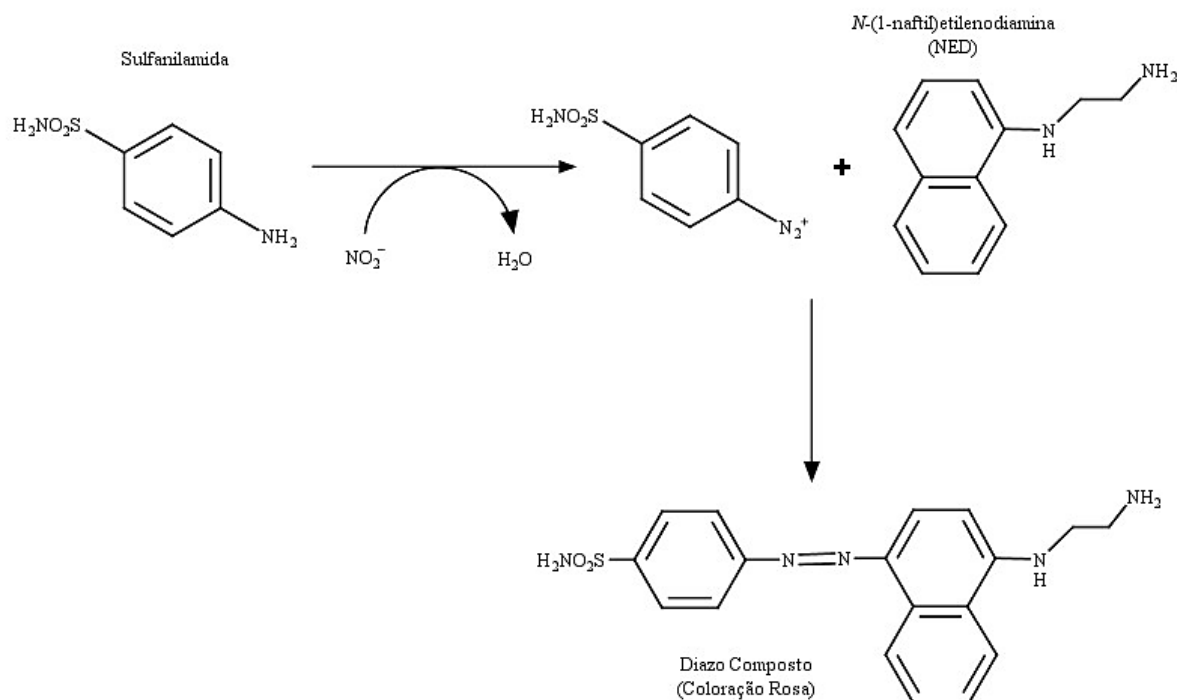
Fonte: Autor, 2017.

Nota – O ensaio da capacidade de sequestrar o radical ABTS^{•+} foi utilizado para avaliação da capacidade antioxidante dos derivados aminoguanidínicos. A partir de uma solução estoque (400 mg·L⁻¹; MeOH 30%), procedeu-se a diluição para formação da curva de calibração com os derivados PA 83, LQM 01 e LQM 03. O trolox e a quercetina foram utilizados como controles positivos (padrões) a fim de comparação dos resultados. A reação foi iniciada com a adição de 220 µL de ABTS^{•+} (5,0 mmol·L⁻¹) à cada tubo e após 15 minutos de incubação, realizou-se a mensuração da absorbância a $\lambda = 734$ nm.

4.2.1.3 Sequestro de Óxido Nítrico ($\dot{\text{NO}}$)

A capacidade de sequestrar óxido nítrico ($\dot{\text{NO}}$) foi avaliada através de um método indireto, ou seja, o analito observado neste ensaio é um produto formado a partir do $\dot{\text{NO}}$ (FOX, 1979). Um dos métodos mais utilizados baseia-se na reação de Griess, descrito inicialmente por Johann Peter Griess em 1879 (TSIKAS, 2007), onde o nitrito, produzido a partir da auto oxidação do $\dot{\text{NO}}$, reage com sulfanilamida em meio ácido e, em seguida, o composto gerado interage com o cloridrato de *N*-(1-naftil)etilenodiamina (NED), formando um composto de coloração rosa ($\lambda_{\text{máx}} = 546$ nm) (Figura 20) (GIRALDEZ; ZWEIER, 1998).

Figura 20 - Representação da Reação de Griess

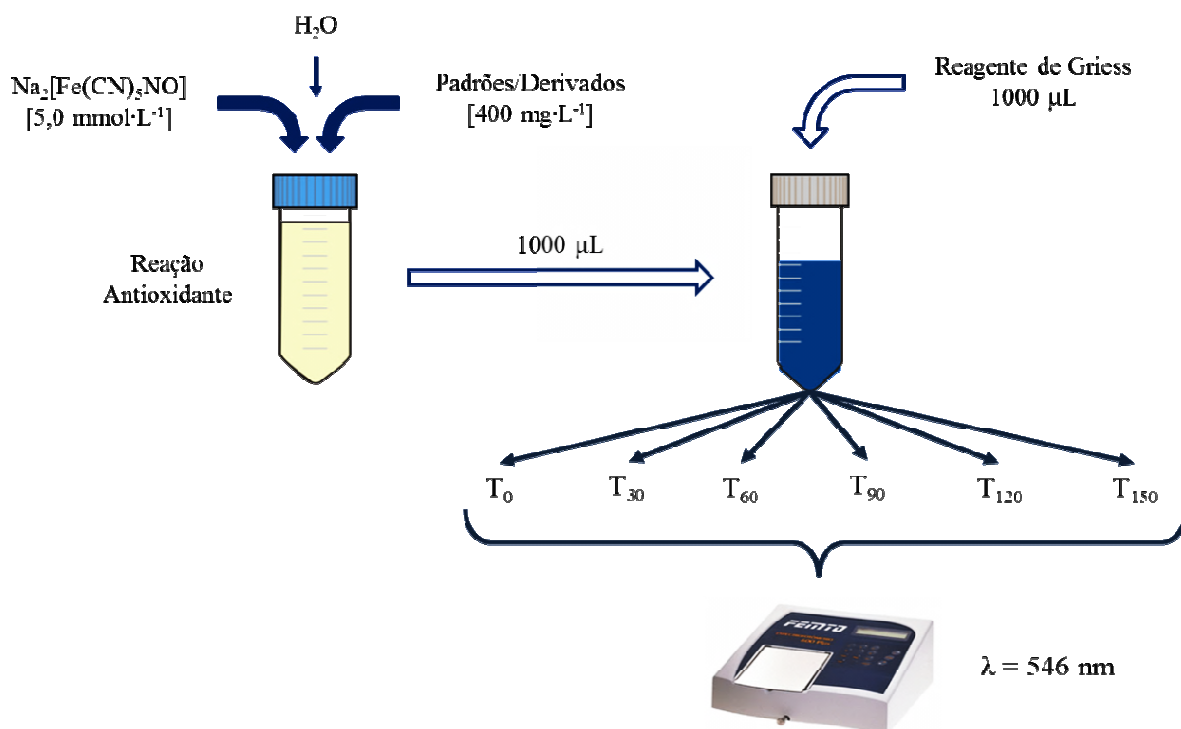


Fonte; Autor, 2017.

Nota – A autoxidação do óxido nítrico $\cdot\text{NO}$ em meio aquoso produz o nitrito (NO_2^-) que, ao reagir com a sulfanilamida em meio ácido, forma um intermediário reduzido. Este intermediário reage com o *N*-(1-naftil)etilenodiamina (NED) e produz um composto de coloração rosa que pode ser mensurado à $\lambda_{\text{máx}} = 546 \text{ nm}$.

Nesse sentido, para avaliação do sequestro do radical $\cdot\text{NO}$ empregando o método de Griess, 0,5 mL de nitroprussiato de sódio ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$) diluída em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0) foi misturado à 2,5 mL de amostras de cada um dos derivados ou padrões empregados ($400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Em seguida, o volume final foi ajustado para 5,0 mL com água ultrapura e a solução resultante foi incubada à temperatura ambiente por 150 min. O sinal de referência (branco) foi obtido a partir de uma solução semelhante a anterior, no entanto, a amostra ou padrão foi substituído por água ultrapura. Em intervalos de 30 minutos alíquotas de 1,0 mL das amostras incubadas foram coletadas e misturadas a 1,0 mL do reagente de Griess (Figura 21). Durante a reação um cromóforo é gerado a partir da diazotização da sulfanilamida com nitrito de sódio em meio ácido e seguido do acoplamento com o NED. A intensidade da coloração gerada pelo cromóforo foi mensurada em espectrofotômetro (Femto[®] 600 plus) a $\lambda = 546 \text{ nm}$.

Figura 21 - Esquema do Ensaio de Sequestro do Radical $\cdot\text{NO}$



Fonte: Autor, 2017.

Nota – O ensaio de avaliação da capacidade de sequestrar o radical óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) foi iniciado com a reação entre o nitroprussiato de sódio ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$; $5,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e os padrões trolox/quercetina ou os derivados aminoguanidínicos (PA 83, LQM 01 e LQM 03) à concentração fixa de $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Esta reação foi designada como reação antioxidante, de modo que a capacidade de cada composto em neutralizar o $\cdot\text{NO}$ liberado na reação foi determinada em seguida com a reação da solução formada com o reagente de Griess, um método indireto para detecção de subprodutos do $\cdot\text{NO}$. A cada 30 minutos, procedeu-se a leitura da absorbância da reação à $\lambda = 546 \text{ nm}$ até o tempo máximo de 150 minutos (T_0 à T_{150}).

4.2.1.4 Capacidade de Sequestrar o Peróxido de Hidrogênio

A capacidade de sequestro do peróxido de hidrogênio foi determinada de acordo com o procedimento descrito por Esmaili e Sonboli (ESMAEILI; SONBOLI, 2010). Desta forma, em um tubo foram adicionados $400 \mu\text{L}$ da solução do composto avaliado (10 ppm) e $4,6 \text{ mL}$ de solução de H_2O_2 (10 mM) em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4). A mistura foi incubada e protegida luz durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida, fez-se a medida espectrofotométrica (Femto[®] 600 plus) das soluções a $\lambda=230 \text{ nm}$. Para todas as amostras foram preparadas soluções de referência (branco da amostra) onde a solução de peróxido de hidrogênio foi substituída por $4,6 \text{ mL}$ de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4). A capacidade de sequestro de peróxido foi analisada a partir da seguinte expressão:

$$\%I = [Abs_{per} - (Abs_{am} - Abs_{ref}) / (Abs_{per})] \times 100$$

Observações: Abs_{per} , Abs_{am} e Abs_{ref} correspondem às absorvâncias das soluções de peróxido de hidrogênio (10 mM), da amostra na presença do peróxido de hidrogênio e da solução de referência (branco da amostra), respectivamente.

4.2.2 Avaliação da Capacidade Antiglicante

A avaliação da capacidade antiglicante de qualquer composto corresponde ao potencial deste em inibir a produção e/ou decompor produtos finais de glicação avançada (AGEs). Para o presente trabalho, foi avaliada a capacidade da aminoguanidina e dos derivados guanidínicos inibir a formação de AGEs através de um método fluorimétrico adaptado (SHIN et al., 2015). Para este fim, antes da execução dos procedimentos experimentais, todos os materiais e soluções foram esterilizados em capela de fluxo laminar sob incidência de luz absorvâncias por um período de 15 minutos. Em seguida, em microplaca de 96 poços (Axygen[®]), a reação para cada amostra foi realizada em replicatas e iniciada de acordo com as tabelas que seguem abaixo:

➤ Branco (*Br*):

Solução		Volumes
1 ^a	Tampão Fosfato de Sódio (100 mM; pH 7,4)	105 µL
2 ^a	Azida Sódica (8 g/L)	7,5 µL
3 ^a	BSA (40 mg/mL)	75 µL

➤ Controles Negativos

a) Fluorescência ($CN_{Fluorescência}$)

Solução		Volumes
1 ^a	Tampão Fosfato de Sódio (100 mM; pH 7,4)	105 µL
2 ^a	Azida Sódica 8 g/L (8 g/L)	7,5 µL

b) Técnica (CN_{Técnica})

Solução		Volumes
1 ^a	Tampão Fosfato de Sódio (100 mM; pH 7,4)	105 µL
2 ^a	Azida Sódica (8 g/L)	7,5 µL
3 ^a	BSA (40 mg/mL)	75 µL
4 ^a	Glicose (800 mM)	37,5 µL

➤ **Amostras Testadas**

Solução		Volumes
1 ^a	Tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,4)	105 µL
2 ^a	Azida sódica (8 g/L)	7,5 µL
3 ^a	Amostra (2 mg/mL)	75 µL
4 ^a	BSA (40 mg/mL)	75 µL
5 ^a	Glicose (800 mM)	37,5 µL

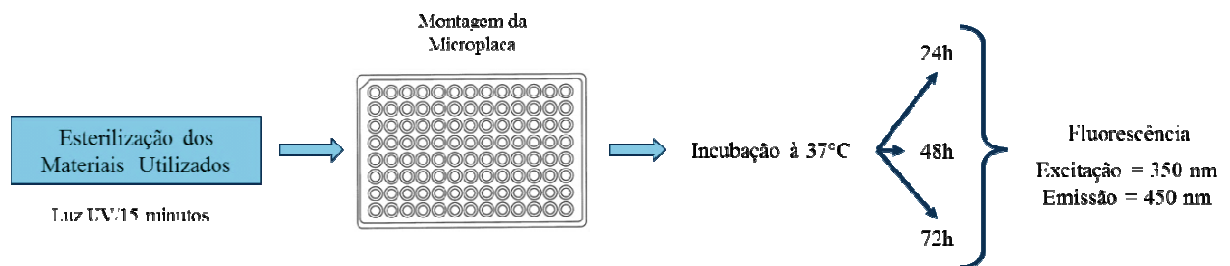
Após a preparação da microplaca, esta foi levada imediatamente para incubação em estufa à 37°C. Após 24, 48 e 72 horas de incubação, realizou-se a leitura da emissão da fluorescência à 450 nm após uma excitação de 350 nm (FlexStation® 3)(HARRIS et al., 2014) (Figura 22). Para fim de cálculos, inicialmente, foi realizada a correção da fluorescência obtida (Fluorescências do **Controles Negativos**) e a correção do controle da técnica ($CT_{Corrigida}$), de forma que:

- $F_{Corrigida} = \text{Controle Negativo da Técnica (CN}_{Técnica}) - \text{Controle Negativo da Fluorescência (CN}_{Fluorescência})$
- $CT_{Corrigida} = \text{Fluorescência do Branco (Br)} - F_{Corrigida}$
- $\text{Fluorescência da Amostra Corrigida (FA}_{Corrigida}) = \text{Fluorescência da Amostra} - CT_{Corrigida}$

Na sequência, os resultados são apresentados como percentual de inibição (%I), calculado a partir da equação:

$$\% \text{ de Inibição (\%I)} = \left[1 - \frac{(F_{A\text{Corrigida}})}{(F_{\text{Corrigida}})} \right] \times 100$$

Figura 22 - Representação do Ensaio de Avaliação da Capacidade Antiglicante



Fonte: Autor, 2017.

Nota – A avaliação da capacidade antiglicante foi iniciada com o processo de esterilização à luz UV por 15 minutos de todos os materiais necessários para execução do protocolo experimental em capela de fluxo laminar. Em seguida, procedeu-se a montagem das microplacas como descrito no protocolo experimental e, ao final desta etapa, as microplacas foram incubadas à 37°C em estufa apropriada. Após 24, 48 e 72 horas mensurou-se a emissão da fluorescência à 450 nm após a excitação de 350 nm.

4.3 Testes *in vivo*

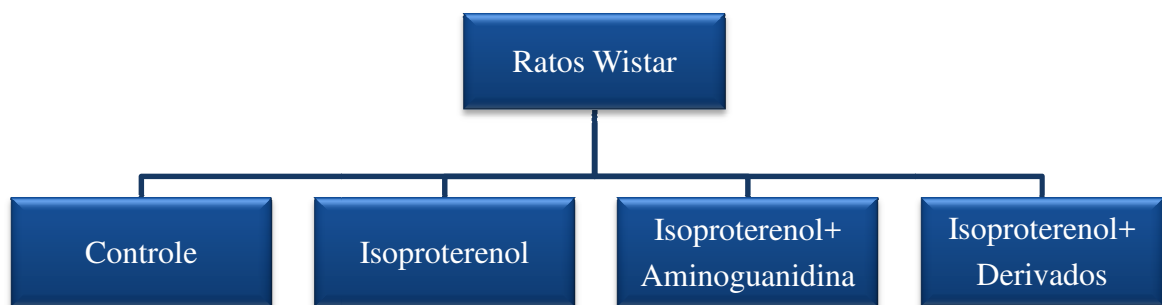
4.3.1 Animais

Para realização deste trabalho foram utilizados ratos Wistar machos com idades entre 7 e 10 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Estes animais foram alocados no Biotério Setorial da Escola de Enfermagem e Farmácia (EENFAR) da UFAL, onde permaneceram sob condições padrões de experimentação animal. Tais condições consistiam de temperatura controlada (22±1°C), ciclo claro-escuro de 12 horas e livre acesso à água e alimentação. O número máximo de animais por gaiolas foi 5. Ressalta-se que todos os procedimentos realizados neste trabalho foram conduzidos de acordo com os princípios defendidos e exigidos pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), sendo anteriormente submetidos para análise como projeto de pesquisa e, posteriormente, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da UFAL (número de protocolo 65/2015, ANEXO I).

4.3.2 Delineamento Experimental *in vivo*

Após a avaliação da capacidade antioxidante e da capacidade antiglicante, procedeu-se a realização dos testes *in vivo*, que consistiram em avaliar os efeitos dos tratamentos com os derivados guanidínicos no modelo animal de hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol. Para este fim, ratos Wistar machos foram distribuídos, como mostra o esquema abaixo, nos seguintes grupos experimentais:

Figura 23 - Esquema dos Grupos Experimentais



Fonte: Autor, 2017.

Nota – Esquema de distribuição e formação dos grupos experimentais para o delineamento experimental *in vivo*. Os grupos tratados com os derivados consistiram no: a) Isoproterenol+PA83; b) Isoproterenol+LQM01 e c) Isoproterenol+LQM03. Enquanto a aminoguanidina e o derivado PA83 foram administrados na dose de 50 mg/kg de peso corporal, os derivados LQM01 e LQM03 foram administrados em duas doses diferentes – 10 e 20 mg/kg de peso corporal (derivado LQM01) e 10 e 30 mg/kg de peso corporal (derivado LQM03).

- ✓ Descrição dos Grupos Experimentais:
- **Controle (CT; n = 12)**: Animais tratados com solução salina (NaCl 0,9%; s.c.) como veículo do isoproterenol e com solução de DMSO 1% (i.p.) como veículo da aminoguanidina e do seu derivado;
 - **Isoproterenol (ISO; n = 8)**: Animais tratados com isoproterenol ($7\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; s.c.) em solução salina (NaCl 0,9%) e com solução de DMSO 1% (i.p.) como veículo da aminoguanidina e do seu derivado;
 - **Isoproterenol + Aminoguanidina – 50 mg/kg (ISO+AG – 50 mg/kg; n = 12)**: Animais tratados com isoproterenol ($7\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; s.c.) em solução salina (NaCl 0,9%) e com a aminoguanidina ($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; i.p.) em solução de DMSO 1%;
 - **Isoproterenol + PA83 – 50 mg/kg (ISO+PA83 – 50 mg/kg; n = 07)**: Animais tratados com isoproterenol ($7\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; s.c.) em solução salina (NaCl 0,9%) e com o derivado guanidínico PA83 ($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; i.p.) em solução de DMSO 1%;
 - **Isoproterenol + LQM01 – 10 mg/kg (ISO+LQM01 – 10 mg/kg; n = 08)**: Animais tratados com isoproterenol ($7\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; s.c.) em solução salina (NaCl 0,9%) e com o derivado LQM01 ($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; i.p.) em solução de DMSO 1%;
 - **Isoproterenol + LQM01 – 20 mg/kg (ISO+LQM01 – 20 mg/kg; n = 05)**: Animais tratados com isoproterenol ($7\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; s.c.) em solução salina (NaCl 0,9%) e com o derivado LQM01 ($20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; i.p.) em solução de DMSO 1%;
 - **Isoproterenol + LQM03 – 10 mg/kg (ISO+LQM03 – 10 mg/kg; n = 08)**: Animais tratados com isoproterenol ($7\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; s.c.) em solução salina (NaCl 0,9%) e com o derivado LQM03 ($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; i.p.) em solução de DMSO 1%;
 - **Isoproterenol + LQM03 – 30 mg/kg (ISO+LQM 03 – 30 mg/kg; n = 06)**: Animais tratados com isoproterenol ($7\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; s.c.) em solução salina (NaCl 0,9%) e com o derivado LQM03 ($30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; i.p.) em solução de DMSO 1%;

4.4 Eutanásia dos Animais

Após o período de indução da hipertrofia cardíaca, no décimo sexto dia, seguido de um período de jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com tiopental sódico ($10 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$; i.p.) e sacrificados por punção cardíaca. O sangue coletado durante este procedimento foi transferido para tubos *vacutainer* contendo anticoagulante (K_2EDTA) e colocados no gelo. Em seguida, o sangue foi centrifugado 4000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para obtenção do plasma. Além de sangue, outros tecidos, tais como o coração e fígado, também foram coletados para análises bioquímicas ou histológicas. Uma vez obtidas, as amostras citadas foram armazenadas em freezer -80°C ou fixados com formalina 10% para análises posteriores.

4.5 Avaliação Morfológica dos Tecidos Cardíacos e Hepáticos

4.5.1 Índice de Hipertrofia Cardíaca

O índice de hipertrofia cardíaca foi utilizado como um indicador indireto das alterações morfológicas presentes nas adaptações hipertróficas do coração. Para obtenção deste índice realizou-se o cálculo da razão entre o peso úmido cardíaco e o peso corporal ($\text{PCard}/\text{PCorp}$) e também pela razão entre peso úmido do ventrículo esquerdo e o peso corporal (PVE/PCorp) (PATEL et al., 1991). Para este fim, após a coleta de sangue por punção cardíaca, o coração foi removido e pesado em balança analítica ($0,001\text{g}$; MARTE AL[®], modelo 200C). Em seguida, realizou-se uma cuidadosa separação das câmaras cardíacas - átrios, ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE) - e a pesagem destas. Na sequência, as amostras foram armazenadas em biofreezer -80°C para análises posteriores ou alocadas separadamente para processamento histológico.

4.5.2 Processamento Histológico

A análise histológica do coração e do fígado foi realizada com o objetivo de se comprovar as alterações morfológicas observadas na hipertrofia cardíaca e os possíveis efeitos hepáticos do protocolo de indução hipertrófica ou dos tratamentos propostos com os derivados e/ou aminoguanidina. Sendo assim, após a pesagem, os ventrículos esquerdos e fragmentos do fígado passaram por um processo de fixação em formalina 10% por um período de 16 a 20 horas. Em seguida, os tecidos foram submetidos à sequência de banhos em

etanol a 70, 90 e 100% para desidratação em tempos específicos de imersão. À seguir, a fim de proporcionar melhor inclusão em parafina na etapa seguinte, osteócitos foram submetidos ao clareamento que consistiu numa sequência de dois banhos de 30 minutos em Xilol. A etapa seguinte foi de impregnação que consistiu em imergir os tecidos em três banhos de parafina em tempos de 30, 60 e 90 minutos a uma temperatura de 60°C. (5) Após o banho de 90 minutos, as amostras foram retiradas da estufa para conclusão do processo de impregnação em parafina e posteriormente seccionadas a uma espessura de 5 micrômetros (μm) em micrótomo (MAASS et al., 2004).

Na sequência, utilizou-se a coloração de hematoxilina e eosina (H&E) para se analisar morfológicamente os efeitos hipertróficos do isoproterenol. Para isso, (1) as amostras, previamente cortadas e aderidas em lâminas histológicas, foram submetidas, inicialmente, a uma sequência de três banhos em xilol durante 5 minutos. Em seguida, (2) os cortes histológicos passaram por três banhos sucessivos de etanol nas concentrações 100, 90 e 70% durante 5 minutos em cada concentração. (3) Logo após as lâminas foram imersas por 5 minutos em água destilada. (4) A seguir, procedeu-se a primeira etapa de coloração com hematoxilina de Harris durante 3 minutos, seguido de um período de 5 minutos de lavagem com água corrente. (5) Posteriormente, a segunda etapa referente à coloração consistiu em banho com solução alcoólica de eosina amarelada durante 4,5 minutos. (6) Seguidamente, as amostras foram submetidas a dois banhos em etanol às concentrações de 90 e 100%, durante 5 minutos para cada imersão. (7) Finalizando, as lâminas passaram por dois banhos em xilol por 5 minutos para posterior montagem.

Os tecidos também foram submetidos a coloração para marcação de colágeno através do método de tricrômico de Gomori (GOMORI, 1950). Basicamente, este método só difere do descrito anteriormente na etapa da coloração, que consistiu em (1) imergir as lâminas em solução de hematoxilina por 60 segundos; em seguida, (2) procedeu-se a lavagem em água destilada por 5 minutos. Na sequência, (3) as lâminas foram imersas em solução de tricrômico de Gomori durante 15 minutos. A solução de tricrômico de Gomori é constituída por cromotopo 2R 0,6%; fast green 0,3%; ácido fosfotúngstico 0,6%; ácido acético glacial 0,2% e água destilada em pH 3,4. (4) Após lavagem com água destilada, a etapa seguinte consistiu em realizar desidratação seriada em soluções de etanol 70%, 90% e 100% seguida de banho de xilol para posterior montagem.

Após os processos de coloração, as amostras foram fotografadas em microscópio ótico Olympus® BX51 com objetiva para aumento de até 100x acoplado ao sistema de aquisição de imagens DP2-BSW® composto de uma câmera digital (10,1 megapixels). As imagens digitais

das espécimes coradas com H&E e tricrômico de Gomori foram capturadas de forma padronizada, cujo procedimento compreendeu, inicialmente, numavarredura por toda a área do tecido cardíaco e hepático utilizando a objetiva de 20x. Foram escolhidos, pelo menos, 10 campos por amostra. Após obtenção das fotomicrografias, a análise quantitativa da deposição de colágeno no coração e fígado foi realizada com o software Image J (NIH) utilizando *plugins* adequados para eliminar o sinal de fundo antes da análise em histograma, conforme descrito anteriormente por De Felice e colaboradores (2007).

4.6 Estudo de Docking Molecular

Com o objetivo de investigar as possibilidades de interações da aminoguanidina e seus derivados com metaloproteases de matriz extracelular (MMPs), procedeu-se a realização do estudo de docking molecular. Para este fim, os domínios catalíticos e hemopexinas das metaloproteases 2 e 9 foram utilizados como alvos moleculares selecionados para simulação de interação com os compostos mencionados. Os alvos foram escolhidos com base nas referências proteicas (ID) indexados no Banco de Dados de Proteínas (RCSB *Protein Data Bank*-PDB), sendo que para o domínio hemopexina da isoforma MMP-2 utilizou-se a referência proteica (PDB-ID) 1RTG (GOHLKE et al., 1996) e para o domínio catalítico as referências 1QIB (DHANARAJ et al., 1999) e 1HOV (FENG et al., 2002). Quanto a isoforma MMP-9, foi utilizado a referência 1ITV para representar o domínio hemopexina e 1GKC e 1GKD (ROWSELL et al., 2002) como referência proteica para o domínio catalítico da metaloprotease.

Tabela De Resumo de PDBs Id das Metaloproteases

Isoformas	Domínios		
	Hemopexina	Catalíticos	
MMP-2	1RTG	1QIB	1HOV
MMP-9	1ITV	1GKC	1GKD

As estruturas moleculares da aminoguanidina bem como seus derivados foram desenhadas através da utilização do software ArgusLab[®]. Para a execução das simulações de ancoragem molecular e otimização das energias de ligação/interação estimadas para formação

do complexo ligante-receptor foram utilizados os softwares AutoDock Tools[®] versão 1.5.6 e AutoDock Vina[®], respectivamente.

4.7 Análise Estatística

Para análise estatística, seguiu-se, inicialmente, a utilização do teste de normalidade de Shapiro-Wilk para se avaliar a distribuição dos dados. Quando se observou distribuição simétrica, utilizou-se o teste de Análise de Variância de uma via (ANOVA One-Way) seguido do pós-teste de *Bonferroni* para múltiplas comparações. Para os dados que não apresentaram distribuição simétrica, fez-se, inicialmente, análise de ocorrência de *outliers* confirmando-se a assimetria na distribuição de dados, seguiu-se uso do teste de *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn* para múltiplas comparações.

Foram utilizados, respectivamente, os softwares Microsoft Excel[®]2013 e GraphPad Prism[®]Versão 6.0 para tabulação e análise estatística dos dados, os quais são apresentados ora como MÉDIA±EPM, ora como MÉDIA±DP. Considerou-se os resultados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da Capacidade Antioxidante dos Derivados Aminoguanidínicos

5.1.1 Capacidade de Sequestrar o Radical DPPH[•]

A capacidade de sequestrar o radical DPPH[•] foi o primeiro ensaio da capacidade antioxidante realizado para avaliar o potencial de cada derivado aminoguanidínico atuar como agente antioxidante para este ensaio. Assim como para todos os ensaios seguintes, o trolox (6-hidroxy-2,5,7,8-tetrametylcromen-2-carboxilic) e a quercetina (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one) foram utilizados como padrões/controles positivos (KONDAKÇI et al., 2013). De acordo com os resultados obtidos, dentre os derivados avaliados, apenas o PA83 e o LQM01 apresentaram algum efeito sobre a formação do radical DPPH[•], sendo o PA83 o que apresentou o melhor resultado ($IC_{50/PA83} = 12,86 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $IC_{50/LQM01} = 18,10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Quando comparados ao trolox, podem ser considerados praticamente equivalentes ($IC_{50/Trolox} = 16,60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Tabela 1). No entanto, nenhum dos derivados foi tão eficiente para inibir a formação do radical DPPH[•] quanto a quercetina ($IC_{50/Quercetina} = 5,80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A aminoguanidina e o derivado LQM03 não apresentaram capacidade de sequestrar o radical DPPH[•].

Tabela 1 – Efeitos dos Derivados na Capacidade de Sequestrar o Radical DPPH[•]

Compostos	DPPH [•]			
	Faixa Linear ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Curva Analítica $\%I = aC_{AO} + b$	r	IC ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Quercetina	0,5 – 3,0	$\%I = 8,52 (\pm 0,31)C_{AO} + 0,75 (\pm 0,56)$	0,9967	5,80
Trolox	1,0 – 20,0	$\%I = 2,84 (\pm 0,14)C_{AO} + 2,76 (\pm 1,42)$	0,9927	16,60
Aminoguanidina	*	*	*	*
PA83	1,0 – 7,5	$\%I = 3,85 (\pm 0,10)C_{AO} + 0,47 (\pm 0,44)$	0,9989	12,86
LQM01	1,0 – 20,0	$\%I = 2,61 (\pm 0,36)C_{AO} + 2,78 (\pm 2,04)$	0,9729	18,10
LQM03	*	*	*	*

Fonte: Autor, 2016.

Nota – O trolox e a quercetina foram utilizados como controles positivos/padrões. Os resultados são apresentados como a concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) capaz de inibir em 50% (IC_{50}) a formação do radical DPPH[•]. Além deste parâmetro, também consta na tabela a curva analítica obtida no ensaio para cada composto avaliado, onde: %I – percentual de inibição; a – coeficiente angular; C_{AO} – concentração do composto; b – coeficiente linear. O coeficiente de correlação linear (r) foi calculado com o objetivo de se avaliar o comportamento linear de cada ponto em função da distribuição dos pontos que geraram a curva analítica de cada composto.

5.1.2 Capacidade de Sequestrar o Radical ABTS^{•+}

Na sequência, realizou-se o ensaio da avaliação da capacidade de cada derivado sequestrar o radical ABTS^{•+}. Diferentemente dos resultados apresentados anteriormente, todos os derivados testados apresentaram efeito antioxidante para o radical ABTS^{•+}. Dentre os derivados, destacam-se o PA83 e o LQM01 ($IC_{50/PA83} = 8,52 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $IC_{50/LQM01} = 7,50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) que apresentaram os melhores resultados, sendo comparáveis ou ligeiramente melhores que o trolox ($IC_{50/Trolox} = 10,47 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Tabela 2). No entanto, nenhum deles foi melhor que a aminoguanidina e a quercetina ($IC_{50/AG} = 5,49 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $IC_{50/Quercetina} = 2,03 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), sendo este último o composto que apresentou uma capacidade de inibir a formação do radical ABTS^{•+} extremamente elevada. Embora o derivado LQM03 tenha demonstrado alguma capacidade sequestradora, este foi o que apresentou o resultado menos expressivo ($IC_{50/LQM03} = 27,00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Tabela 2 - Efeitos dos Derivados na Capacidade de Sequestrar o Radical ABTS^{•+}

Compostos	ABTS ^{•+}			
	Faixa Linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Curva Analítica $\%I = aC_{AO} + b$	R	IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Quercetina	0,5 – 3,0	$\%I = 25,60 (\pm 1,12)C_{AO} - 1,99 (\pm 2,18)$	0,9962	2,03
Trolox	1,0 – 20,0	$\%I = 4,59 (\pm 0,17)C_{AO} + 1,92 (\pm 0,54)$	0,9973	10,47
Aminoguanidina	1,0 – 10,0	$\%I = 8,79 (\pm 0,40)C_{AO} + 1,70 (\pm 2,24)$	0,9917	5,49
PA83	1,0 – 15,0	$\%I = 6,10 (\pm 0,17)C_{AO} - 1,99 (\pm 1,59)$	0,9987	8,52
LQM01	1,0 – 20,0	$\%I = 6,95 (\pm 0,21)C_{AO} - 2,15 (\pm 1,68)$	0,9975	7,50
LQM03	5,0 – 100,0	$\%I = 1,06 (\pm 0,11)C_{AO} - 21,38 (\pm 3,75)$	0,9892	27,00

Fonte: Autor, 2016.

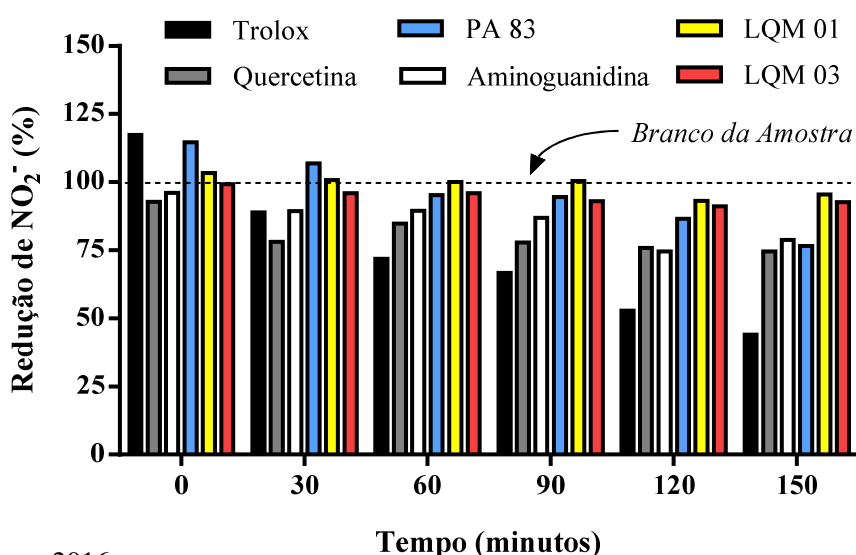
Nota - O trolox e a quercetina foram utilizados como controles positivos/padrões. Os resultados são apresentados como a concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) capaz de inibir em 50% (IC_{50}) a formação do radical ABTS^{•+}. Além deste parâmetro, também consta na tabela a curva analítica obtida no ensaio para cada composto avaliado, onde: %I – percentual de inibição; a – coeficiente angular; C_{AO} – concentração do composto; b – coeficiente linear. O coeficiente de correlação linear (r) foi calculado com o objetivo de se avaliar o comportamento linear de cada ponto em função da distribuição dos pontos que geraram a curva analítica de cada composto.

5.1.3 Sequestro de Óxido Nítrico ([•]NO)

Avaliação da capacidade de sequestrar o radical [•]NO foi realizada através do método indireto de Griess (FOX, 1979). De acordo com os resultados obtidos, foi observado que dentre os derivados testados, o PA 83 apresentou o melhor resultado sobre o sequestro do radical [•]NO, reduzindo em até 38% a produção de nitrito (NO_2^-) em relação ao tempo zero

(T₀). Quando comparado à condição controle (Branco da Amostra), houve uma redução de 23,5% na formação de NO₂⁻ ao final de 150 minutos (Figura 24). Os derivados LQM01 e LQM03 demonstraram capacidades similares de sequestrar o [•]NO, com variação em relação ao tempo zero de apenas 7,83% e 6,48%, respectivamente. Quando comparados à condição controle, o LQM01 reduziu a formação de NO₂⁻ em 4,52%, enquanto o LQM03 reduziu em 7,31%, podendo-se considerar estes resultados como não significativo. O trolox e a quercetina (controles positivos), apresentaram os melhores resultados como compostos antioxidantes, de forma que o trolox foi capaz de reduzir a produção de NO₂⁻ em até 73,3% quando comparado ao tempo zero. Em relação à condição controle, o trolox demonstrou uma eficiência de até 55,9% em diminuir a formação de NO₂⁻. A quercetina, por sua vez, reduziu em 18,20% a produção de nitrito em relação ao tempo zero. Quanto a redução comparada à condição controle, foi capaz de inibir a formação de nitrito em 25,4%. Dessa forma, dentre os derivados testados, destaca-se o PA83 como o melhor sequestrador de radical [•]NO. No entanto, não pôde-se equiparar com a capacidade do trolox que foi capaz de reduzir em mais de 55% a produção de NO₂⁻ (Figura 24).

Figura 24 - Capacidade de Sequestrar o Radical [•]NO



Fonte: Autor, 2016.

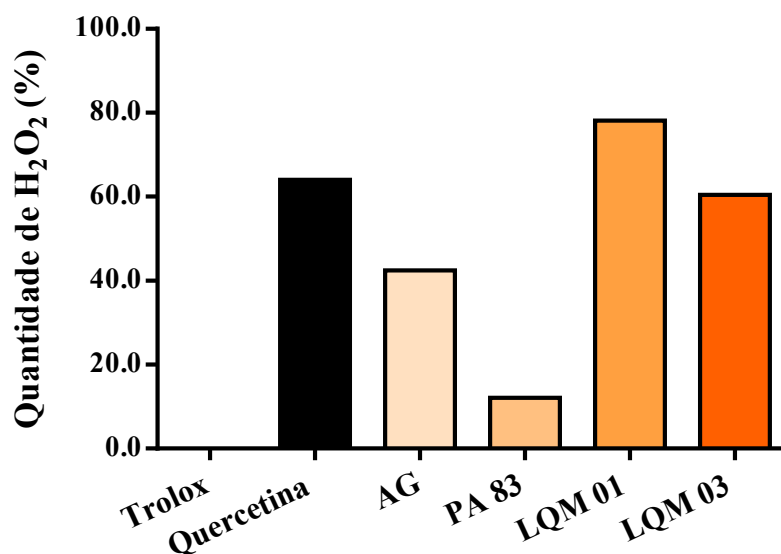
Nota – Os derivados PA83, LQM01 e LQM03 (400 µg·L⁻¹) foram utilizados para avaliação da capacidade de sequestrar o radical [•]NO. O trolox e a quercetina (400 µg·L⁻¹) foram utilizados como controles positivos. Os resultados são apresentados como percentual (%) de alteração da absorbância (λ=700 nm) de uma solução padrão (Branco da Amostra), a qual continha água deionizada ao invés dos derivados e controles positivos. O nitrito (NO₂⁻) foi o produto reacional mensurado no ensaio, de

forma que a concentração de $\cdot\text{NO}$ é considerada diretamente proporcional a concentração de nitrito. Sendo assim, este ensaio corresponde à um método de estimativa indireta do radical $\cdot\text{NO}$.

5.1.4 Capacidade de Sequestrar o Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

Os derivados, juntamente com os controles positivos, foram submetidos a avaliação da capacidade de sequestrar ou neutralizar o peróxido de hidrogênio. Dentre os derivados testados, o PA83 apresentou uma capacidade de sequestrar o H_2O_2 extremamente elevada, reduzindo em até 87,90% a quantidade do radical. A capacidade antioxidante do derivado PA83 só não foi tão boa quanto à do trolox, que reduziu totalmente a quantidade de H_2O_2 (Figura 25). A aminoguanidina se apresentou com capacidade de reduzir o H_2O_2 melhor que o derivado LQM 03 e a quercetina (57,6%; 39,5% e 36,0%, respectivamente).

Figura 25 - Capacidade de Sequestrar o Radical H_2O_2



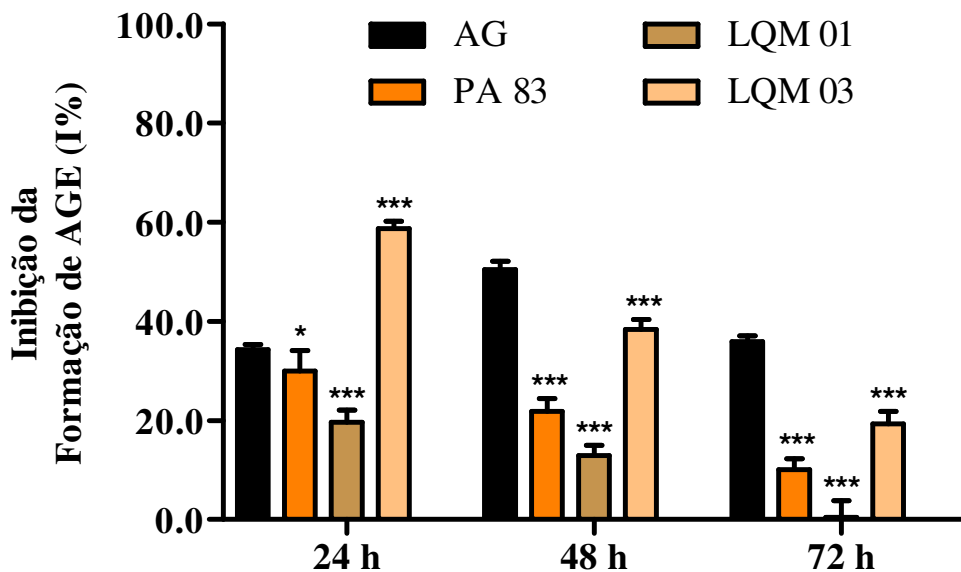
Fonte: Autor, 2016.

Nota – Avaliação da capacidade de sequestrar ou neutralizar o peróxido de hidrogênio. Os resultados são apresentados como quantidade percentual de peróxido de hidrogênio em relação ao padrão/branco da amostra. O trolox e a quercetina foram utilizados como controles positivos.

5.2 Avaliação da Capacidade Antiglicante dos Derivados Aminoguanidínicos

A avaliação da capacidade antiglicante foi realizada com o objetivo de verificar o potencial dos derivados inibir a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs). Nesse sentido, de acordo com os resultados, observou-se que nas primeiras 24 horas após a incubação dos derivados e da aminoguanidina (AG; controle positivo) com solução contendo Albumina Sérica Bovina (BSA -*Bovine Serum Albumin*) e glicose, o derivado LQM03 foi o que apresentou o melhor resultado, sendo capaz de inibir em até $58,60 \pm 1,5\%$ a formação de AGE ($p < 0,001$ vs AG). No entanto, os demais compostos apresentaram capacidade de inibir a formação de AGE abaixo de 40% nas primeiras 24 horas, sendo a capacidade dos derivados PA83 ($I\%_{PA83} = 29,9 \pm 4,2\%$; $*p < 0,05$) e LQM01 ($I\%_{LQM01} = 19,6 \pm 2,4\%$; $***p < 0,001$) significativamente mais baixa que a capacidade da aminoguanidina ($I\%_{AG} = 34,3 \pm 1,1\%$) (Figura 26).

Figura 26–Efeitos dos Derivados na Capacidade Antiglicante *in vitro*



Fonte: Autor, 2016.

Nota – Avaliação da capacidade antiglicante dos derivados guanidínicos são apresentados como a capacidade de cada composto inibir a formação de produtos de glicação avançada (AGEs). Os resultados são expressos como Média±DP. ANOVA Two-Way seguido dos pós-teste de *Bonferroni*, considerando-se estatisticamente significante quando $p < 0,05$ ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ vs AG).

Após 48 e 72 horas de incubação, os resultados obtidos demonstram uma inversão do comportamento antiglicante *in vitro*. Nesse sentido, a capacidade antiglicante da aminoguanidina aumentou para $50,4 \pm 1,6\%$ em 48 horas de incubação, mas voltou a $35,9 \pm 1,2\%$ em 72 horas de incubação. Mesmo assim, a capacidade antiglicante da aminoguanidina mostrou-se mais elevada do que a capacidade dos derivados em 48 horas ($I\%_{PA83} = 21,8 \pm 2,6\%$; $p < 0,001$; $I\%_{LQM01} = 12,9 \pm 2,1\%$; $p < 0,001$; $I\%_{LQM03} = 38,3 \pm 2,0\%$; $p < 0,001$) e 72 horas ($I\%_{PA83} = 10,2 \pm 2,1\%$; $p < 0,001$; $I\%_{LQM01} = 0,4 \pm 3,3\%$; $p < 0,001$; $I\%_{LQM03} = 19,3 \pm 2,5\%$; $p < 0,001$) de incubação (Figura 26). Dentre os derivados, o LQM03 foi o que apresentou a melhor capacidade antiglicante em todas as condições temporais de incubação, embora tenha se observado uma diminuição da sua capacidade em função do tempo.

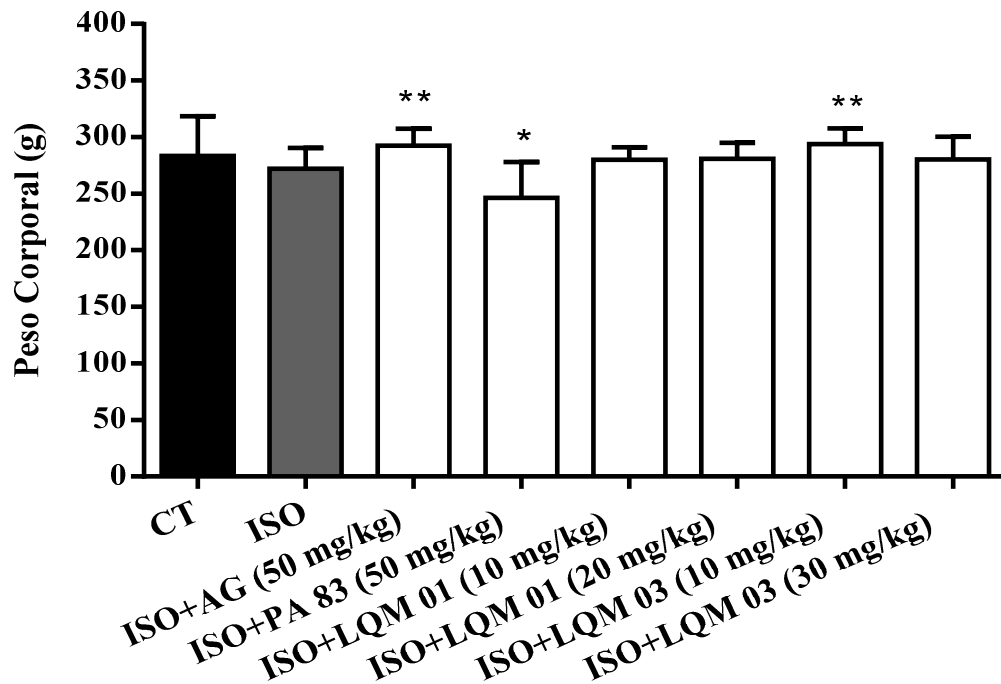
5.3 Efeitos *in vivo* dos Derivados Aminoguanidínicos

5.3.1 Peso Corporal e Parâmetros Morfológicos Cardíacos

Após os ensaios de avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* dos derivados guanidínicos, ratos Wistar machos foram submetidos à indução de hipertrofia cardíaca e, concomitantemente, tratados com aminoguanidina e os derivados PA83, LQM01 e LQM03. Nesse sentido, após 15 dias de tratamento, foi possível observar que o grupo ISO+PA83 (50 mg/kg) apresentou um peso corporal significativamente menor quando comparado aos grupos CT, ISO+AG (50 mg/kg) e ISO+LQM03 (10 mg/kg) (Figura 27). Quanto aos demais grupos tratados, não houve diferença estatisticamente significante entre os mesmos.

Quanto aos parâmetros morfológicos cardíacos, a indução da hipertrofia cardíaca (grupo ISO) resultou em um aumento estatisticamente significativo do peso cardíaco total quando comparado ao grupo CT ($1,064 \pm 0,125$ g vs $1,533 \pm 0,116$ g, respectivamente, $**** p < 0,0001$). O tratamento com aminoguanidina (50 mg/kg) não foi capaz de prevenir os efeitos do isoproterenol, de forma que o peso cardíaco total do grupo ISO+AG (50 mg/kg) ($1,583 \pm 0,129$ g; $**** p < 0,0001$) apresentou-se significativamente elevado quando comparado ao grupo CT. Enquanto os derivados PA 83 ($**** p < 0,0001$), LQM 01 ($** p < 0,0001$; $**** p < 0,0001$) e LQM 03 (na dose de 10 mg/kg) apresentaram aumento significativo no peso cardíaco total, o grupo ISO+LQM 03 (30 mg/kg; $**** p < 0,0001$) não diferiu significativamente do grupo CT (Figura 28-A).

Figura 27 - Efeitos dos Derivados Aminoguanidínicos Sobre o Peso Corporal

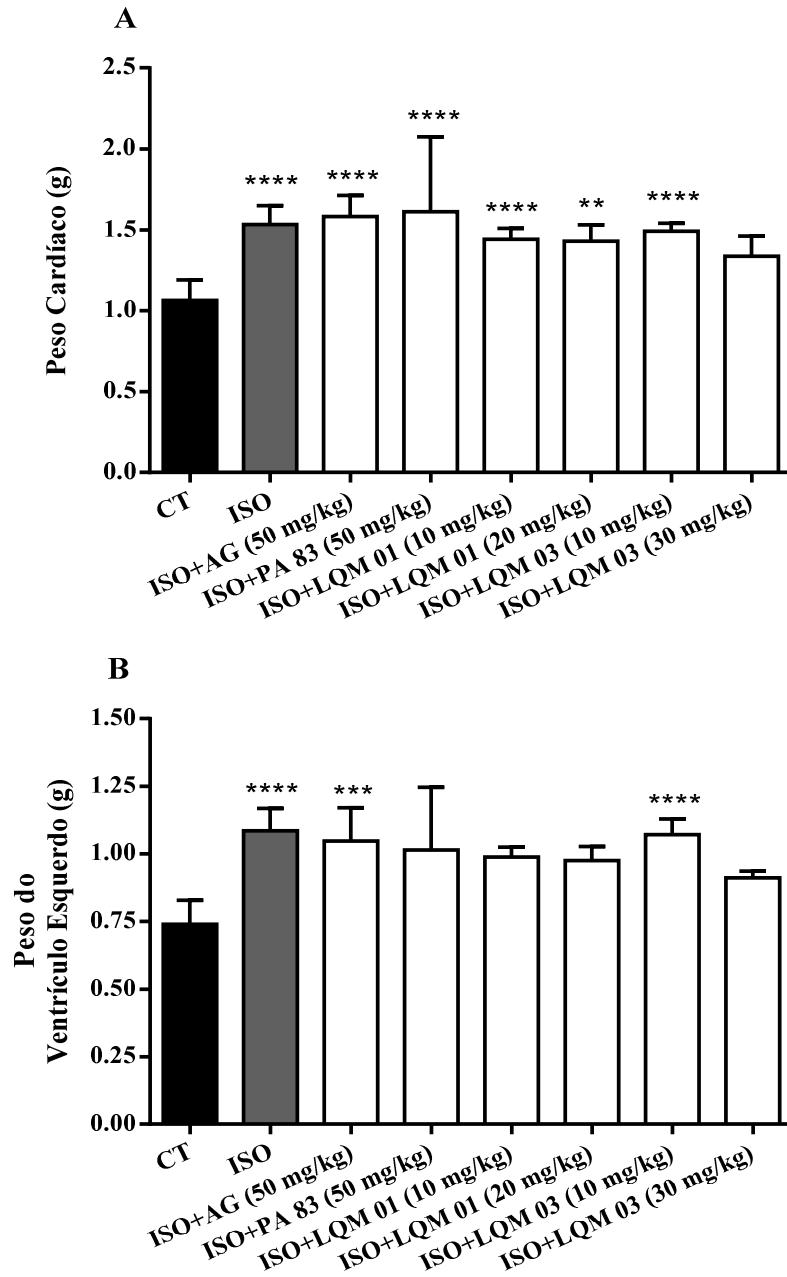


Fonte: Autor, 2016.

Nota – Avaliação dos efeitos do tratamento com os derivados guanidínicos sobre o peso corporal. Grupo Controle (CT, n = 12), grupo Isoproterenol (ISO, n = 8), grupo Isoproterenol+Aminoguanidina (50 mg/kg) (ISO+AG, n = 12; tratados com 50 mg/kg), grupo Isoproterenol+PA83 (50 mg/kg) (ISO+PA83, n = 7; tratados com 50 mg/kg), grupo Isoproterenol+LQM01 (10 mg/kg) (ISO+LQM01, n = 8; tratados com 10 mg/kg), grupos Isoproterenol+LQM01 (20 mg/kg) (ISO+LQM01, n = 5; tratados com 20 mg/kg), grupo Isoproterenol+LQM03 (10 mg/kg) (ISO+LQM03, n = 8; tratados com 10 mg/kg) e grupo Isoproterenol+LQM03 (30 mg/kg) (ISO+LQM03, n = 6; tratados com 30 mg/kg). Os resultados são apresentados como Média±DP. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*. ANOVA One-Way seguido do pós-teste de *Bonferroni* para múltiplas comparações. Considerou-se estatisticamente significativo quando $p < 0,05$ (* $p < 0,05$ vs CT; ** $p < 0,01$ vs ISO+PA83 (50 mg/kg)).

Quando avaliado o peso do ventrículo esquerdo, observou-se que apenas os grupos ISO ($1,085 \pm 0,083$ g; **** $p < 0,0001$), ISO+AG (50 mg/kg) ($1,047 \pm 0,123$ g; *** $p < 0,0001$) e ISO+LQM 03 (10 mg/kg) ($1,071 \pm 0,058$ g; **** $p < 0,0001$) apresentaram um aumento estatisticamente significativo quando comparado ao grupo CT ($0,740 \pm 0,088$ g). No entanto, o peso do ventrículo esquerdo dos grupos ISO+PA 83 (50 mg/kg; $1,014 \pm 0,232$ g), ISO+LQM01 (10 e 20 mg/kg; $0,988 \pm 0,036$ g e $0,976 \pm 0,051$ g, respectivamente) e ISO+LQM 03 (30 mg/kg; $0,912 \pm 0,023$ g) não diferiu significativamente do grupo CT (Figura 28-B).

Figura 28–Efeitos dos Derivados Sobre o Peso Cardíaco Total e Peso do Ventrículo Esquerdo



Fonte: Autor, 2016.

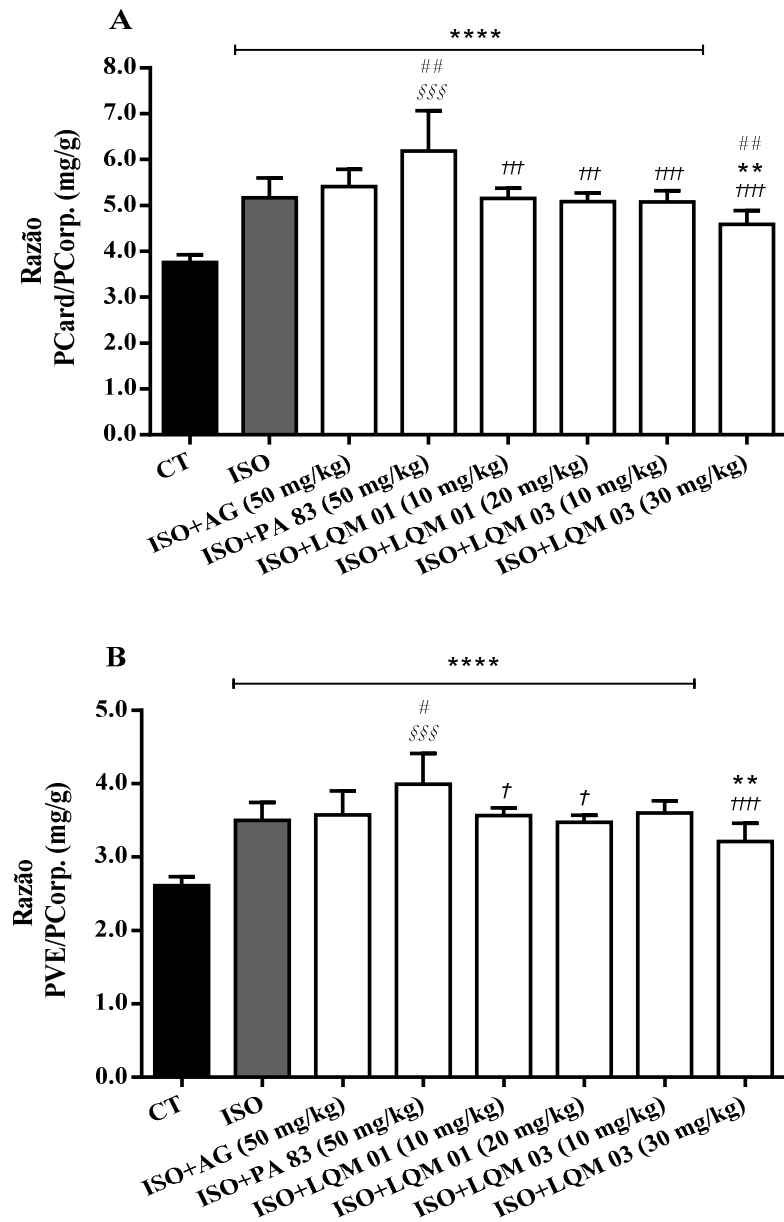
Nota – Avaliação dos efeitos dos tratamentos com derivados guanidínicos sobre: A) Peso Cardíaco e B) Peso do Ventrículo Esquerdo de ratos sob a indução de hipertrofia cardíaca. Grupo Controle (CT, n = 12), grupo Isoproterenol (ISO, n = 8), grupo Isoproterenol+Aminoguanidina (50 mg/kg) (ISO+AG, n = 12; tratados com 50 mg/kg), grupo Isoproterenol+PA83 (50 mg/kg) (ISO+PA83, n = 7; tratados com 50 mg/kg), grupo Isoproterenol+LQM01 (10 mg/kg) (ISO+LQM01, n = 8; tratados com 10 mg/kg), grupos Isoproterenol+LQM01 (20 mg/kg) (ISO+LQM01, n = 5; tratados com 20 mg/kg), grupo Isoproterenol+LQM03 (10 mg/kg) (ISO+LQM03, n = 8; tratados com 10 mg/kg) e grupo Isoproterenol+LQM03 (30 mg/kg) (ISO+LQM03, n = 6; tratados com 30 mg/kg). Os dados, apresentados como Média±DP, foram submetidos ao teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*. ANOVA One-Way e Kruskal-Wallis seguidos dos pós-testes de *Bonferroni* e de *Dunn* para múltiplas

comparações. Considerou-se estatisticamente significante quando $p < 0,05$ ($** p < 0,01$ vs CT; $*** p < 0,001$ vs CT; $**** p < 0,0001$ vs CT).

A razão entre peso cardíaco e peso corporal (PCard/PCorp) e a razão entre peso do ventrículo esquerdo e peso corporal (PVE/PCorp) foram utilizadas como índices de hipertrofia cardíaca (MAULIK et al., 2012; DAI et al., 2014). De acordo com os resultados obtidos (Figura 29-A), a razão PCard/PCorp dos grupos ISO ($5,17 \pm 0,43 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; $**** p < 0,0001$), ISO+AG (50 mg/kg; $5,41 \pm 0,37 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; $**** p < 0,0001$), ISO+PA83 (50 mg/kg; $6,18 \pm 0,88 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; $**** p < 0,0001$), ISO+LQM01 (10 e 20 mg/kg; $5,15 \pm 0,22 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ e $5,09 \pm 0,19 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectivamente; $**** p < 0,0001$), ISO+LQM03 (10 mg/kg; $5,07 \pm 0,25 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; $**** p < 0,0001$) e ISO+LQM03 (30 mg/kg; $4,59 \pm 0,29 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; $** p < 0,01$) apresentou-se significativamente mais elevada quando comparada a razão PCard/PCorp do grupo CT ($3,76 \pm 0,17 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Embora a razão PCard/PCorp do grupo ISO+LQM03 (30 mg/kg) tenha sido estatisticamente significante maior que o grupo CT, o tratamento com o derivado LQM03 foi capaz de atenuar o efeito hipertrófico do isoproterenol (Figura 29-A). Além disso, o grupo ISO+LQM03 (30 mg/kg; $## p < 0,01$) apresentou a razão PCard/PCorp menor que o grupo ISO+AG (50 mg/kg). De modo contrário, o grupo ISO+PA83 (50 mg/kg) obteve uma razão PCard/PCorp mais elevada em comparação com todos os demais grupos.

Ao se analisar os resultados da razão PVE/PCorp, foi percebido uma semelhança com os resultados descritos anteriormente, de modo que os grupos ISO ($3,50 \pm 0,24 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; $**** p < 0,0001$), ISO+AG (50 mg/kg; $3,58 \pm 0,32 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; $**** p < 0,0001$), ISO+PA83 (50 mg/kg; $3,99 \pm 0,42 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; $**** p < 0,0001$), ISO+LQM01 (10 e 20 mg/kg; $3,47 \pm 0,97 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; $**** p < 0,0001$), ISO+LQM03 (10 mg/kg; $3,60 \pm 0,16 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; $**** p < 0,0001$) e ISO+LQM03 (30 mg/kg; $3,22 \pm 0,25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $** p < 0,01$) apresentaram a razão PVE/PCorp significativamente mais elevada quando comparada ao grupo CT ($2,61 \pm 0,12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Os grupos ISO+LQM01 (10 e 20 mg/kg; $† p < 0,05$) e ISO+LQM03 (30 mg/kg; $†††† p < 0,0001$) apresentaram uma redução significativa da razão PVE/PCorp em relação ao grupo ISO+PA83 (50 mg/kg) (Figura 29-B).

Figura 29–Efeitos dos Derivados Sobre os Índices de Hipertrofia Cardíaca



Fonte: Autor, 2016.

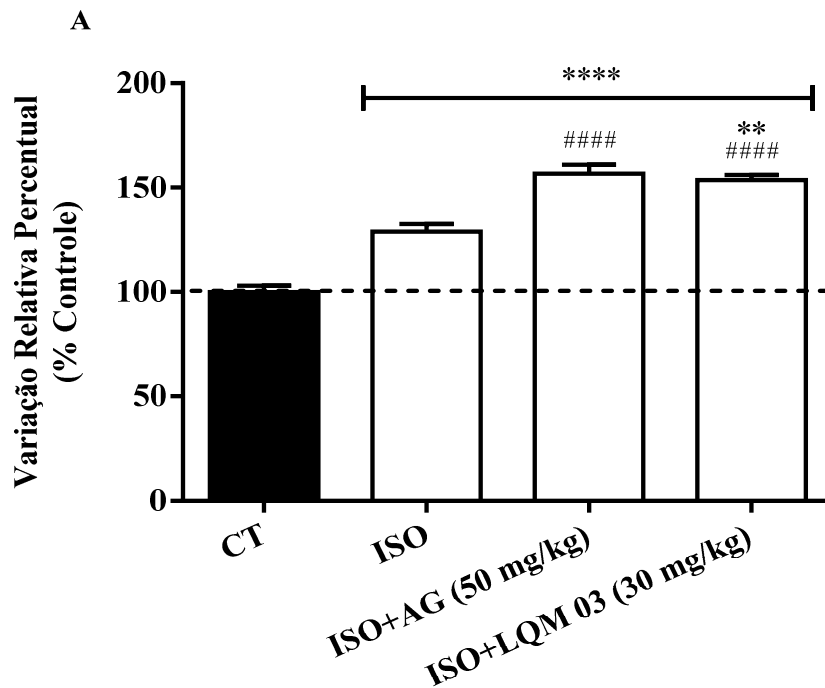
Nota – Avaliação dos efeitos dos tratamentos com derivados guanidínicos sobre: A) Razão entre Peso Cardíaco e Peso Corporal (PCard/PCorp); e B) Razão entre Peso do Ventrículo Esquerdo e Peso Corporal (PVE/PCorp) de ratos sob a indução de hipertrofia cardíaca. Grupo Controle (CT, n = 12), grupo Isoproterenol (ISO, n = 8), grupo Isoproterenol+Aminoguanidina (50 mg/kg) (ISO+AG, n = 12; tratados com 50 mg/kg), grupo Isoproterenol+PA 83 (50 mg/kg) (ISO+PA 83, n = 7; tratados com 50 mg/kg), grupo Isoproterenol+LQM 01 (10 mg/kg) (ISO+LQM 01, n = 8; tratados com 10 mg/kg), grupos Isoproterenol+LQM 01 (20 mg/kg) (ISO+LQM 01, n = 5; tratados com 20 mg/kg), grupo Isoproterenol+LQM 03 (10 mg/kg) (ISO+LQM 03, n = 8; tratados com 10 mg/kg) e grupo Isoproterenol+LQM 03 (30 mg/kg) (ISO+LQM 03, n = 6; tratados com 30 mg/kg). Os dados são apresentados como Média±DP e foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. ANOVA One-Way seguidos do pós-teste de Bonferroni para múltiplas comparações. Considerou-se estatisticamente significante quando $p < 0,05$ (* $p < 0,01$ vs CT; **** $p < 0,0001$ vs CT; ## $p < 0,01$ vs

ISO+AG (50 mg/kg); ^{sss}p<0,001 vs ISO; [†]p<0,05 vs ISO+PA 83 (50 mg/kg); ^{†††}p<0,001 vs ISO+PA 83 (50 mg/kg) e ^{††††}p<0,0001 vs ISO+PA 83 (50 mg/kg))

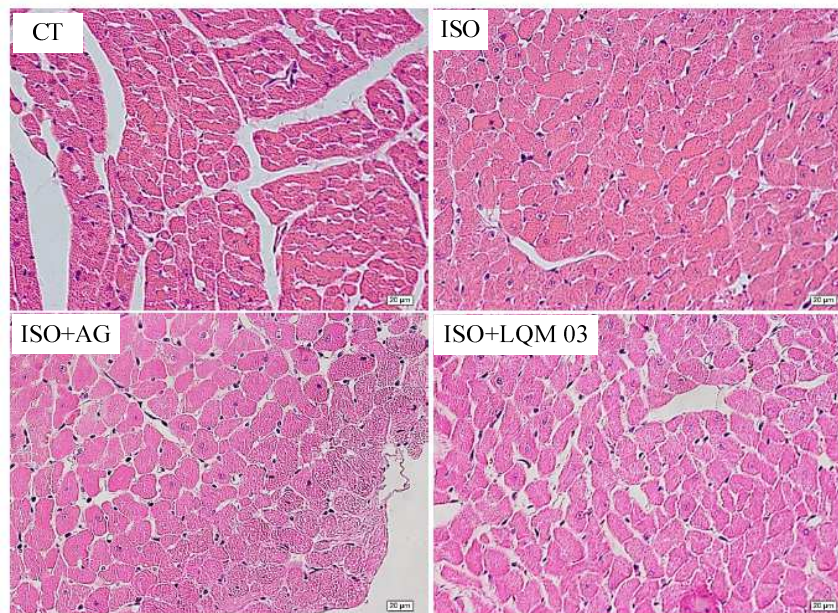
5.3.2 Análise da Área Total dos Miócitos Cardíacos

Para avaliação da área total dos miócitos cardíacos, amostras de cortes do miocárdio foram coradas através do método de hematoxilina & eosina e, em seguida, as micrografias obtidas foram utilizadas para mensuração da área total de cardiomiócitos (MAULIK et al., 2012). De acordo com os resultados obtidos, a estimulação β -adrenérgica com isoproterenol (7 mg/kg) durante 15 dias resultou num aumento significantede, aproximadamente, 30,0% na área total dos cardiomiócitos quando comparado ao grupo controle (Figura 30-A). Nem o tratamento com aminoguanidina (50 mg/kg) ou com o derivado LQM03 (30 mg/kg) foi capaz de evitar a elevação significativa na área total dos cardiomiócitos. Surpreendentemente, foi possível perceber que ambos os tratamentos potencializaram os efeitos hipertróficos do isoproterenol, resultando em, aproximadamente, 57,0% para o grupo ISO+AG (50 mg/kg; ^{####}p<0,0001) e 53,6% para o grupo ISO+LQM03(30 mg/kg; ^{####}p<0,0001) quando comparados ao grupo controle (Figura 30-A). No entanto, o grupo ISO+LQM03 (30mg/kg) apresentou uma modesta e significativa redução da área total dos cardiomiócitos quando comparado ao grupo ISO+AG (50mg/kg; ^{**}p<0,01).

Figura 30–Efeitos dos Tratamentos Sobre a Área Total dos Miócitos Cardíacos



B



Fonte: Autor, 2017.

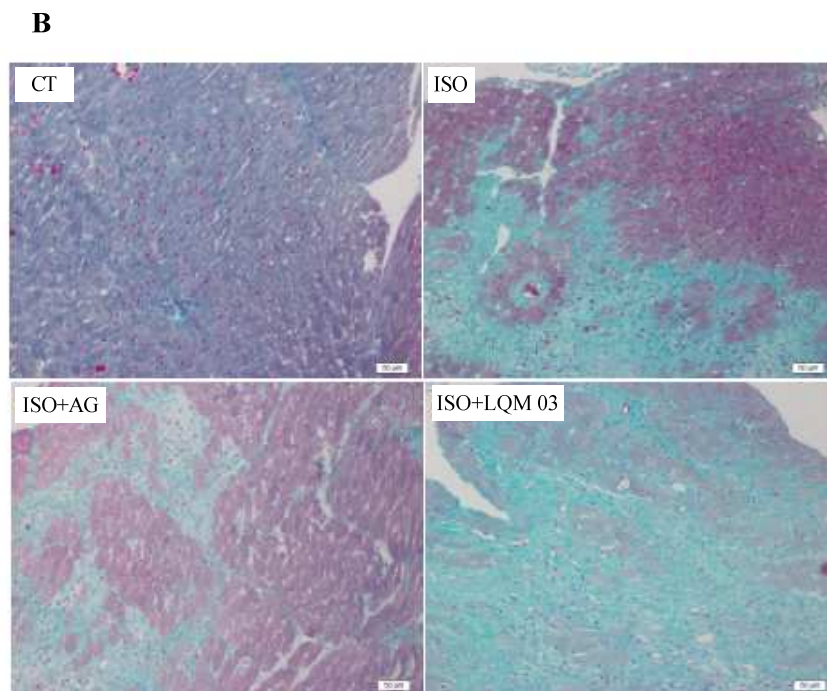
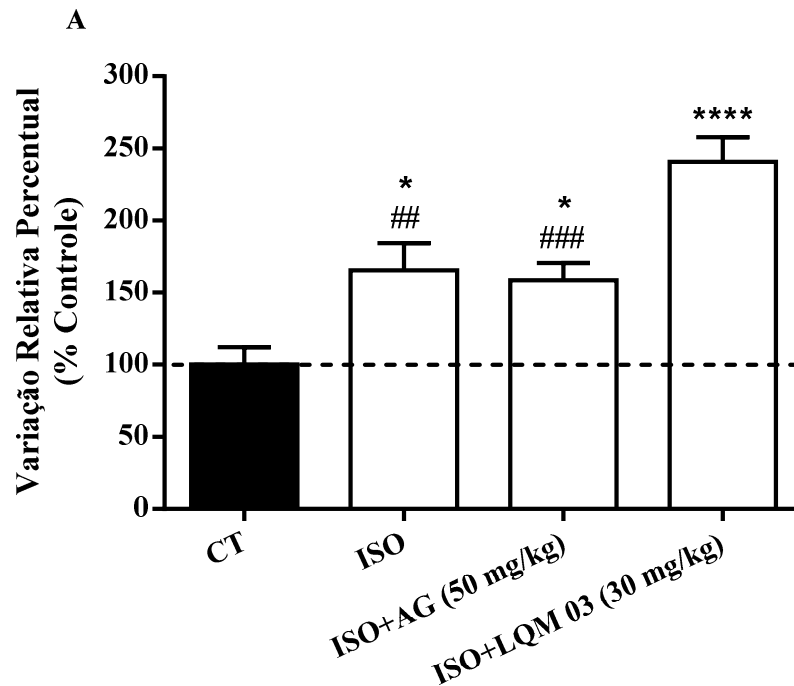
Nota – Avaliação da área total dos cardiomiócitos em cortes transversais. A) variação percentual da área total dos miócitos cardíacos em relação ao grupo controle (CT); B) micrografia representativa da coloração de hematoxilina & eosina de cada grupo tratado. Grupo Controle (CT, n = 4 animais), grupo Isoproterenol (ISO, n = 4 animais), Isoproterenol+Aminoguanidina (50 mg/kg) (ISO+AG (50 mg/kg), n = 4 animais) e grupo Isoproterenol+LQM03 (30 mg/kg) (ISO+LQM03 (30 mg/kg), n = 4 animais). Os dados são apresentados como Média±DP e foram submetidos ao teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*. Em seguida, utilizou-se ANOVA One-Way seguido do pós-teste de *Bonferroni* para múltiplas comparações. Considerou-se estatisticamente significativamente quando $p < 0,05$ (**** $p < 0,0001$ vs CT; #### $p < 0,0001$ vs ISO; ** $p < 0,01$ vs ISO+AG (50 mg/kg)).

5.3.3 Deposição de Colágeno Total

A deposição de colágeno foi avaliada nos grupos CT, ISO, ISO+AG (50 mg/kg) e ISO+LQM03 (30 mg/kg) através do método de Gomori (1950). De acordo com os resultados obtidos (Figura 31), foi possível observar que a indução da hipertrofia cardíaca no grupo ISO promoveu aumento da deposição de colágeno no miocárdio em torno de 165,4% em relação ao grupo CT (* $p < 0,05$). Ao avaliar se a aminoguanidina e o derivado LQM03 seriam capazes de reverter ou prevenir os efeitos do isoproterenol na deposição de colágeno no miocárdio, constatou-se que no grupo ISO+AG (50 mg/kg) houve elevação significativa na deposição de colágeno de, aproximadamente 158,7% (* $p < 0,05$), enquanto que no grupo ISO+LQM03 (30 mg/kg) o acréscimo em relação ao grupo CT foi de 240,6% (**** $p < 0,0001$) que também foi estatisticamente significativa para os grupos ISO (### $p < 0,01$) e ISO+AG (50 mg/kg. ### $p < 0,001$).

A deposição de colágeno também foi avaliada no tecido hepático. De acordo com os resultados obtidos (Figura 32), a indução da hipertrofia resultou em aumento de 195,6% na quantidade de colágeno hepático em relação ao grupo CT. No entanto, essa elevação não foi considerada estatisticamente significativa ($p > 0,05$). O tratamento com aminoguanidina (ISO+AG (50mg/kg)) correspondeu à 62,6% da deposição de colágeno do grupo CT. Embora não tenha sido significativa ($p > 0,05$), o resultado caracterizou uma redução da quantidade de colágeno no tecido hepático em relação aos grupos CT (37,4%) e ISO (67,9%). Diferentemente, o tratamento com o derivado LQM 03 (30 mg/kg) elevou em aproximadamente 12 vezes a quantidade de colágeno no tecido hepático, diferindo significativamente dos grupos CT, ISO e ISO+AG (**** $p < 0,0001$)(Figura 32).

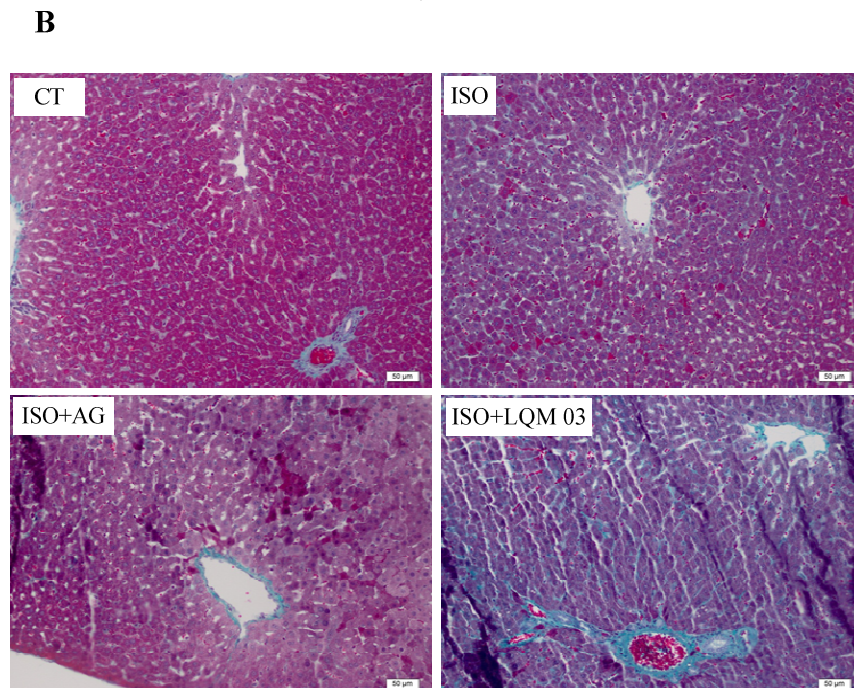
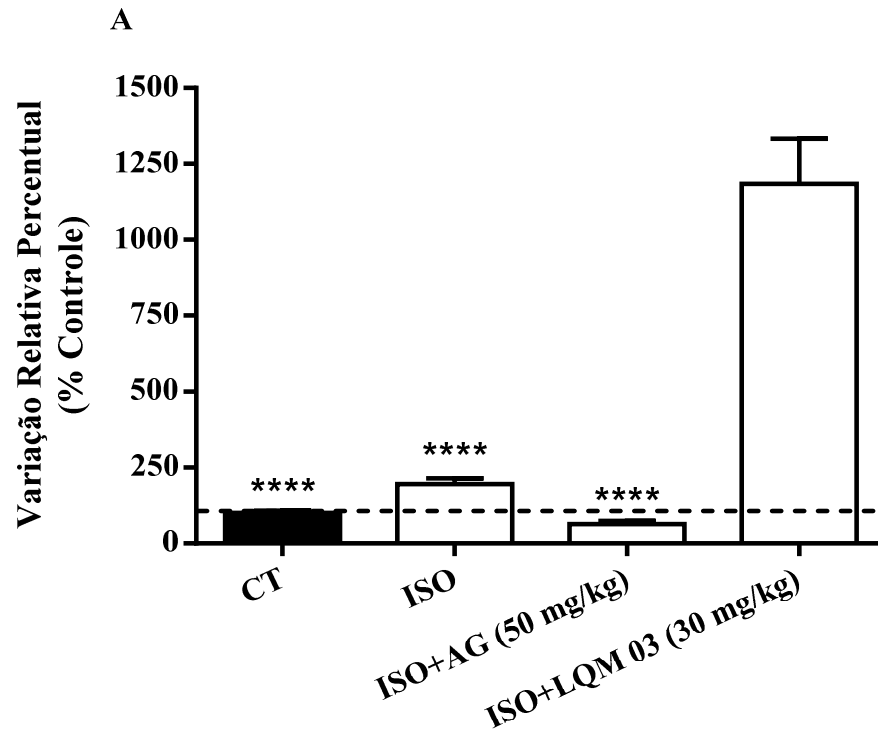
Figura 31–Efeitos dos Tratamentos Sobre a Deposição de Colágeno Total no Miocárdio



Fonte: Autor, 2017.

Nota – Avaliação da deposição de colágeno total no tecido cardíaco através do método de coloração de Gomori. A) variação percentual da densidade da coloração específica para o colágeno total em relação ao grupo CT; B) micrografia representativa de cada grupo tratado. Grupo Controle (CT, n=5 animais), grupo Isoproterenol (ISO, n = 5 animais), Isoproterenol+Aminoguanidina (50 mg/kg) (ISO+AG (50 mg/kg), n = 5 animais) e grupo Isoproterenol+LQM03 (30 mg/kg) (ISO+LQM03 (30 mg/kg), n = 6 animais). Os dados são apresentados como Média±EPM e foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. ANOVA One-Way seguido do pós-teste de Bonferroni para múltiplas comparações. Considerou-se estatisticamente significativo quando $p < 0,05$ (* $p < 0,05$ vs CT; **** $p < 0,0001$ vs CT; ## $p < 0,01$ vs ISO+LQM03 (30 mg/kg); ### $p < 0,001$ vs ISO+LQM03 (30 mg/kg)).

Figura 32–Efeitos dos Tratamentos Sobre a Deposição de Colágeno Total no Tecido Hepático



Fonte: Autor, 2017.

Nota – Avaliação da deposição de colágeno total no tecido hepático através do método de coloração de Gomori. A) variação percentual da densidade da coloração específica para o colágeno total em relação ao grupo CT; B) micrografia representativa de cada grupo tratado. Grupo Controle (CT, n = 5 animais), grupo Isoproterenol (ISO, n = 5 animais), Isoproterenol+Aminoguanidina (50 mg/kg) (ISO+AG (50 mg/kg), n = 5 animais) e grupo Isoproterenol+LQM03 (30 mg/kg) (ISO+LQM03 (30 mg/kg), n = 6 animais). Os dados são apresentados como Média±EPM e foram submetidos ao teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*. ANOVA One-Way seguidos do pós-teste de *Bonferroni* para

múltiplas comparações. Considerou-se estatisticamente significante quando $p < 0,05$ (**** $p < 0,0001$ vs ISO+LQM03 (30 mg/kg)).

5.4 Docking Molecular

Um dos principais mecanismos de modulação da síntese de colágeno na matriz extracelular é a ativação/inativação de metaloproteases de matriz (MMP). Nesse sentido, com o objetivo de traçar uma possível via molecular de explicação para os resultados encontrados com o tratamento *in vivo*, decidiu-se realizar simulação de interação molecular das isoformas MMP-2 e MMP-9 e todos os compostos utilizados através do método de docking molecular.

Após as análises das variações das energias livres (E) de ligação foi verificado que dentre os compostos derivados aminoguanidínicos, o PA 83 pode ser considerado o mais potente para os alvos proteicos estudados, apresentando maior afinidade pelos sítios catalíticos das isoformas MMP-2 (PDB: 1HOV/1QIB; $-8,0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $-8,9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente) e MMP-9 (PDB: 1GKC/1GKD; $-6,9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $-9,1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente) (Tabela 3 Tabela 4). Também foi observado que dentre os derivados, o PA 83 apresentou a afinidade mais elevada pelo domínio regulatório hemopexina do alvo proteico MMP-9 (PDB: 1ITV; $-7,8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) (Tabela 4). No entanto, quanto ao domínio hemopexina do alvo MMP-2 (1RTG), todos os compostos derivados da aminoguanidina apresentaram variações das energias livres praticamente iguais, podendo se considerar como equivalentes (Tabela 3).

Tabela 3 - Avaliação da afinidade da aminoguanidina e seus derivados com os domínios hemopexina e catalítico da MMP-2

Compostos	MMP-2		
	Domínio Hemopexina (E)	Domínio Catalítico (E)	
	1RTG	1HOV	1QIB
Aminoguanidina	-4,3	-4,0	-4,2
PA 83	-7,3	-8,0	-8,9
LQM 01	-7,3	-7,4	-8,6
LQM 03	-7,4	-6,6	-8,4

Fonte: Autor, 2017.

Nota - A afinidade da aminoguanidina e seus compostos derivados com a isoforma MMP-2 foi avaliada a partir da variação da energia livre de ligação (E; $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) dos compostos com os alvos proteicos (PDB): 1RTG (domínio hemopexina) e 1HOV/1QIB (domínios catalíticos).

Quanto aos compostos LQM 01 e LQM 03, estes podem ser considerados como equivalentes para todos os alvos, sendo a maior diferença observada para o domínio catalítico 1GKD da MMP-9 (Tabela 4). Quando comparados aos efeitos da complexação da aminoguanidina (AG) com os mesmos alvos proteicos citados foi constatado que todos os compostos derivados testados apresentaram maior afinidade pelos alvos do que a AG (Tabela 3 e Tabela 4).

Tabela 4 - Avaliação da afinidade da aminoguanidina e seus derivados com os domínios hemopexina e catalítico da MMP-9

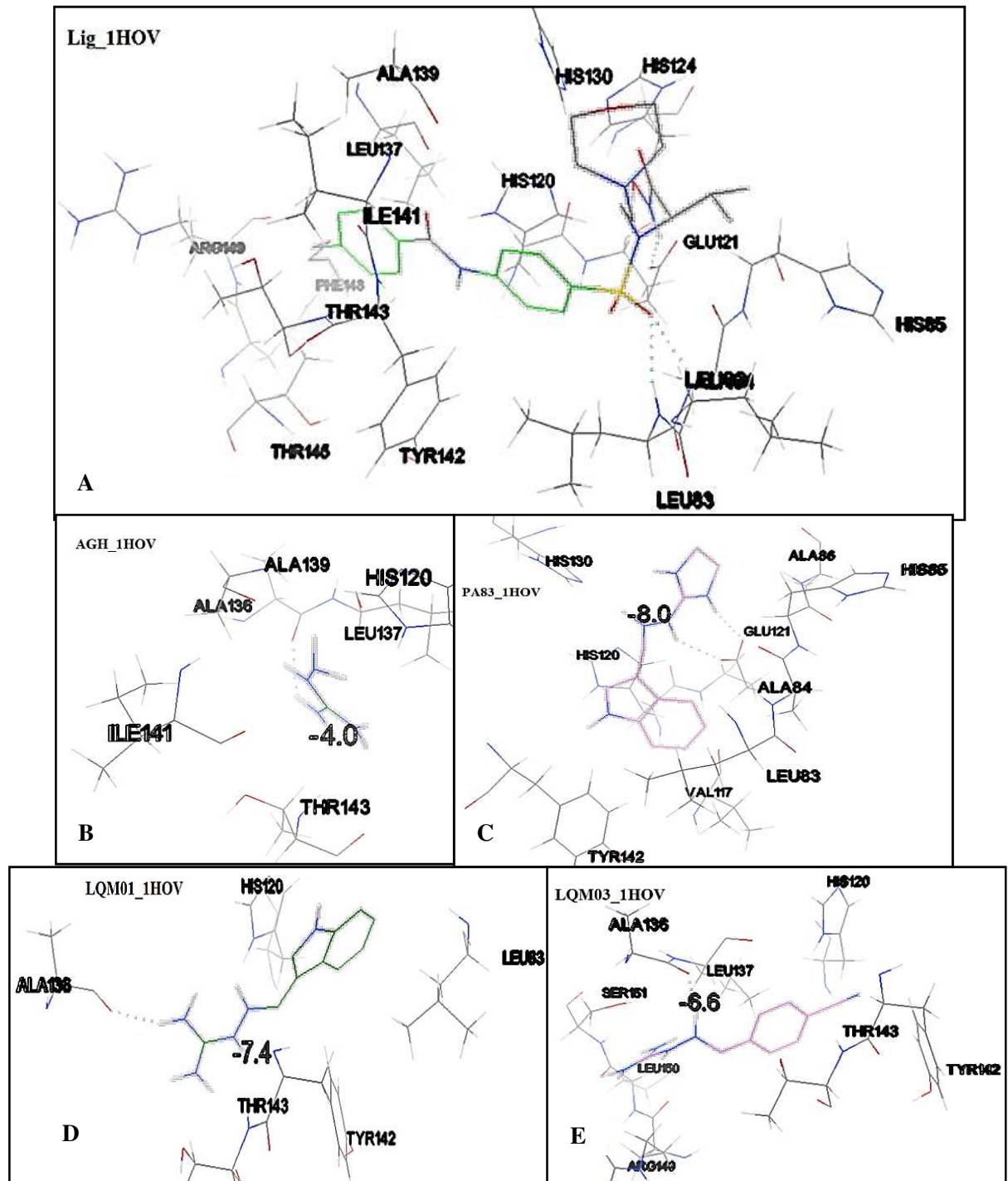
MMP-9			
Compostos	Domínio Hemopexina (E)	Domínio Catalítico (E)	
	1ITV	1GKC	1GKD
Aminoguanidina	-4,5	-4,4	-4,5
PA 83	-7,8	-6,9	-9,1
LQM 01	-7,5	-6,6	-9,1
LQM 03	-7,0	-6,4	-8,7

Fonte: Autor, 2017.

Nota - A afinidade da aminoguanidina e seus compostos derivados com a isoforma MMP-9 foi avaliada a partir da variação da energia livre de ligação (E; kcal·mol⁻¹) dos compostos com os alvos proteicos (PDB): 1ITV (domínio hemopexin) e 1GKC/1GKD (domínios catalíticos).

Na sequência, foi realizada a análise das interações observadas entre a aminoguanidina, bem como os seus derivados (PA 83, LQM 01 e LQM 03), com o ligante co-cristalizado para o alvo proteico 1HOV (Figura 33A) (os demais alvos considerados não apresentam ligante co-cristalizado). É possível verificar que o ligante co-cristalizado (E = -4,3 kcal·mol⁻¹) interage com 14 resíduos de aminoácidos. Ao avaliar os compostos complexados com o alvo proteico, observou-se que todos os possíveis ligantes interagem com o resíduo His120. Este resultado sugere que o resíduo mencionado não é considerado crítico para a atividade do alvo 1HOV. Ao analisar o melhor composto PA 83, observa-se que este é capaz de interagir com 6 resíduos dos 14 (Figura 33-C). O derivado intermediário (LQM 01) e o pior ligante (AG) interagem com 4 dos 14 aminoácidos (Figura 33-D e B). Além disso, observou-se que o resíduo Thr143 está presente nas interações de todos os compostos estudados com o alvo 1HOV, exceto o composto PA 83 (Figura 33-C). Assim, pode-se sugerir que a interação com este resíduo é responsável pela modulação da atividade biológica do alvo 1HOV, dessa forma, podendo ser considerado como crítico.

Figura 33 - Representação das Interações Moleculares



Fonte:Ferreira, 2017.

Nota – Simulações das interações entre os resíduos do domínio catalítico do alvo MMP-2 (PDB: 1HOV) e os compostos derivados da aminoguanidina. A) ligante co-cristalizado com a aminoguanidina e seus derivados; B) interação da aminoguanidina com os resíduos do domínio catalítico do alvo; C) interação do derivado PA 83 com os resíduos do domínio catalítico do alvo; D) interação do derivado LQM 01 com os resíduos do domínio catalítico do alvo; E) interação do derivado LQM 03 com os resíduos do domínio catalítico do alvo.

Por fim, pode-se inferir que a ciclização da região terminal da aminoguanidina (PA83) favorece o número de interações no sítio catalítico, uma vez que esta possibilita um maior número de interações Van der Waals e/ou hidrofóbicas. Ademais, as ligações de hidrogênio sugerem uma estabilidade maior na formação do complexo ligante/macromolécula. Nesse sentido, é possível observar que o derivado PA 83 realiza duas ligações de H, porém os ligantes LQM 01 e AG realizam apenas uma. Neste último caso, acredita-se que fatores relacionados ao volume estérico e planaridade do esqueleto químico estejam influenciando a energia livre de ligação (E). Por fim, observa-se que o derivado LQM 03 não realiza nenhuma ligação de hidrogênio, reduzindo sua afinidade, quando comparado com o LQM 01.

6 DISCUSSÃO

A aminoguanidina e seus derivados há bastante tempo são alvos de estudos a respeito de seus efeitos farmacológicos relacionados à proteção contra as injúrias cardiometabólicas desencadeadas pelo diabetes mellitus (NENNA et al., 2015). Dentre os principais efeitos protetores, destaca-se a sua capacidade antiglicante (VASAN et al., 2001; THORNALLEY, 2003) que favorece a prevenção de resultados adversos causados pelos AGEs, tais como formação de placa aterosclerótica (SAKATA et al., 1995), disfunção diastólica ventricular esquerda (BERG et al., 1999) e endotelial (GAO et al., 2008). Nesse sentido, estudos demonstraram que o tratamento com aminoguanidina foi capaz de prevenir a deterioração da complacência miocárdica (NORTON et al., 1996), a hipertrofia cardíaca (CHANG et al., 2006) e a fibrose miocárdica induzida pelo diabetes em ratos (VADLA; VELLAICHAMY, 2012). Diante do exposto, avaliamos a capacidade antiglicante e antioxidante *in vitro* de derivados aminoguanidínicos e investigamos os seus efeitos na hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol em ratos.

Os principais resultados obtidos mostram que dentre os derivados aminoguanidínicos testados, o PA 83 foi o que apresentou os melhores resultados para capacidade antioxidante *in vitro*. Além do PA 83, o derivado LQM 01 também demonstrou boa capacidade de neutralizar espécies reativas, melhor até que a aminoguanidina, uma vez que esta não apresentou capacidade antioxidante para o ensaio analítico da capacidade de sequestrar o radical DPPH[•] (Tabela 1). Semelhantemente à aminoguanidina, o derivado LQM 03 também não apresentou capacidade de sequestrar o radical DPPH[•]. Quanto a capacidade de sequestrar o radical ABTS^{•+}, a aminoguanidina foi a melhor substância antioxidante quando comparada aos derivados aminoguanidínicos (Tabela 2). O composto PA 83 foi o derivado que apresentou o melhor resultado para o sequestro de [•]NO (Figura 24) e H₂O₂ (Figura 25).

Os resultados obtidos sugerem uma relevância da estrutura molecular quanto a capacidade antioxidante *in vitro* dos derivados aminoguanidínicos testados. O derivado PA 83 é, estruturalmente, um composto orgânico tricíclico que apresenta um acoplamento indol (anel benzênico acoplado a outro anel pirrol) interligado a um anel heterocíclico pirrol, oalcaloide imidazol (Figura 14). Semelhantemente, o composto LQM 01 também apresenta um grupamento indol. No entanto, a substituição do grupamento imidazol pelo guanidínico na molécula LQM 01 não preservou a capacidade antioxidante por completo, uma vez que este derivado não apresentou os mesmos resultados para os ensaios de sequestro de [•]NO e H₂O₂. A

substituição do grupamento indol da molécula LQM 01 por um grupamento cianofenil, originando a molécula LQM 03, reduziu a capacidade antioxidante *in vitro* da substância. Estes achados sugerem que a conjugação dos grupamentos indol e imidazol na estrutura da molécula foi capaz de melhorar o comportamento antioxidante do derivado PA 83.

Isoladamente, derivados e/ou precursores destes compostos orgânicos têm apresentado diversos efeitos biológicos, destacando-se o indol-3 carbinol (I3C) que têm sido utilizado como antitumoral (OGANESIAN et al., 1997; AGGARWAL; ICHIKAWA, 2005; MOISEEVA et al., 2006; ADWAS et al., 2016) e no combate a doenças autoimunes (AUBORN et al., 2003). Compostos que apresentam o imidazol em suas estruturas também apresentam um potencial terapêutico contra o câncer (LIU et al., 2015; XU et al., 2015), anti-inflamatório (FERNANDES et al., 2004), antibacteriano e antifúngico (AMMAR et al., 2016; MOUSSA et al., 2016).

Uma das características comum aos compostos que apresentam atividade antitumoral é a capacidade antioxidante elevada, sejam eles derivados indol ou imidazol. Um trabalho realizado por Fatahala e colaboradores (2015) mostrou que uma série de compostos que apresentavam em suas estruturas os grupamentos indol e pirrol, demonstram um sinergismo entre as atividades antitumoral e antioxidante. Além do tratamento contra o câncer, alguns dos compostos também são utilizados como anti-inflamatórios não esteroidais (NSAID; *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*) e são extremamente eficientes quanto a ação antioxidante, principalmente aqueles que contém o grupamento indol, como a indometacina (MOUITHYS-MICKALAD et al., 2000; FERNANDES et al., 2004). No entanto, os NSAID podem causar danos gástricos, provocando úlceras (BINDU et al., 2013; CARRASCO-POZO et al., 2016). Com o objetivo de reverter esses efeitos adversos, Arora e colaboradores (2014) desenvolveram derivados que preservaram as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes e diminuíram os danos gástricos.

Além de substâncias sintéticas, alguns compostos com características orgânicas que ocorrem naturalmente, como os aminoácidos, podem apresentar o grupamento indol em suas estruturas moleculares. Um destes compostos é o aminoácido triptofano (*ácido (2S)-2-amino-3-(1H-indol-3-il)propanóico*) (MANGGE et al., 2014). Assim como os compostos sintéticos que contém o grupamento indol, o triptofano surge como uma alternativa antioxidante endógena (ELIAS et al., 2005), onde a configuração eletrônica do átomo de nitrogênio no anel pirrol (Figura 14) favorece a reatividade eletrofílica do grupamento e contribui para função antioxidante da molécula (NAISMITH, 2012). Sustentando tais afirmativas, Bravo e colaboradores (BRAVO et al., 2013) verificaram que uma intervenção dietética rica em

ingestão de triptofano foi capaz de elevar a capacidade antioxidante e os níveis de melatonina e serotonina de pessoas que sofriam de distúrbios do sono. O papel antioxidante do triptofano e também seus metabólitos (ácido kinurênico e ácido xanturênico) foi comprovado por Pérez-González e seus colaboradores (2015) que observaram *in vitro* que estes compostos foram extremamente hábeis em neutralizar espécies reativas. Estes achados são comprovados por uma série de outros estudos que evidenciam a elevada capacidade antioxidante tanto do triptofano (KA et al., 2016; KIMURA; WATANABE, 2016) quanto de seus metabólitos, como o ácido kinurênico (GENESTET et al., 2014; NAYAK; BUTTAR, 2016).

Embora a aminoguanidina não tenha apresentado capacidade antioxidante para o ensaio de sequestro do radical DPPH[•], muitos trabalhos têm apontado esta substância como uma potencial ferramenta no combate aos danos provocados por espécies reativas. Um dos primeiros estudos a mostrar evidências da capacidade antioxidante da aminoguanidina foi realizado por Picard e colaboradores (1992). Neste trabalho os autores mostraram que a substância foi capaz de inibir a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL - *Low Density Lipoprotein*) através da sua conjugação com as moléculas de aldeídos reativos que promovem as modificações oxidativas das LDLs. Em seguida, foi comprovado que tal capacidade atribuída a aminoguanidina tem relação direta com a diminuição da peroxidação lipídica *in vitro*, prevenindo, dessa forma, as alterações oxidativas de LDLs ou outras proteínas que tenham afinidade elevada por aldeídos reativos gerados pela peroxidação (SCACCINI; CHIESA; JIALAL, 1994). Como a oxidação de LDL é resultado de uma reação de carbonilação proteica, onde o grupo eletrofílico do aldeído reativo reage com resíduos de lisina presente na proteína (FRITZ; PETERSEN, 2011; CURTIS et al., 2012), sugere-se que a função antioxidante da aminoguanidina seja pelo ataque exercido pelo grupamento guanidínico desta sobre a região eletrofílica da cadeia carbônica do aldeído reativo, favorecendo a neutralização de compostos altamente reativos oriundos da peroxidação lipídica (PICARD et al., 1992).

Como os aldeídos reativos são produtos da peroxidação lipídica, resultando da ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) sobre os ácidos graxos poli-insaturados (PERLUIGI et al., 2012; FRITZ; PETERSEN, 2013), as evidências citadas apontam para a interferência da aminoguanidina apenas sobre estes produtos altamente reativos, não deixando claro se a aminoguanidina também poderia atuar como um *scavenger* de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio (ERNs). Nesse sentido, Yildiz e colaboradores (1998) mostraram que a aminoguanidina também é um eficiente neutralizador

de radicais livres, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), OH^- (radical hidroxila) e $ONOO^-$ (peroxinitrito). Em outro estudo, embora a aminoguanidina tenha confirmado sua eficiência antioxidante para o radical OH^- , foi comprovado *in vitro* que o mesmo não ocorre para o ânion superóxido (O_2^-) (DOBSÁK et al., 2001). Dessa forma, mesmo que não tenhamos observado uma capacidade específica da aminoguanidina sequestrar o radical $DPPH^*$ muitos estudos fornecem muitas evidências da habilidade desta substância agir como um antioxidante, principalmente modulando a síntese de *NO (GUILLON et al., 2014; LAFIONIATIS et al., 2016).

Os estudos mais atuais a respeito das propriedades antioxidantes da aminoguanidina apontam a sua eficácia no combate aos prejuízos causados pelo estresse oxidativo em diversas condições patológicas, tais como diabetes (GOODARZI et al., 2014; HAFEZ et al., 2015), hipertensão (MUKOHDA et al., 2012; HUANG et al., 2013), esquizofrenia (LAFIONIATIS et al., 2016) e doença de Alzheimer (ANAEIGOUDARI et al., 2016). Em muitas condições patológicas, a utilização da aminoguanidina como ferramenta terapêutica é relacionada com a sua capacidade de inibir seletivamente a iNOS (MISKO et al., 1993; WOLFF; LUBESKIE, 1995), uma vez que esta enzima tem um papel relevante nos prejuízos observados em várias situações adversas como o choque hemorrágico (SOLIMAN, 2013; SOLIMAN, 2014), disfunção autonômica (SANGARTIT et al., 2016; DA CUNHA et al., 2017), câncer (JAHANI-ASL; BONNI, 2013; KUMAGAI et al., 2015), resistência à insulina (SUGITA et al., 2012) e inflamação (NAKAZAWA et al., 2017). Além da iNOS, a aminoguanidina também inibe a atividade da enzima amino oxidase semicarbazida-sensível (SSAO – *Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase*) (PRÉVOT et al., 2007; KAZACHKOV et al., 2007) que está envolvida em processos citotóxicos mediados por compostos altamente reativos, tais como formaldeído e metilglioxal, além de elevar a produção de H_2O_2 e amônia (JALKANEN; SALMI, 2001; YU et al., 2003; O'SULLIVAN et al., 2004). Nesse sentido, todas as evidências apresentadas destacam a capacidade antioxidante, além da antiglicante, como um potencial mecanismo farmacológico para combater diversas doenças.

Após a avaliação da capacidade antioxidante, seguiu-se a análise do potencial antiglicante da aminoguanidina e dos derivados PA 83, LQM 01 e LQM 03. Diferentemente dos resultados da capacidade antioxidante, o derivado LQM 03 foi o que demonstrou o melhor perfil antiglicante, seguido pela aminoguanidina e o derivado PA 83. Os resultados sugerem que a fusão do grupamento 4-cianofenil-metileno ao grupamento guanidínico, constituindo o derivado LQM 03, elevou, aproximadamente, para 60% a capacidade

antiglicante nas primeiras 24 horas, enquanto a aminoguanidina resultou em menos de 40% (Figura 26). Mesmo após 48 horas, com a aminoguanidina apresentando melhor resultado que o LQM 03, não consegue atingir a mesma capacidade de inibir a formação de AGEs que o derivado LQM 03 nas primeiras 24 horas.

A presença da amina na molécula configura uma região altamente reativa da aminoguanidina, favorecendo a formação de ligações com outras estruturas moleculares que apresentam aldeídos e/ou cetonas como grupos funcionais(LIEBER; SMITH, 1939).Como a síntese de AGEs envolve a formação de ligações entre estes grupamentos funcionais de carboidratos e o grupamento amino ou guanidínico de resíduos de aminoácidos de moléculas proteicas(SINGH et al., 2014;SHARMA et al., 2015), a aminoguanidina pode interagir diretamente com os AGEs e/ou seus intermediários, formando ligações carbonil-amino, impedindo, dessa forma,a condensação entre os compostos reativos e as proteínas(THORNALLEY, 2003;REDDY; BEYAZ, 2006).Esta situação foi comprovada por Lo e colaboradores(1994) que mostraram o efeito *scavenger* da aminoguanidina sobre o metilglioxal, um composto orgânico que apresenta grupamentos aldeído e cetona em sua estrutura molecular e é um dos principais intermediários das vias de síntese de AGEs que está envolvido em várias condições adversas no diabetes, como disfunção endotelial (MUKOHDA et al., 2013;CHOI et al., 2016), retinopatia(CHAN et al., 2016), osteoporose (SUH et al., 2014), nefropatia diabética (JENSEN et al., 2016) e elevação da pressão arterial via sistema renina-angiotensina (DHAR et al., 2013;DHAR et al., 2014).Recentemente, Colzani e colaboradores(2016) comprovaram que a aminoguanidina apresenta uma reatividade ao metilglioxal extremamente elevada, capaz de prevenir a carbonilação proteica através do seu grupamento hidrazina,região nucleofílica que configura o ponto de reação com o grupamento aldeído do metilglioxal(NIGST et al., 2012).

A melhoria na capacidade antiglicante do derivado LQM 03 observada nas 24 horas iniciais de incubação, pode ser atribuída à presença do grupamento 4-cianofenil-metileno além do grupamento hidrazina preservado na estrutura molecular. A piridoxamina, um análogo da vitamina B₆, pode ser considerado um derivado fenil com vários grupamentos funcionais que podem neutralizar eficientemente compostos carbonila, tais como o glioxal e adutos da peroxidação lipídica e intermediários das via de formação dos AGEs(CHETYRKIN et al., 2008;CALDÉS et al., 2011; COLZANI et al., 2016).A aplicabilidade da capacidade antiglicante *in vitro* foi comprovada em modelos animais de diabetes que mostraram a eficácia da piridoxamina na prevenção do desenvolvimento da nefropatia diabética em camundongos(TANIMOTO et al., 2007;ABOUZED et al., 2016).

Um fator comum entre o derivado LQM 03 e a piridoxamina é a presença de um anel aromático e o grupamento amino na estrutura molecular. No entanto, diferentemente do derivado LQM 03, o anel aromático da piridoxamina é heterocíclico que favorece as reações de substituição eletrofílica (WONG et al., 2012; BÄHR; OESTREICH, 2016). Em relação ao anel aromático do derivado LQM 03, este apresenta um grupo ciano (CN; $C \equiv N$) em sua estrutura, caracterizando uma região altamente nucleofílica na molécula (TUMANOV et al., 2007; KALGUTKAR et al., 2011). A presença de um grupamento nucleofílico favorece a ocorrência de reações com aldeídos e cetonas que, por sua vez, são grupos funcionais eletrofílicos (APPEL et al., 2013). Sendo assim, a inclusão do grupamento 4-cianofenil na estrutura molecular da aminoguanidina, originando o derivado LQM 03, sugere uma melhoria na reatividade do composto, aumentando a sua capacidade de atuar como um antiglicante.

A partir dos resultados *in vitro*, obtidos inicialmente, gerou-se expectativa de que o derivado PA 83 seria uma ferramenta farmacológica eficiente para o tratamento dos efeitos hipertróficos do isoproterenol em ratos Wistar. No entanto, após 15 dias de tratamento, apenas o derivado LQM 03 na dose mais elevada (30 mg/kg) foi capaz de atenuar levemente a hipertrofia cardíaca (Figura 29), mas provocou aumento na deposição de colágeno no miocárdio (Figura 31) e no tecido hepático (Figura 32). Além disso, a aminoguanidina não foi capaz de reverter os efeitos hipertróficos do isoproterenol e também não impediu as alterações fibróticas observadas no tecido cardíaco (Figura 29).

A estimulação sustentada de receptores β -adrenérgicos com isoproterenol tem sido muito utilizada como modelo de indução de hipertrofia cardíaca em ratos e camundongos, resultando em vários tipos de alterações morfofuncionais que podem ser consideradas como respostas compensatórias (SCHMID et al., 2015; PUHL et al., 2016) ou respostas mal-adaptativas/descompensadas (VERGARO et al., 2016; YIN et al., 2016). Quando se observa uma progressão do *status* compensatório para o mal-adaptativo ou patológico, uma série de mecanismos de sinalização intracelulares são ativados e podem levar a ocorrência de apoptose de cardiomiócitos (MAJOR et al., 2015; OKADA et al., 2016) e fibrose miocárdica (SAGOR et al., 2015; YIN et al., 2016) que, por sua vez, são responsáveis por promover a disfunção miocárdica observada na insuficiência cardíaca (CHIN et al., 2016). De qualquer forma, a estimulação contínua de receptores β -adrenérgicos através da administração de isoproterenol reduz a expressão de genes anti-hipertróficos e eleva a expressão de muitos outros envolvidos nas adaptações pró-fibróticas e pró-apoptóticas (MANIVASAGAM et al., 2016; WANG et al., 2016). Dessa forma, corroborando com estudos prévios, foi observado neste trabalho que a utilização do isoproterenol (7 mg/kg), resultou em elevação dos índices de hipertrofia

cardíaca, indicando uma adaptação hipertrófica do miocárdio, além elevar a deposição de colágeno cardíaco. Inesperadamente, apenas um dos derivados aminoguanidínicos utilizados foi capaz de amenizar os efeitos hipertróficos do isoproterenol sobre o miocárdio, mas não reverteu por completo estas adaptações.

Muitos trabalhos têm mostrado evidências das aplicações terapêuticas de diversos derivados da classe das guanilhidrazonas, destacando-se as propriedades anti-hipertensivas (KOSS, 1983; KOSS et al., 1983; WILSON et al., 1986), antitumorais (PINHATTI et al., 2016; SILVA et al., 2016), antivirais (JIN et al., 2015), anti-inflamatórias (WEBSKY et al., 2013; TAKIGAWA et al., 2016) e antifúngicas (AJDAČIĆ et al., 2016). Nesse sentido, a aminoguanidina se destaca como um dos principais representantes das guanilhidrazonas com diversas ações profiláticas, sendo as complicações diabéticas os maiores alvos terapêuticos da mesma (ELLIS; GOOD, 1991; HAMMES et al., 1991; NORTON et al., 1996; SOULIS et al., 1996).

Sustentando tais evidências, Brownlee e colaboradores (1986) estão dentre os primeiros a apontar a capacidade da aminoguanidina prevenir o acúmulo de AGEs e, dessa forma, reduzir a formação da malha de colágeno nas paredes aórticas, contribuindo para melhoria da elasticidade arterial. Em seguida, estes achados foram confirmados por Huijberts e colaboradores (1993) que comprovaram os efeitos benéficos da aminoguanidina sobre a complacência arterial em ratos diabéticos. Como um potente antiglicante, foi atribuído a aminoguanidina o papel de interferir na formação da ligação entre fibras de colágeno e AGEs e/ou intermediários, contribuindo para manutenção da complacência vascular e retardando ou até evitando a aterosclerose decorrente do diabetes (CANTINI et al., 2001; FORBES et al., 2004; CHANG et al., 2006a). Além de mediar positivamente os mecanismos responsáveis pela elasticidade vascular via complexo AGEs-colágeno, a aminoguanidina também pode atenuar o comprometimento da reatividade vascular, restaurando parcialmente a função endotelial de ratos diabéticos (BUCALA; TRACEY, 1991; OZYAZGAN et al., 2000; OAK et al., 2009). Embora estudos prévios tenham observado uma relação direta entre a participação da aminoguanidina na organização estrutural do tecido vascular, de forma que preserve os parâmetros mecânicos envolvidos na complacência dos vasos, o tratamento com aminoguanidina não impede o aumento da síntese do colágeno vascular, mas reduz significativamente o conteúdo de AGEs, sugerindo que a função antiglicante da aminoguanidina seja determinante para sua ação terapêutica contra as complicações diabéticas ou os prejuízos advindos da senescência (CORMAN et al., 1998; CHANG et al., 2006a).

Nesse sentido, sabendo que diabetes pode elevar a quantidade de colágeno e AGEs no miocárdio (VAN HEEREBEEK et al., 2008; KARAMITSOS, 2009; TERUI et al., 2009) e ocasionar a cardiomiopatia diabética como resultado da disfunção diastólica instalada (MAYA; VILLARREAL, 2010; SAKAKIBARA et al., 2011), constatou-se que o tratamento com aminoguanidina é capaz de reverter as complicações cardíacas do diabetes através da redução da síntese de AGEs, impossibilitando a formação de complexos AGEs-colágeno (VADLA; VELLAICHAMY, 2012) e, dessa forma, preservando as funções miocárdicas (WU et al., 2008). Além do exposto, desde que tem se mostrado que a quantidade plasmática de AGEs aumenta com a progressão da idade (CAMPBELL et al., 2012; SIMM, 2013), a aminoguanidina tem apresentado ação cardioprotetora, impedido a hipertrofia cardíaca quando decorrente da senescência (LI et al., 1996; CORMAN et al., 1998). No entanto, quando induzida cirurgicamente, desenvolvendo sobrecarga de volume, o tratamento com aminoguanidina não foi capaz de reverter a hipertrofia miocárdica, mas atenuou os prejuízos estruturais, prevenindo a interação AGE-colágeno, uma vez que reduziu a síntese de AGEs (HERRMANN et al., 2003).

Tais divergências encontradas sugerem um efeito dependente do modelo utilizado para induzir hipertrofia cardíaca. Como observado em nosso estudo, a aminoguanidina também não foi capaz de impedir a hipertrofia induzida por isoproterenol (Figura 29), mesmo em doses 2 e 3 vezes maiores do que a apresentada em nossos resultados (dados não apresentados). Além disso, assim como exposto em outros trabalhos discutidos anteriormente, o tratamento com aminoguanidina também não reduziu a deposição de colágeno. Estes resultados sugerem que a aminoguanidina não interfere nos mecanismos celulares envolvidos na hipertrofia cardíaca e na deposição de colágeno miocárdico. Seria plausível supor que o tratamento teria sucesso em inibir a síntese de AGEs no modelo de hipertrofia cardíaca utilizado neste trabalho, uma vez que a aminoguanidina é conhecida como um potente antiglicante (ASHRAF et al., 2015). No entanto, como não foi realizado a mensuração tecidual de AGEs ou seus principais intermediários, não é possível afirmar se a aminoguanidina foi capaz de reduzir a formação de AGEs, uma vez que a capacidade antiglicante da mesma foi comprovada (Figura 26). Destaca-se ainda que não há relatos na literatura se no modelo de hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol é possível observar aumento na síntese de AGEs. Entretanto, há evidências da expressão aumentada dos receptores para AGEs (RAGEs) em modelos de hipertrofia cardíaca induzida por estenose aórtica, contribuindo para elevar a fibrose, a inflamação e o estresse oxidativo no miocárdio (LIN et al., 2016; LIU et al., 2016).

Intrigantemente, um trabalho recente realizado por Parthasarathy e colaboradores (2014), foi o único a mostrar efeito positivo da aminoguanidina no modelo de hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol. Os autores destacaram que o tratamento com aminoguanidina (50 mg/kg) durante 15 dias resultou em redução significativa da hipertrofia cardíaca e da síntese de colágeno, bem como a redução do estresse oxidativo. Foi apontado ainda que o efeito da aminoguanidina no modelo citado envolveu a inibição da atividade das enzimas MMP-2 e MMP-9 (MMP – *Matrix Metalloproteinases*), que estão envolvidas nos mecanismos de balanço da deposição de colágeno tecidual cardíaco (GAFFNEY et al., 2015; VAN DOREN, 2015). Corroborando com estes achados, foi reportado em trabalho anterior que o aumento na fibrose miocárdica induzida por isoproterenol foi prevenido pela inibição da atividade das enzimas MMP-2 e MMP-9 com doxiciclina (25 mg/kg), evidenciando um papel relevante destas enzimas nos processos de remodelamento do miocárdio (HORI et al., 2009). No entanto, o tratamento proposto pelos autores não foi capaz de reduzir a hipertrofia cardíaca, sugerindo que os mecanismos envolvidos nas adaptações hipertróficas do miocárdio e na fibrose são independentes no modelo de indução por isoproterenol.

Embora Parthasarathy e colaboradores (2014) tenham mostrado uma afinidade relativamente alta da aminoguanidina pelo sítio ativo das MMPs, vale destacar que a possível inibição da atividade destas enzimas tenha ocorrido em função da constatação do aumento da expressão de TIMP-1 e TIMP-2, os inibidores teciduais das metaloproteases (TIMPs – *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase*). Além disso, foi constatado neste trabalho, através de estudo de docking molecular, que todos os compostos derivados aminoguanidínicos utilizados neste trabalho apresentaram afinidade mais elevada pelas isoformas MMP-2 e MMP-9 do que a própria aminoguanidina (Tabela 3 e Tabela 4). A diferença estrutural molecular entre a aminoguanidina e seus derivados pode ser um dos fatores que interfere na afinidade dos ligantes com as MMPs. Sustentando tal afirmativa, um estudo recente, realizado por Song e colaboradores (2016), atribui à presença de grupamentos químicos funcionais de análogos inibidores a capacidade de inibir a MMP-2 e a MMP-9, principalmente o grupamento indol, grupamento este que está presente em dois (PA 83 e LQM 01) dos três derivados aminoguanidínicos testados neste trabalho. Nesse sentido, pode-se inferir que a ciclização da região terminal da aminoguanidina (derivado PA 83) favorece o número de interações no sítio catalítico da MMP-2 (1HOV), uma vez que esta possibilita um maior número de interações Van der Waals e/ou hidrofóbicas (DHANARAJ et al., 1999). Ademais, é possível observar que o derivado PA 83 faz duas ligações de hidrogênio o que

sugerem uma estabilidade maior na formação do complexo ligante/macromolécula. Acredita-se que fatores relacionados ao volume estérico e planaridade do esqueleto químico estejam influenciando a energia livre de ligação (E), uma vez que a aminoguanidina e o derivado LQM 01 fazem apenas uma ligação de hidrogênio. Por fim, observa-se que o LQM03 não realiza nenhuma ligação de H, reduzindo sua afinidade, quando comparado com o LQM01.

Além dessa similaridade, destaca-se ainda que o análogo inibidor testado por Song e colaboradores (2016) interage com o resíduo de aminoácido Thr143, o mesmo resíduo que esteve presente na interação de todos os derivados testados com o alvo 1HOV (domínio catalítico da MMP-2), exceto o PA 83 (Figura 33). Assim, pode-se sugerir que a interação dos ligantes com resíduo Thr143 é responsável pela provável redução da atividade biológica, dessa forma, podendo ser considerado como crítico para ação das metaloproteases. Estes resultados sugerem que a afinidade exacerbada dos compostos pelas MMPs tenha a capacidade de inibi-las, o que justificaria o aumento da deposição de colágeno.

A relevância das enzimas MMP2 e MMP-9 para o remodelamento cardíaco é destacado em outros modelos animais. Horn e colaboradores (2012) relataram que em ovelhas jovens com insuficiência cardíaca (IC) ocorre um acúmulo acentuado de colágeno e aumento da atividade da enzima MMP-2, enquanto que em ovelhas idosas observou-se uma redução significativa no conteúdo de colágeno. Os autores destacaram que esta divergência esteve associada com uma diminuição da expressão de TIMP-3 e TIMP-4, inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs – *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase*), e elevação da atividade da enzima MMP-2 no miocárdio de ovelhas idosas com IC. Estes resultados apontam um fator causal para a diminuição do colágeno miocárdico das ovelhas idosas com IC, de forma que a expressão reduzida de TIMPs favorece o aumento da degradação do colágeno através da ação da MMP-2 e, dessa forma, prejudica as funções cardíacas. Corroborando com estes achados, em outros trabalhos foi constatado que a inibição das MMPs reduz a extensão do dano (BENCSIK et al., 2014; ZHENG et al., 2016) e a fibrose (PERIASAMY et al., 2011; SONG et al., 2011) em modelos de infarto miocárdico.

Por fim, os resultados obtidos com o tratamento sugerem que o composto LQM 03 bem como a aminoguanidina são capazes de inibir a ação enzimática das MMPs, favorecendo o aumento da deposição de colágeno na matriz extracelular. No entanto, a confirmação desta hipótese necessita de experimentos adequados para avaliar a atividade das MMPs na presença dos compostos derivados aminoguanidínicos utilizados neste trabalho. Espera-se que esta hipótese seja testada o mais brevemente possível a fim de responder aos questionamentos que afloraram com os resultados obtidos.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o momento nos permitiram concluir que:

- I. Dentre os derivados aminoguanidínicos, o PA 83 foi o que apresentou o melhor perfil antioxidante *in vitro*;
- II. A avaliação da capacidade antiglicante *in vitro* indicou que o derivado LQM 03 foi o que apresentou o melhor resultado, incluindo a comparação com os efeitos da aminoguanidina;
- III. Dentre os derivados aminoguanidínicos, apenas o LQM 03 na dose de 30 mg/kg atenuou levemente a hipertrofia cardíaca;
- IV. A aminoguanidina não impediu a hipertrofia cardíaca nem a fibrose miocárdica;
- V. A aminoguanidina preveniu a fibrose hepática provocada pelo isoproterenol;
- VI. O derivado LQM 03 elevou significativamente a deposição de colágeno cardíaco e hepático;
- VII. Todos os compostos derivados aminoguanidínicos têm afinidades mais elevadas pelas isoformas MMP-2 e MMP-9 do que a aminoguanidina, sendo o composto PA 83 o mais potente dos derivados.

8 REFERÊNCIAS

- ABOUZED, Tarek Kamal et al. Preventive effect of salicylate and pyridoxamine on diabetic nephropathy. **Journal of Diabetes Research** v. 2016 , 2016.
- ADWAS, Almokhtar A. et al. Anti-cancer and cardioprotective effects of indol-3-carbinol in doxorubicin-treated mice. **Journal of Infection and Chemotherapy** v. 22, n. 1, p. 36–43 , 2016.
- AGGARWAL, Bharat B.; ICHIKAWA, Haruyo. Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. **Cell Cycle** v. 4, n. 9, p. 1201–1215 , 2005.
- AGÜERO, Jaime et al. Myocardial G protein receptor-coupled kinase expression correlates with functional parameters and clinical severity in advanced heart failure. **Journal of Cardiac Failure** v. 18, n. 1, p. 53–61 , 2012.
- AJDAČIĆ, Vladimir et al. Synthesis and evaluation of thiophene-based guanylhydrazones (iminoguanidines) efficient against panel of voriconazole-resistant fungal isolates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** v. 24, n. 6, p. 1277–1291 , 2016.
- AKKOC, A et al. Immunocharacterization of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in canine transmissible venereal tumors. **Biotechnic &Histochemistry** v. 92, n. 2, p. 100–106 , 2017.
- ALDERMAN, Edwin L; HARRISON, D C. Myocardial hypertrophy resulting from low dosage isoproterenol administration in rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** v. 136, n. 1, p. 268–270 , 1971.
- ALI, Mohammed K. et al. Noncommunicable diseases: Three decades of global data show a mixture of increases and decreases in mortality rates. **Health Affairs** v. 34, n. 9, p. 1444–1455 , 2015.
- AMERONGEN, M.J. Van et al. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute functionally to scar formation after myocardial infarction. **The Journal of Pathology** v. 214, p. 377–386 , 2008.
- AMMAR, Y.A. et al. New imidazolidineiminothione, imidazolidin-2-one and imidazoquinoxaline derivatives: Synthesis and evaluation of antibacterial and antifungal activities. **Current Organic Synthesis** v. 13, n. 3, p. 466–475 , 2016.
- ANAEIGOUDARI, Akbar et al. Inducible nitric oxide inhibitor aminoguanidine, ameliorates deleterious effects of lipopolysaccharide on memory and long term potentiation in rat. **Life Sciences** v. 158, p. 22–30 , 2016.
- ANDERSEN, Nicholas D. et al. Calcium signaling regulates ventricular hypertrophy during development independent of contraction or blood flow. **Journal Mol Cell Cardiol.** v. 80, p. 1–9 , 2015.
- ANTOLOVICH, Michael et al. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst** v. 127, n. 1, p. 183–198 , 2002.

APPEL, Roland et al. Electrophilicities of benzaldehyde-derived iminium ions: Quantification of the electrophilic activation of aldehydes by iminium formation. **Journal of the American Chemical Society** v. 135, n. 17, p. 6579–6587 , 2013.

APTE, Suneel S.; PARKS, William C. Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. **Matrix Biology** v. 44–46, p. 1–6 , 2015.

ARAÚJO, Cleônia Roberta Melo et al. Desenvolvimento de fármacos por hibridação molecular: Uma aula prática de química medicinal usando comprimidos de paracetamol e sulfadiazina e a ferramenta virtual SciFinder. **Quimica Nova** v. 38, n. 6, p. 868–873 , 2015.

ARAÚJO, Fábio et al. Trends in cardiovascular diseases and cancer mortality in 45 countries from five continents (1980-2010). **European Journal of Preventive Cardiology** v. 21, n. 8, p. 1004–1017 , 2014.

ARONSON, Doron. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. **Journal of Hypertension** v. 21, n. 1, p. 3–12 , 2003.

ARORA, Radha Krishan et al. Novel coumarin–benzimidazole derivatives as antioxidants and safer anti-inflammatory agents. **Acta Pharmaceutica Sinica B** v. 4, n. 5, p. 368–375 , 2014..

ASHRAF, Jalaluddin M. et al. Quercetin as a finer substitute to aminoguanidine in the inhibition of glycation products. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 77, p. 188–192 , 2015.

ATLAS, Daphne; BURSTEIN, Yigal. Isolation of an endogenous clonidine-displacing substance from rat brain. **FEBS Letters** v. 170, n. 2, p. 387–390 , 1984.

AUBORN, Karen J et al. Lifespan is prolonged in autoimmune-prone (NZB/NZW) F1 mice fed a diet supplemented with indole-3-carbinol. **The Journal of Nutrition** v. 133, n. 11, p. 3610–3613 , 2003.

AVEZUM, Alvaro et al. Stroke in latin america: burden of disease and opportunities for prevention. **Global Heart** v. 10, n. 4, p. 323–331 , 2015.

BADIANI, Sveeta et al. Aortic stenosis, a left ventricular disease: insights from advanced imaging. **Current Cardiology Reports** v. 18, n. 8 , 2016.

BÄHR, Susanne; OESTREICH, Martin. Electrophilic aromatic substitution with silicon electrophiles: catalytic friedel-crafts C-H silylation. **Angewandte Chemie International Edition** p. 2–10 , 2016.

BAILLIE, George S et al. beta-Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates beta-adrenoceptor switching from Gs to Gi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 100, n. 3, p. 940–945 , 2003.

BAJPAI, Jugal Kishore et al. Impact of prehypertension on left ventricular structure, function and geometry. **Journal of Clinical and Diagnostic Research** v. 8, n. 4, p. 7–10 , 2014.

BAKER, Jillian G. The selectivity of beta-adrenoceptor agonists at human beta1-, beta2- and beta3-adrenoceptors. **British Journal of Pharmacology** v. 160, n. 5, p. 1048–61,2010.

BALCIOĞLU, Akif Serhat; MÜDERRISOĞLU, Haldun. Diabetes and cardiac autonomic neuropathy: clinical manifestations, cardiovascular consequences, diagnosis and treatment. **World Journal of Diabetes** v. 6, n. 1, p. 80–91 , 2015.

BANERJEE, Sauradipta; MAITY, Subhajit; CHAKRABORTI, Abhay Sankar. Methylglyoxal-induced modification causes aggregation of myoglobin. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** v. 155, p. 1–10 , 2016.

BARBOSA, Júnia H. Porto et al. A determinação dos produtos avançados de glicação e de lipoxidação (ALES) em alimentos e em sistemas biológicos: avanços, desafios e perspectivas. **Química Nova** v. 39, n. 5, p. 608–620 , 2016.

BARNES, Justin; DELL'ITALIA, Louis J. The multiple mechanistic faces of a pure volume overload: implications for therapy. **The American Journal of the Medical Sciences** v. 348, n. 4, p. 337–46 , 2014.

BARQUERA, Simon; PEDROZA-TOBIAS, Andrea; MEDINA, Catalina. Cardiovascular diseases in mega-countries. **Current Opinion in Lipidology** v. 27, n. 4, p. 329–344 , 2016.

BARREIRO, Eliezer J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova** v. 25, n. 6b, p. 1172–1180 , 2002.

BARRY, Sean P; DAVIDSON, Sean M; TOWNSEND, Paul A. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. **The International Journal of Biochemistry e Cell Biology** v. 40, p. 2023–2039 , 2008.

BAUM, Jennifer; DUFFY, Heather S. Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? **Journal of Cardiovascular Pharmacology** NULL, v. 57, n. 4, p. 376–9 , 2011.

BAUTISTA-LÓPEZ, Norma Leticia et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 as diagnostic markers in the progression to Chagas cardiomyopathy. **American Heart Journal** v. 165, n. 4, p. 558–566 , 2013.

BAUTISTA-LOPEZ, Norma Leticia; SCHULZ, Richard. Matrix metalloproteinases 2 and 9 as diagnostic tools in Chagas cardiomyopathy. **International Journal of Cardiology** v. 177, n. 1, p. 46–47 , 2014.

BELL, Vanessa; MITCHELL, Gary F. Influence of Vascular Function and Pulsatile Hemodynamics on Cardiac Function. **Current Hypertension Reports** v. 17, n. 9 , 2015.

BENCSIK, Péter et al. Moderate inhibition of myocardial matrix metalloproteinase-2 by ilomastat is cardioprotective. **Pharmacological Research** v. 80, p. 36–42 , 2014.

BERG, T J et al. Serum levels of advanced glycation end products are associated with left ventricular diastolic function in patients with type 1 diabetes. **Diabetes Care** v. 22, n. 7, p. 1186–1190 , 1999.

BERNARDO, Bianca C et al. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacology and Therapeutics** v. 128, n. 1, p. 191–227 , 2010.

- BERNHEIM, Frederick. The effect of aminoguanidine on the oxidation of formaldehyde by rat liver. **The Journal of Biological Chemistry** v. 186, p. 225–228 , 1950.
- BINDU, Samik et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug induces proinflammatory damage in gastric mucosa through NF- κ B activation and neutrophil infiltration: Anti-inflammatory role of heme oxygenase-1 against nonsteroidal anti-inflammatory drug. **Free Radical Biology and Medicine** v. 65, p. 456–467 , 2013.
- BOGUTH, Cassandra a et al. Molecular basis for activation of G protein-coupled receptor kinases. **The EMBO journal** v. 29, n. 19, p. 3249–59 , 2010.
- BOLLINI, Sveva; SMART, Nicola; RILEY, Paul R. Resident cardiac progenitor cells: At the heart of regeneration. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** v. 50, n. 2, p. 296–303 , 2011.
- BOLTON, W. Kline et al. Randomized Trial of an Inhibitor of Formation of Advanced Glycation End Products in Diabetic Nephropathy. **American Journal of Nephrology** v. 24, n. 1, p. 32–40 , 2004.
- BOWERS, Stephanie L.K.; BANERJEE, Indroneal; BAUDINO, Troy A. The extracellular matrix: at the center of it all. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v. 48, n. 3, p. 474–482, 2010.
- BRASIL. Ministério Da Saúde. Indicadores e Dados Básicos 2012 - Brasil: Taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares por região e ano. **DATASUS - Departamento de Informática do SUS**. Brasília, DF, 2015.
- BRAVO, R. et al. Tryptophan-enriched cereal intake improves nocturnal sleep, melatonin, serotonin, and total antioxidant capacity levels and mood in elderly humans. **Age** v. 35, n. 4, p. 1277–1285 , 2013.
- BRISTON, Sarah J. et al. Balanced changes in Ca buffering by SERCA and troponin contribute to Ca handling during β -adrenergic stimulation in cardiac myocytes. **Cardiovascular Research** v. 104, n. 2, p. 347–354 , 2014.
- BRODDE, O E; MICHEL, M C. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. **Pharmacological reviews** v. 51, n. 4, p. 651–90 , dez. 1999.
- BRODDE, Otto-Erich; BRUCK, Heike; LEINEWEBER, Kirsten. Cardiac Adrenoceptors: Physiological and Pathophysiological Relevance. **Journal of Pharmacological Sciences** v. 100, n. 5, p. 323–337 , 2006.
- BRODEUR, Mathieu R. et al. Reduction of advanced-glycation end products levels and inhibition of rage signaling decreases rat vascular calcification induced by diabetes. **PLoS ONE** v. 9, n. 1 , 2014.
- BROUWER, Elizabeth D et al. Provider costs for prevention and treatment of cardiovascular and related conditions in low- and middle-income countries: a systematic review. **BMC Public Health** v. 15, n. 1, p. 1183 , 2015.
- BROWNLEE M, VLASSARA H, KOONEY A, ULRICH P, Cerami A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. **Science** v. 232, n. June, p. 1629–

1623 , 1986.

BUCALA R, TRACEY KJ, Cerami a. Advanced glycosylation produces quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes. **J Clin Invest** v. 87, n. 2, p. 432–438 , 1991.

BUCCIARELLI, Loredana G. et al. RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. **Circulation** v. 106, n. 22, p. 2827–2835 , 2002.

BUENO, Orlando F. et al. Calcineurin and hypertrophic heart disease: Novel insights and remaining questions. **Cardiovascular Research** v. 53, n. 4, p. 806–821 , 2002.

CAI, Wenting et al. Effect of bradykinin on cultured retinal pigment epithelial cells. **BMC Ophthalmology** v. 16, n. 199, p. 1–9 , 2016.

CALDÉS, Catalina et al. Phenol group in pyridoxamine acts as a stabilizing element for its carbinolamines and Schiff bases. **Chemistry and Biodiversity** v. 8, n. 7, p. 1318–1332 , 2011.

CAMPBELL, Duncan J. et al. Diastolic Dysfunction of Aging Is Independent of Myocardial Structure but Associated with Plasma Advanced Glycation End-Product Levels. **PLoS ONE** v. 7, n. 11, p. 1–14 , 2012.

CANTINI, C. et al. Aminoguanidine and Aortic Wall Mechanics, Structure, and Composition in Aged Rats. **Hypertension** v. 38, n. 4, p. 943–948 , 1 out. 2001.

CAPUZZI DM, Cevallos WH. Inhibition of hepatic cholesterol and triglyceride synthesis by guanabenz acetate. **Journal of Cardiovascular Pharmacology** v. 6, n. 5, p. S847-52 , 1984.

CARABELLO, Blase A. Volume Overload. **Heart Failure Clinics** v. 8, n. 1, p. 33–42 , 2012.

CARRASCO-POZO, Catalina et al. Molecular mechanisms of gastrointestinal protection by quercetin against indomethacin-induced damage: Role of NF- κ B and Nrf2. **Journal of Nutritional Biochemistry** v. 27, p. 289–298 , 2016.

CARROLL, Michael S. et al. Rapid-onset obesity with hypothalamic dysfunction, hypoventilation, and autonomic dysregulation (ROHHAD): Response to ventilatory challenges. **Pediatric Pulmonology** v. 50, n. 12, p. 1336–1345 , 2015.

CASTRO, Michele M. et al. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. **Free Radical Biology and Medicine** v. 46, n. 9, p. 1298–1307 , 2009.

CASTRO, Michele M. et al. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. **Atherosclerosis** v. 198, n. 2, p. 320–331 , 2008.

CASTRO, Michele M; TANUS-SANTOS, Jose E. Inhibition of matrix metalloproteinases (MMPs) as a potential strategy to ameliorate hypertension-induced cardiovascular alterations. **Current Drug Targets** v. 14, n. 3, p. 335–43 , 2013.

CENCIONI, Chiara et al. The double life of cardiac mesenchymal cells: Epimetabolic sensors and therapeutic assets for heart regeneration. **Pharmacology & Therapeutics** v. 171 , p. 43-55 , 2017.

CHACAR, Stéphanie et al. Basic Signaling in Cardiac Fibroblasts. **Journal of Cellular Physiology** v. 232 , n. 4, p. 725-730 , 2017.

CHAN, Chi Ming et al. Methylglyoxal induces cell death through endoplasmic reticulum stress-associated ROS production and mitochondrial dysfunction. **Journal of Cellular and Molecular Medicine** v. 20, n. 9, p. 1749–1760 , 2016.

CHAN, Vincent; HOEY, Andrew; BROWN, Lindsay. Improved cardiovascular function with aminoguanidine in DOCA-salt hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology** v. 148, n. 7, p. 902–8 , ago. 2006.

CHANG, Ching-Ping et al. Aminoguanidine protects against intracranial hypertension and cerebral ischemic injury in experimental heatstroke. **Journal of Pharmacological Sciences** v. 64, p. 56–64 , 2004.

CHANG, Kuo-Chu; HSU, Kwan-Lih; et al. Aminoguanidine prevents arterial stiffening and cardiac hypertrophy in streptozotocin-induced diabetes in rats. **British Journal Of Pharmacology** v. 147, n. 8, p. 944–50 , 2006.

CHANG, Kuo-Chu; TSENG, C D; et al. Arterial stiffening and cardiac hypertrophy in a new rat model of type 2 diabetes. **European Journal of Clinical Investigation** v. 36, n. 1, p. 1–7 , 2006.

CHANG, Tuanjie; WU, Lingyun. Methylglyoxal, oxidative stress, and hypertension. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology** v. 84, n. 12, p. 1229–1238 , 2006.

CHEMALY, Elie R et al. Differential patterns of replacement and reactive fibrosis in pressure and volume overload are related to the propensity for ischaemia and involve resistin. **Journal of Physiology (London)** v. 591, n. 21, p. 5337–5355 , 2013.

CHEN, Ying Ju et al. Advanced glycation end-products induced VEGF production and inflammatory responses in human synoviocytes via RAGE-NF- κ B pathway activation. **Journal of Orthopaedic Research** v. 34, n. 5, p. 791–800 , 2016.

CHERKASOV, Artem et al. QSAR Modeling: Where have you been? Where are you going to? **Journal of Medicinal Chemistry** v. 57, n. 12, p. 4977–5010 , 2014.

CHETYRKIN, Sergei V. et al. Pyridoxamine protects proteins from functional damage by 3-deoxyglucosone: Mechanism of action of pyridoxamine. **Biochemistry** v. 47, n. 3, p. 997–1006 , 2008.

CHIN, Calvin W.L. et al. Myocardial Fibrosis and Cardiac Decompensation in Aortic Stenosis. **JACC: Cardiovascular Imaging** v. 2015 , 2016.

CHOI, Yoon Young et al. CHOP deficiency inhibits methylglyoxal-induced endothelial dysfunction. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 480, n. 3, p. 362–368 , 2016.

- CHRISTIANSEN, L. B. et al. Ultrastructural myocardial changes in seven cats with spontaneous hypertrophic cardiomyopathy. **Journal of Veterinary Cardiology** v. 17, p. S220–S232 , 2015.
- CHUNG, Eunhee; YEUNG, Fan; LEINWAND, Leslie A. Calcineurin activity is required for cardiac remodelling in pregnancy. **Cardiovascular Research** v. 100, n. 3, p. 402–410 , 2013.
- CHUNG, Jihwa et al. Ursodeoxycholic Acid (UDCA) exerts anti-Atherogenic effects by inhibiting RAGE signaling in diabetic atherosclerosis. **PLoS ONE** v. 11, n. 1, p. 1–18 , 2016.
- CIESLIK, Katarzyna A.; TRIAL, Joann; ENTMAN, Mark L. Mesenchymal stem cell-derived inflammatory fibroblasts promote monocyte transition into myeloid fibroblasts via an IL-6-dependent mechanism in the aging mouse heart. **FASEB Journal** v. 29, n. 8, p. 3160–3170 , 2015.
- CIONI, Laura et al. Activity and expression of semicarbazide-sensitive benzylamine oxidase in a rodent model of diabetes: Interactive effects with methylamine and alpha-aminoguanidine. **European Journal of Pharmacology** v. 529, n. 1–3, p. 179–187 , 2006.
- COCKROFT, K. M. et al. Cerebroprotective Effects of Aminoguanidine in a Rodent Model of Stroke. **Stroke** v. 27, n. 8, p. 1393–1398 , 1996.
- COGNI, Ana Lucia et al. Metalloproteinases-2 and -9 predict left ventricular remodeling after myocardial infarction. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia** v. 100, n. 4, p. 315–21 , 2013.
- COKER, M L et al. Matrix metalloproteinase expression and activity in isolated myocytes after neurohormonal stimulation. **American Journal Of Physiology. Heart And Circulatory Physiology** v. 281, n. 2, p. H543-51 , 2001.
- COKER, Mytsi L et al. Matrix metalloproteinase synthesis and expression in isolated LV myocyte preparations. **The American Journal of Physiology** v. 277, n. 2, p. 777–787 , 1999.
- COLZANI, Mara et al. Reactivity, Selectivity, and Reaction Mechanisms of Aminoguanidine, Hydralazine, Pyridoxamine, and Carnosine as Sequestering Agents of Reactive Carbonyl Species: A Comparative Study. **ChemMedChem** v. 11, n. 16, p. 1778–1789 , 2016.
- COOTE, J.H.; CHAUHAN, R.A. The sympathetic innervation of the heart: important new insights. **Autonomic Neuroscience** v. 199, p. 17–23 , 2016.
- CORMAN, B et al. Aminoguanidine prevents age-related arterial stiffening and cardiac hypertrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 95, n. 3, p. 1301–6 , 1998.
- COSTA, Cintia Danieli Ferreira Da. **Atividade vasorelaxante e anti-hipertensiva de LQM01, um novo derivado aminoguanidínico, em ratos espontaneamente hipertensos**. 2017. 77 p., Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas - Maceió, AL, 2017.
- COUTINHO, Thais et al. Sex Differences in the Associations of Hemodynamic Load With Left Ventricular Hypertrophy and Concentric Remodeling. **American Journal of Hypertension** v. 29, n. 1, p. 1–8 , 2015.

CURTIS, Jessica M. et al. Protein carbonylation and metabolic control systems. **Trends in Endocrinology and Metabolism** v. 23, n. 8, p. 399–406 , 2012.

CUTRONEO, Kenneth R. TGF- β -induced fibrosis and SMAD signaling: oligo decoys as natural therapeutics for inhibition of tissue fibrosis and scarring. **Wound Repair and Regeneration** v. 15, p. 54-60, 2007.

DA CUNHA, Natalia Veronez et al. iNOS inhibition improves autonomic dysfunction and oxidative status in hypertensive obese rats. **Clinical and Experimental Hypertension** v. 39, n. 1, p. 50–57 , 2017.

DAI, Wen-Jun et al. Alterations in cardiac structure and function in a modified rat model of myocardial hypertrophy. **Journal of Huazhong University of Science and Technology** v. 34, n. 5, p. 626–633 , 2014.

DATTILO, Brian M et al. The Extracellular Region of the Receptor for Advanced Glycation End Products is Comprised of Two Independent Structural Units. **Biochemistry**. v. 46, n. 23, p. 6957–70 , 2007.

DAWES, Timothy J W et al. Ventricular Structure and Function Moderate Physical Activity in Healthy Adults Is Associated With Cardiac Remodeling. **Circulation Cardiovascular Imaging** v. 9, p. 1–8 , 2016.

DE FELICE, Fernanda G. et al. A β oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. **Journal of Biological Chemistry** v. 282, n. 15, p. 11590–11601 , 2007.

DELEON-PENNELL, Kristine Y. et al. The circular relationship between matrix metalloproteinase (MMP)-9 and inflammation following myocardial infarction. **IUBMB Life** v. 67, n. 8, p. 611–618 , 2015.

DESAI, KAMALAKAR et al. Diabetic Autonomic Neuropathy Detection By Heart-Rate Variability Power-Spectral Analysis. **Journal of Mechanics in Medicine and Biology** v. 12, n. 3, p. 1-22, 2012.

DEVENDRAN, Neranjani et al. GERD and obesity: is the autonomic nervous system the missing link? **Critical reviews in biomedical engineering** v. 42, n. 1, p. 17–24 , 2014.

DHANARAJ, V et al. X-ray structure of gelatinase a catalytic domain complexed with a hydroxamate inhibitor. **Croatica Chemica Acta** v. 72, n. 2–3, p. 575–591 , 1999.

DHAR, Arti et al. Methylglyoxal scavengers attenuate endothelial dysfunction induced by methylglyoxal and high concentrations of glucose. **British Journal of Pharmacology** v. 161, n. 8, p. 1843–1856 , 2010.

DHAR, Indu et al. Increased Methylglyoxal Formation with Upregulation of Renin Angiotensin System in Fructose Fed Sprague Dawley Rats. **PLoS ONE** v. 8, n. 9, p. 3–9 , 2013.

DHAR, Indu et al. Methylglyoxal, a reactive glucose metabolite, increases renin angiotensin aldosterone and blood pressure in male sprague-dawley rats. **American Journal of Hypertension** v. 27, n. 3, p. 308–316 , 2014.

DI NASO, Fabio Cangeri et al. Aminoguanidina reduz o estresse oxidativo e as alterações estruturais pulmonares em diabetes mellitus experimental. **Jornal Brasileiro de Pneumologia** v. 36, n. 4, p. 485–489 , 2010.

DIMITROPOULOS, Gerasimos; TAHRANI, Abd a; STEVENS, Martin J. Cardiac autonomic neuropathy in patients with diabetes mellitus. **World Journal of Diabetes** v. 5, n. 1, p. 17–39 , 2014.

DOBSÁK, P. et al. Antioxidant properties of aminoguanidine: a paramagnetic resonance test. **Scripta Medica** v. 74, p. 45–50 , 2001.

DOCAMPO, María José et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and membrane-type 1 matrix metalloproteinase in melanocytic tumors of dogs and canine melanoma cell lines. **American Journal of Veterinary Research** v. 72, n. 8, p. 1087–1096 , 2011.

DUERRSCHMID, Clemens et al. Tumor necrosis factor: A mechanistic link between angiotensin-II-induced cardiac inflammation and fibrosis. **Circulation: Heart Failure** v. 8, n. 2, p. 352–361 , 2015.

DUNLEVY, J R; COUCHMAN, J R. Interleukin-8 induces motile behavior and loss of focal adhesions in primary fibroblasts. **Journal of Cell Science** v. 321, p. 311–321 , 1995.

EFENDIEV, Riad; DESSAUER, Carmen W. AKAPs and adenylyl cyclase in cardiovascular physiology and pathology. **Journal Cardiovascular Pharmacology** v. 58, n. 4, p. 339–344 , 2011.

ELIAS, Ryan J.; MCCLEMENTS, D. Julian; DECKER, Eric A. Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase α -lactoglobulin in oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 53, n. 26, p. 10248–10253 , 2005.

ELLIS, Eileen N.; GOOD, Barry H. Prevention of glomerular basement membrane thickening by aminoguanidine in experimental diabetes mellitus. **Metabolism** v. 40, n. 10, p. 1016–1019 , 1991.

ESMAEILI, Mohammad Ali; SONBOLI, Ali. Antioxidant, free radical scavenging activities of *Salvia brachyantha* and its protective effect against oxidative cardiac cell injury. **Food and Chemical Toxicology** v. 48, n. 3, p. 846–853 , 2010.

FAGERMOEN, Even et al. Effects of low-dose clonidine on cardiovascular and autonomic variables in adolescents with chronic fatigue: a randomized controlled trial. **BMC Pediatrics** v. 15, p. 117 , 2015.

FAN, Dong et al. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. **Fibrogenesis & Tissue Repair** v. 5, n. 1, p. 15 , 2012.

FAN, Xiaofang et al. Cardiac β 2-Adrenergic Receptor Phosphorylation at Ser355/356 Regulates Receptor Internalization and Functional Resensitization. **Plos One** v. 11, n. 8, p. 1–15, 2016.

FATAHALA, Samar Said et al. A Promising Anti-Cancer and Anti-Oxidant Agents Based on the Pyrrole and Fused Pyrrole: Synthesis, Docking Studies and Biological Evaluation. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry** v. 15, n. 4, p. 517–526 , 2015.

FEIGIN, Valery L. et al. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet** v. 383, n. 9913, p. 245–255 , 2014.

FENG, Yiqing et al. Solution structure and backbone dynamics of the catalytic domain of matrix metalloproteinase-2 complexed with a hydroxamic acid inhibitor. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics** v. 1598, n. 1–2, p. 10–23 , 2002.

FERNANDES, Eduarda et al. In vitro scavenging activity for reactive oxygen and nitrogen species by nonsteroidal anti-inflammatory indole, pyrrole, and oxazole derivative drugs. **Free Radical Biology and Medicine** v. 37, n. 11, p. 1895–1905 , 2004.

FERNANDO, Lanás; PAMELA, Serón; ALEJANDRA, Lanás. Cardiovascular disease in latin america: The growing epidemic. **Progress in Cardiovascular Diseases** v. 57, n. 3, p. 262–267 , 2014.

FERTIN, Marie et al. Serum MMP-8: A Novel Indicator of Left Ventricular Remodeling and Cardiac Outcome in Patients after Acute Myocardial Infarction. **PLoS ONE** v. 8, n. 8, p. 1–6 , 2013.

FIEDLER, Beate; WOLLERT, Kai C. Interference of antihypertrophic molecules and signaling pathways with the Ca²⁺-calcineurin-NFAT cascade in cardiac myocytes. **Cardiovascular Research** v. 63, n. 3, p. 450–457 , 2004.

FLORES-PLIEGO, Arturo et al. Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) is an endogenous activator of the MMP-9 secreted by placental leukocytes: Implication in human labor. **PLoS ONE** v. 10, n. 12, p. 1–14 , 2015.

FONTANA, Vanessa et al. Consistent Alterations of Circulating Matrix Metalloproteinases Levels in Untreated Hypertensives and in Spontaneously Hypertensive Rats: A Relevant Pharmacological Target. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology** v. 109, n. 2, p. 130–137 , 2011.

FORBES, Josephine M et al. Advanced Glycation End Product Interventions Reduce Diabetes-Accelerated Atherosclerosis. **Diabetes** v. 53, n. 3, p. 1813–1823 , 2004.

FOX, Jay B. Jr. Kinetics and mechanisms of the Griess reaction. **Analytical Chemistry** v. 51, n. 9, p. 1493–1502 , 1979.

FRAGA, Carlos Alberto Manssour. Drug hybridization strategies: before or after lead identification?. **Expert Opinion on Drug Discovery** v. 4, n. 6, p. 605–609 , 2009.

FRANCA, Paulo H B et al. Preliminary in vitro evaluation of the anti-proliferative activity of guanylhydrazone derivatives. **Acta Pharmaceutica** v. 66, n. 1, p. 129–137 , 2016.

FRANGOIANNIS, Nikolaos G. Interleukin-1 in cardiac injury, repair, and remodeling: pathophysiologic and translational concepts. **Discoveries (Craiova)** NULL, v. 3, n. 1, p. 1–14 , 2015.

FREEDMAN, Barry I. et al. Design and baseline characteristics for the aminoguanidine clinical trial in overt type 2 diabetic nephropathy (ACTION II). **Controlled Clinical Trials** v. 20, n. 5, p. 493–510 , 1999.

FREELING, Jessica L.; LI, Yifan. Age-related attenuation of parasympathetic control of the heart in mice. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology** v. 7, n. 3, p. 126–135 , 2015.

FREY, N.; OLSON, E.N. Cardiac Hypertrophy: The Good, the Bad, and the Ugly. **Annual Review of Physiology** v. 65, n. 1, p. 45–79 , 2003.

FRIESE, Ryan S et al. Matrix metalloproteinases: discrete elevations in essential hypertension and hypertensive end-stage renal disease. **Clinical and Experimental Hypertension** v. 31, n. 7, p. 521–533 , 2009.

FRITZ, Kristofer S.; PETERSEN, Dennis R. An overview of the chemistry and biology of reactive aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine** v. 59, p. 85–91 , 2013..

FRITZ, Kristofer S.; PETERSEN, Dennis R. Exploring the biology of lipid peroxidation-derived protein carbonylation. **Chemical Research in Toxicology** v. 24, n. 9, p. 1411–1419 , 2011.

FROHLICH, Edward D; SUSIC, Dinko. Pressure Overload. **Heart Failure Clinics**v. 8, n. 1, p. 21–32 , 2012.

FURNIVAL, CM; LINDEN, RJ; SNOW, HM. The inotropic and chronotropic effects of catecholamines on the dog heart. **The Journal of Physiology** v. 214, p. 15–28 , 1971.

FURTADO, Milena B et al. View from the heart: cardiac fibroblasts in development, scarring and regeneration. **Development** v. 143, n. 3, p. 387–397 , 2016.

FURTADO, Milena B.; COSTA, Mauro W.; ROSENTHAL, Nadia A. The cardiac fibroblast: Origin, identity and role in homeostasis and disease. **Differentiation** NULL, v. 92, n. 3, p. 93–101 , 2016.

GAASCH, W H; ZILE, M R. Left Ventricular structural remodeling in health and disease with special emphasis on volume, mass, and geometry. **Journal of the American College of Cardiology** v. 58, n. 17, p. 1733–1740 , 2011.

GABAY, Cem. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Research & Therapy**NULL, v. 8, n. 2, p. 1-6 , 2006.

GAFFNEY, Jean et al. Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. **Matrix Biology** n. Ldl , 2015.

GAGGAR, Amit; WEATHINGTON, Nathaniel. Bioactive extracellular matrix fragments in lung health and disease. **Journal of Clinical Investigation** v. 126, n. 9, p. 3176–3184 , 2016.

GAIKWAD, Priyanka L et al. The Use of Bioisosterism in Drug Design and Molecular Modification. **American Journal of PharmTech Research** v. 2, n. 4, p. 1–23 , 2012.

GAO, Xue et al. AGE/RAGE produces endothelial dysfunction in coronary arterioles in type 2 diabetic mice. **American Journal of Physiology** v. 295, n. 2, p. 491–498 , 2008.

GARCIA-SALDIVIA, Marianna et al. Left ventricular geometry and matrix metalloproteinases 2 and 9 in chronic Chagas heart disease. **International Journal of Cardiology** v. 176, n. 2, p. 565–566 , 2014.

GARCIA-SALDIVIA, Marianna et al. Metalloproteinases 2 and 9 in different stages of chronic Chagas disease. **International Journal of Cardiology** v. 179, p. 79–81 , 2015..

GARCIA, Vinicius P. et al. Exogenous L-arginine reduces matrix metalloproteinase-2 and -9 activities and oxidative stress in patients with hypertension. **Life Sciences** v. 157, p. 125–130 , 2016.

GARG, Monika; KHANNA, Deepa. Exploration of pharmacological interventions to prevent isoproterenol-induced myocardial infarction in experimental models. **Therapeutic advances in cardiovascular disease** v. 8, n. 4, p. 155–169 , 2014. GARG, Sonia; DRAZNER, Mark H. Refining the classification of left ventricular hypertrophy to provide new insights into the progression from hypertension to heart failure. **Current Opinion in Cardiology** v. 31, n. 4, p. 387–393 , 2016.

GAWRYSZEWSKI, Vilma Pinheiro; SOUZA, Maria De Fatima Marinho De. Mortality due to cardiovascular diseases in the Americas by region, 2000-2009. **São Paulo Medical Journal** v. 132, n. 2, p. 105–110 , 2014.

GENESTET, Charlotte et al. Scavenging of reactive oxygen species by tryptophan metabolites helps *Pseudomonas aeruginosa* escape neutrophil killing. **Free Radical Biology and Medicine** v. 73, n. July, p. 400–410 , 2014.

GERARDUZZI, Casimiro; DI BATTISTA, John A. Myofibroblast repair mechanisms post-inflammatory response: a fibrotic perspective. **Inflammation Research** , 2016.

GIANNAKOS, E. et al. Changes in activities of circulating MMP-2 and MMP-9 in patients suffering from heart failure in relation to gender, hypertension and treatment: A cross-sectional study. **Physiological Research** v. 65, p. S149–S152 , 2016.

GIRALDEZ, R R; ZWEIER, J L. An improved assay for measurement of nitric oxide synthase activity in biological tissues. **Analytical Biochemistry** v. 261, p. 29–35 , 15 jul. 1998.

GOHLKE, U et al. The C-Terminal (Hemopexin-Like) Domain-Structure of Human Gelatinase-A (Mmp2) - Structural Implications for Its Function. **FEBS Letters** v. 378, n. 2, p. 126–130 , 1996.

GOLDBERG, Mytien T et al. TNF-alpha suppresses alpha-smooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing. **The Journal of Investigative Dermatology** v. 127, n. 11, p. 2645–55 , 2007.

GOLDSTEIN, Sidney; ALI, Abbas S; SABBAH, Hani. Ventricular Remodeling: mechanisms and Prevention. **Cardiology Clinics** p. 623–632 , 1998.

GOMORI, G. A rapid one-step trichrome stain. **American Journal of clinical Pathology** v. 20, n. 7, p. 661–4, 1950.

GOODARZI, MohammadTaghi et al. Aminoguanidine partially prevents the reduction in liver pyruvate kinase activity in diabetic rats. **Advanced Biomedical Research** v. 3, n. 1, p. 260, 2014.

GOURINE, Alexander V. et al. Cardiac vagal preganglionic neurones: An update. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical** v. 199, p. 24–28, 2016.

GUILLON, Christophe D et al. N ω -Nitro-N ω '-Substituted Guanidines : A Simple Class of Nitric Oxide Synthase Inhibitors. **Modern Research in Inflammation** v. 3, p. 48–58, 2014.

GUO, Y et al. Neutrophil elastase ameliorates matrix metalloproteinase-9 to promote lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice 1. **Acta Cir Bras** v. 31, n. 6, p. 382–388, 2016.

GUPTA, Ruby et al. Improved method of total antioxidant assay. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics** v. 46, n. 1, p. 126–129, 2009.

GURANTZ, Devorah et al. IL-1 β and TNF- α upregulate angiotensin II type 1 (AT1) receptors on cardiac fibroblasts and are associated with increased AT1 density in the post-MI heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** v. 38, n. 3, p. 505–15, 2005.

GURANTZ, Devorah et al. Tumor Necrosis Factor- α upregulates angiotensin II type 1 receptors on cardiac fibroblasts. **Circulation Research** v. 85, p. 272–279, 1999.

HAFEZ, Heba M. et al. Potential protective effect of etanercept and aminoguanidine in methotrexate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. **European Journal of Pharmacology** v. 768, p. 1–12, 2015.

HAFT, Jacob I. Cardiovascular injury induced by sympathetic catecholamines. **Progress in Cardiovascular Diseases** v. 17, n. 1, p. 73–86, 1974.

HALL, Margaret Jean; LEVANT, Shaleah; DEFRANCES, Carol J. Hospitalization for congestive heart failure: United States, 2000–2010. **National Center for Health Statistics** n. 108, p. 8, 2012.

HAMMES, H P et al. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 88, n. 24, p. 11555–11558, 1991.

HAN, Sang-Oh; KOMMADDI, Reddy P; SHENOY, Sudha K. Distinct roles for β -arrestin2 and arrestin-domain-containing proteins in β 2 adrenergic receptor trafficking. **EMBO Reports** v. 14, n. 2, p. 164–71, 2013.

HAO, Guangzhi et al. Rutin Inhibits Neuroinflammation and Provides Neuroprotection in an Experimental Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage, Possibly Through Suppressing the RAGE-NF- κ B Inflammatory Signaling Pathway. **Neurochemical Research** v. 41, n. 6, p. 1496–1504, 2016.

HAO, J et al. Elevation of expression of Smads 2, 3, and 4, decorin and TGF-beta in the chronic phase of myocardial infarct scar healing. **Journal of Molecular And Cellular Cardiology** v. 31, n. 3, p. 667–78 , 1999.

HARRIS, Cory S. et al. Investigating wild berries as a dietary approach to reducing the formation of advanced glycation endproducts: chemical correlates of in vitro antiglycation activity. **Plant Foods for Human Nutrition** v. 69, n. 1, p. 71–77 , 2014.

HASHEM, M-sherif et al. Left ventricular relative wall thickness versus left ventricular mass index in non-cardioembolic. **Medicine** v. 94, n. 20, p. 1–5 , 2015.

HASHIMOTO, Junichiro et al. Therapeutic effects of evening administration of guanabenz and clonidine on morning hypertension: evaluation using home-based blood pressure measurements. **Journal of Hypertension** v. 21, n. 4, p. 805–11 , 2003.

HEAD, Geoffrey A.; CHAN, Candy K S; BURKE, Sandra L. Relationship between imidazoline and α 2-adrenoceptors involved in the sympatho-inhibitory actions of centrally acting antihypertensive agents. **Journal of the Autonomic Nervous System** v. 72, n. 2–3, p. 163–169 , 1998.

HEGER, J.; SCHULZ, R.; EULER, G. Molecular switches under TGF-beta signalling during progression from cardiac hypertrophy to heart failure. **British Journal of Pharmacology** v. 173, n. 1, p. 3–14 , 2016.

HEIN, Stefan et al. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human: Heart structural deterioration and compensatory mechanisms. **Circulation** v. 107, n. 7, p. 984–991 , 2003.

HERRMANN, Keith L; MCCULLOCH, Andrew D; OMENS, Jeffrey H. Glycated collagen cross-linking alters cardiac mechanics in volume-overload hypertrophy. **American Journal of Physiology** v. 284, n. 4, p. 1277-1284 , 2003.

HISATSUNE, Chihiro et al. Amplification of Ca^{2+} signaling by diacylglycerol-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. **Journal of Biological Chemistry** v. 280, n. 12, p. 11723–11730 , 2005.

HOGUE, J et al. IL-6 controls the innate immune response against *Listeria monocytogenes* via classical IL-6 signaling. **Journal of Immunology** v. 190, n. 2, p. 703–711 , 2013.

HOLMES, Barbara et al. Guanabenz: A Review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in hypertension. **Drugs** v. 26, n. 3, p. 212–229 , 1983.0012-6667.

HORI, Yasutomo et al. Doxycycline attenuates isoproterenol-induced myocardial fibrosis and matrix metalloproteinase activity in rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin** v. 32, n. 10, p. 1678–82 , 2009.

HORN, Margaux A. et al. Age-related divergent remodeling of the cardiac extracellular matrix in heart failure: Collagen accumulation in the young and loss in the aged. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** v. 53, n. 1, p. 82–90 , 2012.

HOUSER, Steven R et al. Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. **Circulation Research** v. 111, p. 131–50, 2012.

HU, Juan et al. Activin A stimulates the proliferation and differentiation of cardiac fibroblasts via the ERK1/2 and p38-MAPK pathways. **European Journal of Pharmacology** v. 789, p. 319–327, 2016.

HUANG, Chien Fu et al. Aminoguanidine attenuates hypertension, whereas 7-nitroindazole exacerbates kidney damage in spontaneously hypertensive rats: The role of nitric oxide. **European Journal of Pharmacology** v. 699, n. 1–3, p. 233–240, 2013.

HUGHES, Bryan G.; SCHULZ, Richard. Targeting MMP-2 to treat ischemic heart injury. **Basic Research in Cardiology** v. 109, n. 4, 2014.

HUIJBERTS, M. S P et al. Aminoguanidine treatment increases elasticity and decreases fluid filtration of large arteries from diabetic rats. **Journal of Clinical Investigation** v. 92, n. 3, p. 1407–1411, 1993.

HWANG, S H et al. Rationally designed multitarget agents against inflammation and pain. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 13, p. 1783–1799, 2013.

IRIE, Tomoya et al. S-nitrosylation of calcium-handling proteins in cardiac adrenergic signaling and hypertrophy. **Circulation Research** v. 117, n. 9, p. 793–803, 2015.

ISHIHARA, Katsuya et al. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site. **FEBS Letters** v. 550, n. 1–3, p. 107–113, 2003.

ISLAM, Md Shofikul et al. Elevated concentrations of serum matrix metalloproteinase-2 and -9 and their associations with circulating markers of cardiovascular diseases in chronic arsenic-exposed individuals. **Environmental Health** v. 14, n. 1, p. 92, 2015.

IVEY, Malina J.; TALLQUIST, Michelle D. Defining the Cardiac Fibroblast. **Circulation Journal** NULL, v. 80, n. November, 2016..

IYER, Rugmani Padmanabhan; JUNG, Mira; LINDSEY, Merry L. MMP-9 signaling in the left ventricle following myocardial infarction. **American Journal of Physiology** v. 311, n. 1, p. H190–H198, 2016.

JACOB-FERREIRA, Anna L.; SCHULZ, Richard. Activation of intracellular matrix metalloproteinase-2 by reactive oxygen-nitrogen species: Consequences and therapeutic strategies in the heart. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v. 540, n. 1–2, p. 82–93, 2013.

JACOBS, M et al. Tumor necrosis factor-alpha at acute myocardial infarction in rats and effects on cardiac fibroblasts. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** NULL, v. 31, p. 1949–1959, 1999.

JAHANI-ASL, A.; BONNI, A. iNOS: a potential therapeutic target for malignant glioma. **Current Molecular Medicine** v. 13, n. 8, p. 1241–1249, 2013.

JALKANEN, S.; SALMI, M. Cell surface monoamine oxidases: Enzymes in search of a function. **EMBO Journal** v. 20, n. 15, p. 3893–3901, 2001.

- JAROCK, Joanna et al. The relationship of carotid arterial stiffness and left ventricular concentric hypertrophy. **Advances in Clinical and Experimental Medicine** v. 25, n. 2, p. 263–272 , 2016.
- JEAN-CHARLES, Pierre Yves; RAJIV, Vishwaesh; SHENOY, Sudha K. Ubiquitin-related roles of β -arrestins in endocytic trafficking and signal transduction. **Journal of Cellular Physiology** v. 231, n. 10, p. 2071–2080 , 2016.
- JENSEN, T. M. et al. Methylglyoxal is associated with changes in kidney function among individuals with screen-detected Type 2 diabetes mellitus. **Diabetic Medicine** v. 33, n. 12, p. 1625–1631 , 2016.
- JIN, Xia; MCGRATH, Michael S; XU, Hua. Inhibition of HIV Expression and Integration in Macrophages by Methylglyoxal-Bis-Guanylhydrazone. **Journal of Virology** v. 89, n. 22, p. 11176–11189 , 2015.
- JURANEK, Judyta K. et al. Soluble RAGE Treatment Delays Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis in SOD1 Mice. **Frontiers in Cellular Neuroscience** v. 10, n. May, p. 1–9 , 2016.
- KA, Hyejung et al. Evaluation of Antioxidant or Prooxidant Properties of Selected Amino Acids Using In Vitro Assays and in Oil-in-Water Emulsions Under Riboflavin Sensitization. **Journal of Food Science** v. 81, n. 5, p. C1118–C1123 , 2016
- KALÁSZ, Huba. Biological role of formaldehyde, and cycles related to methylation, demethylation, and formaldehyde production. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry** v. 3, n. 36, p. 175–192 , 2003.
- KALGUTKAR, Amit S. et al. Intrinsic electrophilicity of a 4-substituted-5-cyano-6-(2-methylpyridin-3- yloxy)pyrimidine derivative: Structural characterization of glutathione conjugates in vitro. **Chemical Research in Toxicology** v. 24, n. 2, p. 269–278 , 2011.
- KAMO, Takehiro; AKAZAWA, Hiroshi; KOMURO, Issei. Cardiac nonmyocytes in the hub of cardiac hypertrophy. **Circulation Research** v. 117, n. 1, p. 89–98 , 2015.
- KAMP, T. J.; HELL, J. W. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. **Circulation Research** v. 87, n. 12, p. 1095–1102 , 2000.
- KAPILOFF, Michael S et al. An adenylyl cyclase-mAKAPbeta signaling complex regulates cAMP levels in cardiac myocytes. **The Journal of Biological Chemistry** v. 284, n. 35, p. 23540–6 , 2009.
- KARAMITSOS, Theodoros D. Vascular and myocardial fibrosis in diabetes mellitus. **Cardiology** v. 114, n. 2, p. 105–106 , 2009.
- KATZ, Daniel H et al. Prevalence, clinical characteristics, and outcomes associated with eccentric versus concentric ventricular left ventricular hypertrophy in heart failure with preserved ejection fraction. **American Journal of Cardiology** v. 112, n. 8, p. 1158–1164 , 2013.
- KAZACHKOV, Michael et al. Evidence for in vivo scavenging by aminoguanidine of formaldehyde produced via semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated deamination.

The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics v. 322, n. 3, p. 1201–1207 , 2007.

KERCKHOFFS, Roy C. P.; OMENS, Jeffrey; MCCULLOCH, Andrew D. A single stains-based growth law predicts concentric and eccentric cardiac growth during pressure and volume overload. **Mechanics Research Communications** v. 1, n. 42, p. 40–50 , 2012.

KHANGHOLI, Shahpour et al. The Mechanisms of Inhibition of Advanced Glycation End Products Formation through Polyphenols in Hyperglycemic Condition. **Planta Medica** v. 82, n. 1–2, p. 32–45 , 2015.

KHOR, K. H. et al. Myocardial collagen deposition and inflammatory cell infiltration in cats with pre-clinical hypertrophic cardiomyopathy. **Veterinary Journal** v. 203, n. 2, p. 161–168 , 2015.

KILTS, Jason D et al. β 2-Adrenergic and several other G protein–coupled receptors in human atrial membranes activate both Gs and Gi. **Circulation Research** v. 87, p. 705–709 , 2000.

KIM, Young Hwan et al. Agmatine suppresses peripheral sympathetic tone by inhibiting N-type Ca²⁺ channel activity via imidazoline I₂ receptor activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 477, n. 3, p. 406–412 , 2016.

KIMURA, Takuya; WATANABE, Yoshifumi. Tryptophan protects hepatocytes against reactive oxygen species-dependent cell death via multiple pathways including Nrf2-dependent gene induction. **Amino Acids** v. 48, n. 5, p. 1263–1274 , 2016.

KISHI, Takuya. Heart failure as an autonomic nervous system dysfunction. **Journal of Cardiology** v. 59, n. 2, p. 117–122 , 2012.

KOIKE, Sayo et al. Advanced glycation end-products induce apoptosis of vascular smooth muscle cells: A mechanism for vascular calcification. **International Journal of Molecular Sciences** v. 17, n. 9, p. 1–14 , 2016.

KONDAKÇI, Esin et al. Novel pro-oxidant activity assay for polyphenols, vitamins C and e using a modified CUPRAC method. **Talanta** v. 115, p. 583–589 , 2013.

KOSAR, Feridun et al. Relationship between cytokines and tumour markers in patients with chronic heart failure. **European Journal of Heart Failure** NULL, v. 8, n. 3, p. 270–274 , 2006.

KOSS, Michael C. Analysis of CNC sympatho-inhibition produced by guanabenz. **European Journal of Pharmacology** v. 90, p. 19–27 , 1983.

KOSS, Michael C.; BERNTHAL, Patricia J.; CHANDLER, Margaret J. Use of a sympathetic-cholinergic system in the analysis of sympatho-inhibition produced by clonidine and some congeneric derivatives of clonidine. **European Journal of Pharmacology** v. 87, p. 301–308 , 1983.

KOSTOV, Krasimir et al. Serum concentrations of endothelin-1 and matrix metalloproteinases-2, -9 in pre-hypertensive and hypertensive patients with type 2 diabetes. **International Journal of Molecular Sciences** v. 17, n. 8, p. 1–13 , 2016.

KOYAMA, Hidenori; YAMAMOTO, Hiroshi. RAGE and soluble RAGE: Potential therapeutic targets for cardiovascular diseases. **Molecular Medicine** v. 13, n. 11–12, p. 1 , 2007.

KOYAMA, Hidenori; YAMAMOTO, Hiroshi; NISHIZAWA, Yoshiki. Endogenous secretory RAGE as a novel biomarker for metabolic syndrome and cardiovascular diseases. **Biomarker insights** v. 2, p. 331–9 , 2007.

KUMAGAI, Youichi et al. Coexpression of COX-2 and iNOS in angiogenesis of superficial esophageal squamous cell carcinoma. **International Surgery** v. 100, n. 4, p. 733–743 , 2015.

KURUVILLA, Leena; KARTHA, Cheranellore Chandrasekharan. Treatment with TNF-alpha or bacterial lipopolysaccharide attenuates endocardial endothelial cell-mediated stimulation of cardiac fibroblasts. **Journal of Biomedical Science** v. 16, p. 21 , 2009.

KUSUNOSE, Kenya et al. Regurgitant volume informs rate of progressive cardiac dysfunction in asymptomatic patients with chronic aortic or mitral regurgitation. **JACC: Cardiovascular Imaging** v. 8, n. 1, p. 14–23 , 2015.

KWAN, Gene F et al. Global Burden of Cardiovascular Disease Endemic Cardiovascular Diseases of the Poorest Billion. **Circulation** v. 133, p. 2561–2575 , 2016.

KWON, Jin Sook et al. Regulation of MMP/TIMP by HUVEC transplantation attenuates ventricular remodeling in response to myocardial infarction. **Life Sciences** v. 101, n. 1–2, p. 15–26 , 2014.

LAFIONIATIS, Anastasios et al. Effects of the inducible nitric oxide synthase inhibitor aminoguanidine in two different rat models of schizophrenia. **Behavioural Brain Research** v. 309, p. 14–21 , 2016.

LANG, Roberto M et al. Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults : An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. **Journal of the American Society of Echocardiography** v. 28, n. 1, p. 1–39.e14 , 2015.

LATEK, Dorota et al. G protein-coupled receptors — recent advances. **Acta Biochim Pol** v. 59, n. 4, p. 515–529 , 2012.

LE, T Y L; CHONG, J J H. Cardiac progenitor cells for heart repair. **Cell Death Discovery** v. 2, p. 1–4 , 2016.

LEITE, Karla Carneiro de Siqueira. **Caracterização eletroquímica do composto LQFM-091, obtido por hibridação molecular a partir dos protótipos nimesulida e BF-389**. 2015, 44 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Góias – Goiania, GO, 2015.

LI, Man et al. Ca²⁺ signal-induced cardiomyocyte hypertrophy through activation of myocardin. **Gene** v. 557, n. 1, p. 43–51 , 2015.

LI, Min et al. Quercetin provides greater cardioprotective effect than its glycoside derivative rutin on isoproterenol-induced cardiac fibrosis in the rat. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology** v. 91, n. 11, p. 951–959 , 2013.

- LI, Qiong et al. MiR-21/Smad 7 signaling determines TGF- β 1-induced CAF formation. **Scientific reports** v. 3, p. 2038 , 2013.
- LI, Xianchi; ZHANG, Peiying. Genetic determinants of myocardial infarction. **Journal of Medical Genetic** v. 54, p. 1–10 , 2017.
- LI, Ya-Ru et al. Synthesis and biological evaluation of 1,3-diaryl pyrazole derivatives as potential antibacterial and anti-inflammatory agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v. 25, n. 22, p. 5052–5057 , 2015.
- LI, Y M et al. Prevention of cardiovascular and renal pathology of aging by the advanced glycation inhibitor aminoguanidine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 93, n. April, p. 3902–3907 , 1996.
- LIEBER, Eugene; SMITH, G. B. L. The chemistry of aminoguanidine and related substances. **Chemical Reviews** v. 25, n. 2, p. 213–271 , 1939.
- LIM, Stephen S et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet** v. 380, n. 9859, p. 2224–2260 , 2012.
- LIMA, Lídia M. Química medicinal moderna: Desafios e contribuição Brasileira. **Quimica Nova** v. 30, n. 6, p. 1456–1468 , 2007.
- LIMONARD, E. J. et al. Clonidine increases bone resorption in humans. **Osteoporosis International** v. 27, n. 3, p. 1063–1071 , 2016.
- LIN, Chih-Chung et al. Tumor necrosis factor-alpha induces VCAM-1-mediated inflammation via c-Src-dependent transactivation of EGF receptors in human cardiac fibroblasts. **Journal of Biomedical Science** v. 22, n. 1, p. 53 , 2015.
- LIN, Chih Chung et al. NADPH oxidase/ROS-dependent VCAM-1 induction on TNF-alpha-challenged human cardiac fibroblasts enhances monocyte adhesion. **Frontiers in Pharmacology** v. 6, n. JAN, p. 1–16 , 2016.
- LIN, George Guan-hua; SCOTT, Jeffrey G. G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. **Pharmacology & Therapeutics** v. 133, n. 1, p. 130–134 , 2012.
- LIN, Hairuo et al. HMGB1-RAGE axis makes no contribution to cardiac remodeling induced by pressure-overload. **Plos One** v. 11, n. 6, p. e0158514 , 2016.
- LINDNER, Diana et al. Differential expression of matrix metalloproteases in human fibroblasts with different origins. **Biochemistry Research International** v. 2012 , 2012.
- LINDSEY, Merry L. et al. A novel collagen matricryptin reduces left ventricular dilation post-myocardial infarction by promoting scar formation and angiogenesis. **Journal American of Collegy Cardiology** v. 66, n. 12, p. 1364–1374 , 2015.

LISSILAA, Rami et al. Although IL-6 transsignaling is sufficient to drive local immune responses, classical IL-6 signaling is obligatory for the induction of T cell-mediated autoimmunity. **The Journal of Immunology** p. 5512–5521, 2010.

LIU, Lan-Xiang et al. Synthesis and antitumor activity of novel N-substituted carbazole imidazolium salt derivatives. **Scientific Reports** v. 5, p. 13101, 2015.

LIU, Yu et al. Blockade of receptor for advanced glycation end products protects against systolic overload-induced heart failure after transverse aortic constriction in mice. **European Journal of Pharmacology** v. 791, p. 535–543, 2016.

LIU, Yuchuan et al. Volume overload induces differential spatiotemporal regulation of myocardial soluble guanylyl cyclase in eccentric hypertrophy and heart failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** v. 60, p. 72–83, 2013.

LO, Theodore W C; SELWOOD, Trevor; THORNALLEY, Paul J. The reaction of methylglyoxal with aminoguanidine under physiological conditions and prevention of methylglyoxal binding to plasma proteins. **Biochemical Pharmacology** v. 48, n. 10, p. 1865–1870, 1994.

LOHSE, Martin J et al. β -arrestin: a protein that regulates β -adrenergic receptor function. **Science** v. 248, p. 1547–1550, 1990.

LOMIVOROTOV, Vladimir V. et al. Low-cardiac-output syndrome after cardiac surgery. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia** p. 1–18, 2016.

LUGRIN, Jérôme et al. Cutting Edge: IL-1 α is a crucial danger signal triggering acute myocardial inflammation during myocardial infarction. **Journal of Immunology** v. 194, n. 2, p. 499–503, 2015.

LYMPEROPOULOS, A; RENGO, G; KOCH, W J. GRK2 inhibition in heart failure: something old, something new. **Curr Pharm Des** v. 18, n. 2, p. 186–191, 2012.

MA, Feifei et al. Macrophage-stimulated cardiac fibroblast production of IL-6 is essential for TGF- β /Smad activation and cardiac fibrosis induced by angiotensin II. **PLoS One** v. 7, n. 5, p. 1–9, 2012.

MA, XiaoWei et al. Distinct actions of intermittent and sustained β -adrenoceptor stimulation on cardiac remodeling. **Science China Life Sciences** v. 54, n. 6, p. 493–501, 2011..

MA, Yonggang et al. Myofibroblasts and the extracellular matrix network in post-myocardial infarction cardiac remodeling. **Pflugers Archiv - European Journal of Physiology** v. 466, n. 6, p. 1113–1127, 2014.

MAASS, Alexander H et al. Hypertrophy, fibrosis and sudden cardiac death in response to pathological stimuli in mice with mutations in cardiac troponin T. **Circulation** v. 110, p. 2102–2109, 2004.

MACIVER, David H.; CLARK, Andrew L. Contractile dysfunction in sarcomeric hypertrophic cardiomyopathy. **Journal of Cardiac Failure** v. 22, n. 9, p. 731–737, 2015.

MAJOR, Jennifer L.; SALIH, Maysoon; TUANA, Balwant S. Interplay between the E2F pathway and β -adrenergic signaling in the pathological hypertrophic response of myocardium. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** v. 84, p. 179–190 , 2015.

MANGGE, H. et al. Disturbed tryptophan metabolism in cardiovascular disease. **Current Medicinal Chemistry** v. 21, n. 17, p. 1931–1937 , 2014.

MANIVASAGAM, Senthamizharasi et al. Differential expression and regulation of anti-hypertrophic genes *Npr1* and *Npr2* during β -adrenergic receptor activation-induced hypertrophic growth in rats. **Molecular and Cellular Endocrinology** v. 433, p. 117–129 , 2016.

MARCHESE, Adriano; TREJO, JoAnn. Ubiquitin-dependent regulation of G protein-coupled receptor trafficking and signaling. **Cellular Signalling** v. 25, n. 3, p. 707–716 , 2013.

MATHERS, Colin D; LONCAR, Dejan. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. **PLoS Medicine** v. 3, n. 11, p. e442 , 2006.

MATSUKAWA, Kanji. Central command: control of cardiac sympathetic and vagal efferent nerve activity and the arterial baroreflex during spontaneous motor behaviour in animals. **Experimental Physiology** v. 97, n. 1, p. 20–28 , 2012.

MAULIK, Subir Kumar et al. Genistein prevents isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology** v. 90, n. 8, p. 1117–25 , 2012.

MAYA, Lisandro; VILLARREAL, Francisco J. Diagnostic approaches for diabetic cardiomyopathy and myocardial fibrosis. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** v. 48, n. 3, p. 524–529 , 2010.

MCHELS, Joan A; CALHOUN, Millard C; WRISTON, John C. Oxidation of formaldehyde in the presence of aminoguanidine. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 59, p. 408–413 , 1962.

MCMULLEN, Julie R.; JENNINGS, Garry L. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: Novel therapeutic strategies to treat heart failure. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** v. 34, p. 255–262 , 2007.

MCQUEEN, R Brett et al. Incremental increases in economic burden of cardiometabolic risk factors in the US. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy** v. 9, p. 233–241 , 2016.

MELERO, C P et al. Hydroindenyl-guanylhydrazones. Synthesis and evaluation as inotropic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v. 8, n. 22, p. 3217–3222 , 1998.

MENDIS. Shanthi et al. **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. World Health Organization [S.l: s.n.], 2014.

METELKA, R. Heart rate variability - current diagnosis of the cardiac autonomic neuropathy. A review. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub** v. 158, n. 3, p. 327–338 , 2014.

MIAO, Yinglong; MCCAMMON, J Andrew. G-protein coupled receptors: advances in simulation and drug discovery. **Current Opinion in Structural Biology** v. 41, p. 83–89 ,

2016.

MILLERON, O et al. Eclipsed mitral regurgitation: an unusual cause of acute heart failure. **European Heart Journal Cardiovascular Imaging** p. 1–7 , 2016.

MISKO, Thomas P. et al. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. **European Journal of Pharmacology** v. 233, n. 1, p. 119–125 , 1993.

MIYASHITA, Mitsuhiro et al. The regulation of soluble receptor for AGEs contributes to carbonyl stress in schizophrenia. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 479, n. 3, p. 447–452 , 2016.

MOHAMED, Belal A et al. Proteomic analysis of short-term preload-induced eccentric cardiac hypertrophy. **Journal of Translational Medicine** v. 14, n. 149, p. 1–12 , 2016.

MOISEEVA, E. P. et al. Indole-3-carbinol-induced death in cancer cells involves EGFR downregulation and is exacerbated in a 3D environment. **Apoptosis** v. 11, n. 5, p. 799–812 , 2006.

MOLKENTIN, Jeffery D. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. **Cardiovascular Research** v. 63, n. 3, p. 467–475 , 2004.

MOLYNEUX, Philip. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology** v. 26, p. 211–219 , 2004.

MONNIER, V. M. et al. Collagen browning and cross-linking are increased in chronic experimental hyperglycemia. Relevance to diabetes and aging. **Diabetes** v. 37, n. 7, p. 867–872 , 1988.

MONTERO, D.; DIAZ-CANESTRO, C. Endurance training and maximal oxygen consumption with ageing: Role of maximal cardiac output and oxygen extraction. **European Journal of Preventive Cardiology** , 2015.

MOORE-MORRIS, Thomas et al. Origins of cardiac fibroblasts. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** v. 91, p. 1–5 , 2016.

MORAN, Andrew E. et al. Temporal trends in ischemic heart disease mortality in 21 world regions, 1980 to 2010: The global burden of disease 2010 study. **Circulation** v. 129, n. 14, p. 1493–1501 , 2014.

MORGUNOVA, Ekaterina et al. Structure of Human Pro-Matrix Metalloproteinase-2: Activation Mechanism Revealed. **Science** v. 284, n. 5420, p. 1667–1670 , 1999.

MORIYA, Saori et al. Two soluble isoforms of receptors for advanced glycation end products (RAGE) in carotid atherosclerosis: The difference of soluble and endogenous secretory RAGE. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases** v. 23, n. 10, p. 2540–2546 , 2014.

MOTOKI, Hirohiko et al. Impact of left ventricular diastolic function on left atrial mechanics in systolic heart failure. **The American Journal of Cardiology** v. 112, n. 6, p. 821–6 , 2013.

MOUITHYS-MICKALAD, A M L et al. In vitro study of the antioxidant properties of non steroidal anti-inflammatory drugs by chemiluminescence and electron spin resonance (ESR). **Free Radical Research** v. 33, n. 5, p. 607–621 , 2000.

MOUSSA, Ziad; EL-SHARIEF, Marwa A.M.Sh.; ABBAS, Samir Y. New imidazolidineiminothione derivatives: Synthesis, spectral characterization and evaluation of antitumor, antiviral, antibacterial and antifungal activities. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 122, p. 419–428 , 2016.

MOUSTAKAS, Aristidis; SOUCHELNYTSKYI, Serhiy; HELDIN, Carl-henrik. Smad regulation in TGF- β signal transduction. **Journal of Cell Physiology** v. 114, p. 4359–4369 , 2001.

MUKOHDA, Masashi et al. Long-term methylglyoxal treatment causes endothelial dysfunction of rat isolated mesenteric artery. **Journal of Veterinary Medical Science** v. 75, n. 2, p. 151–157 , 2013.

MUKOHDA, Masashi et al. Methylglyoxal accumulation in arterial walls causes vascular contractile dysfunction in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Pharmacological Sciences** v. 120, p. 26–35 , 2012.

MÜLLER, Julia et al. Interleukin-6-dependent phenotypic modulation of cardiac fibroblasts after acute myocardial infarction. **Basic Research in Cardiology** v. 109, n. 6 , 2014.

MURPHY, Gillian; NAGASE, Hideaki. Progress in matrix metalloproteinase research. **Molecular Aspects of Medicine** v. 29, n. 5, p. 290–308 , 2009.

MUSA ZAMAH, A. et al. Protein kinase A-mediated phosphorylation of the β 2-adrenergic receptor regulates its coupling to Gs and Gi: Demonstration in a reconstituted system. **Journal of Biological Chemistry** v. 277, n. 34, p. 31249–31256 , 2002.

NADRUZ, W. Myocardial remodeling in hypertension. **Journal of Human Hypertension** v. 29, n. 1, p. 1–6 , 2015.

NAGHAVI, Mohsen et al. Europe PMC Funders Group Global, regional , and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death , 1990-2013 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet** v. 385, n. 9963, p. 117–171 , 2015.

NAISMITH, James H. Tryptophan oxygenation: mechanistic considerations. **Biochemical Society Transactions** v. 40, n. 3, p. 509–514 , 2012.

NAKAO, Atsuhito et al. TGF- β receptor-mediated signaling through Smad2, Smad3 and Smad4. **The EMBO Journal** v. 16, n. 17, p. 5353–5362 , 1997.

NAKAZAWA, Harumasa et al. iNOS as a driver of inflammation and apoptosis in mouse skeletal muscle after burn injury: possible involvement of sirt1 s-nitrosylation-mediated acetylation of p65 Nf- κ B and p53. **Plos One** v. 12, n. 1-18, p. , 2017.

NAMIKI, Mitsuo. Chemistry of maillard reactions: recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens. **Advances in Food Research** v. 32, p. 115–184 , 1988.

- NASCIMENTO, Regina A. et al. Metalloproteinase Inhibition Protects against Reductions in Circulating Adrenomedullin during Lead-induced Acute Hypertension. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology** v. 116, n. 6, p. 508–515 , 2015.
- NATARAJAN, Nandini et al. Adherence to antihypertensive medications among family practice patients with diabetes mellitus and hypertension. **Canadian Family Physician** v. 59, n. 2, p. 93–100 , 2013.
- NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **Morbidity e Mortality: 2012 Chart book on cardiovascular, lung and blood diseases**. [S.l.: s.n.], 2012.
- NAYAK, Bichitra N.; BUTTAR, Harpal S. Evaluation of the antioxidant properties of tryptophan and its metabolites in in vitro assay. **Journal of Complementary and Integrative Medicine** v. 13, n. 2, p. 129–136 , 2016.
- NENNA, Antonio et al. Pharmacologic approaches against advanced glycation end products (AGES) in diabetic cardiovascular disease. **Research in Cardiovascular Medicine** v. 4, n. 2, p. 1-8 , 2015.
- NEPALI, Kunal et al. Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 77, p. 422–487 , 2014.
- NEVES, João S. et al. Acute myocardial response to stretch: What we (don't) know. **Frontiers in Physiology** v. 6, n. JAN, p. 1–11 , 2016.
- NEVIERE, Remi et al. Implication of advanced glycation end products (Ages) and their receptor (Rage) on myocardial contractile and mitochondrial functions. **Glycoconjugate Journal** v. 33, n. 4, p. 607–617 , 2016.
- NIE, Chun Lai et al. Amyloid-like aggregates of neuronal tau induced by formaldehyde promote apoptosis of neuronal cells. **BMC Neuroscience** v. 8, p. 9 , 2007.
- NIGST, Tobias A.; ANTIPOVA, Anna; MAYR, Herbert. Nucleophilic reactivities of hydrazines and amines: The futile search for the alpha-effect in hydrazine reactivities. **Journal of Organic Chemistry** v. 77, n. 18, p. 8142–8155 , 2012.
- NOGUEIRA, J B. Left ventricular hypertrophy in systemic hypertension. Benefits of its reversal. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** v. 73, n. 1, p. 103–12 , 1999.
- NORTON, Gavin R.; CANDY, Geoff; WOODIWISS, Angela J. Aminoguanidine prevents the decreased myocardial compliance produced by streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. **Circulation** v. 93, n. 10, p. 1905–12 , 1996.
- NORTON, Gavin R. et al. Heart failure in pressure overload hypertrophy: the relative roles of ventricular remodeling and myocardial dysfunction. **Journal of the American College of Cardiology** v. 39, n. 4, p. 664–671 , 2002a.
- NORTON, Gavin R. et al. Heart failure in pressure overload hypertrophy remodeling and myocardial dysfunction. **Journal of the American College of Cardiology** v. 39, n. 4, p. 664–671 , 2002b.

O'CONNELL, Timothy D et al. Cardiac alpha1-adrenergic receptors: novel aspects of expression, signaling mechanisms, physiologic function, and clinical importance. **Pharmacological Reviews** v. 66, n. 1, p. 308–33 , 2014.

O'NEIL, Meghan L et al. The alpha1-adrenergic receptor antagonist, doxozosin, reduces alcohol drinking in alcoho-preferring (P) rats. **Alcoholism Clinical & Experimental Research** v. 37, n. 2, p. 202–212 , 2013.

O'SULLIVAN, Jeff et al. Semicarbazide-sensitive amine oxidases: enzymes with quite a lot to do. **NeuroToxicology** v. 25, n. 1–2, p. 303–315 , 2004.

OAK, Jeong-Ho; YOUN, Ji-Youn; CAI, Hua. Aminoguanidine inhibits aortic hydrogen peroxide production, VSMC NOX activity and hypercontractility in diabetic mice. **Cardiovascular Diabetology** v. 8, p. 65 , 2009.

ODEH, M et al. Circulating levels of tumor necrosis factor-alpha correlate positively with severity of peripheral oedema in patients with right heart failure. **European Journal of Heart Failure** NULL, v. 8, n. 2, p. 141–146 , 2006.

OGANESIAN, Aram; HENDRICKS, Jerry D; WILLIAMS, David E. Long term dietary indole-carbinol inhibits diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis in the infant mouse model. **Cancer Letters** v. 118, p. 87–94 , 1997.

OGATA, Yutaka; ENGHILD, Jan J.; NAGASE, Hideaki. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. **Journal of Biological Chemistry** v. 267, n. 6, p. 3581–3584 , 1992.

OKADA, Muneyoshi et al. Canstatin inhibits isoproterenol-induced apoptosis through preserving mitochondrial morphology in differentiated H9c2 cardiomyoblasts. **Apoptosis** v. 21, n. 8, p. 887–895 , 2016.

OKADA, Yasunori et al. Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT-1080 human fibrosarcoma cells. **The Journal of Biological Chemistry** v. 267, n. 30, p. 21712–21719 , 1992.

OKOSHI, M.P. et al. Effects of early aldosterone antagonism on cardiac remodeling in rats with aortic stenosis-induced pressure overload. **International Journal of Cardiology** v. 222, p. 569–575 , 2016.

OLIVEIRA, Gustavo B F; AVEZUM, Alvaro; ROEVER, Leonardo. Cardiovascular disease burden: evolving knowledge of risk factors in myocardial infarction and stroke through population-based research and perspectives in global prevention. **Frontiers in Cardiovascular Medicine** v. 222, p. 32 , 2015.

OLIVEIRA, Woodland de Souza. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de capacidade antioxidante empregando inibição da oxidação da tiamina por complexo de ferro(III)**. 2013. 61 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Universidade Federal de Alagoas - Maceió, AL, 2013.

ORDUNEZ, Pedro et al. Premature mortality from cardiovascular disease in the Americas - Will the goal of a decline of “25% by 2025” be met? **PLoS One** v. 10, n. 10, p. 1–11 , 2015.

ORGANIZATION. World Health. **World Health Statistical**. [S.l: s.n.], 2012.

OSADCHII, Oleg E et al. Temporal changes in myocardial adrenergic regulation with the progression to pump dysfunction after chronic beta-adrenoreceptor activation in rats. **European Journal of Physiology** v. 455, n. 2, p. 251–60 , nov. 2007..

OSADCHII, Oleg E. Cardiac hypertrophy induced by sustained beta-adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects. **Heart Failure Reviews** v. 12, n. 1, p. 66–86 , 2007.

ÖSTÜRK, Can et al. Sympathetic activity in patients with secondary symptomatic mitral regurgitation or end-stage systolic heart failure. **JACC: Cardiovascular Interventions** v. 9, n. 19, p. 2050–2057 , 2016.

OTT, Christiane et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biology** v. 2, n. 1, p. 411–429 , 2014.

OZAWA, Kentaro et al. S-nitrosylation of β -arrestin regulates β -adrenergic receptor trafficking. **Molecular Cells** v. 31, n. 3, p. 395–405 , 2008.

OZYAZGAN, S et al. Impaired relaxation in aorta from streptozotocin-diabetic rats: effect of aminoguanidine (AMNG) treatment. **International Journal of Experimental Diabetes Research** v. 1, n. 2, p. 145–53 , 2000.

PAN, Xiaodong et al. Transforming growth factor β 1 induces the expression of collagen type i by dna methylation in cardiac fibroblasts. **PLoS One** v. 8, n. 4 , 2013.

PARK, Ji Young et al. Structural mechanism of GPCR-arrestin interaction: Recent breakthroughs. **Archives of Pharmacal Research** v. 39, n. 3, p. 293–301 , 2016.

PARK, Lisa et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. **Nature Medicine** v. 4, n. 9, p. 1025–1031 , 1998.

PARK, Su-hyun et al. Itch E3 ubiquitin ligase positively regulates TGF- β signaling to EMT via Smad7 ubiquitination. **Molecules and Cells** v. 38, n. 1, p. 20–5 , 2015.

PARRA, Valentina; ROTHERMEL, Beverly A. Calcineurin signaling in the heart: The importance of time and place. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** v. 103, p. 121–136 , 2017.

PARTHASARATHY, Arumugam et al. Aminoguanidine inhibits ventricular fibrosis and remodeling process in isoproterenol-induced hypertrophied rat hearts by suppressing ROS and MMPs. **Life Sciences** v. 118, n. 1, p. 15–26 , 2014.

PATEL, M B et al. Altered function and structure of the heart in dogs with chronic elevation in plasma norepinephrine. **Circulation** v. 84, p. 2091–100 , nov. 1991.

PATTERSON, Nicolle L. et al. Using proteomics to uncover extracellular matrix interactions during cardiac remodeling. **Proteomics - Clinical Applications** v. 7, n. 7–8, p. 516–527 , 2013.

PÉREZ-GONZÁLEZ, Adriana; ALVAREZ-IDABOY, Juan Raúl; GALANO, Annia. Free-radical scavenging by tryptophan and its metabolites through electron transfer based

processes. **Journal of Molecular Modeling** v. 21, n. 8 , 2015.

PERIASAMY, Srinivasan et al. Sesamol attenuates isoproterenol-induced acute myocardial infarction via inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression in rats. **Cellular Physiology and Biochemistry** v. 27, n. 3–4, p. 273–280 , 2011.

PERLUIGI, Marzia; COCCIA, Raffaella; BUTTERFIELD, D Allan. 4-Hydroxy-2-nonenal, a reactive product of lipid peroxidation, and neurodegenerative diseases: a toxic combination illuminated by redox proteomics studies. **Antioxidants & Redox Signaling** v. 17, n. 11, p. 1590–609 , 2012.

PERRY, Stephen J et al. Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. **Science** v. 298, n. 5594, p. 834–6 , 2002.

PETRONILHO, Elaine da Conceição et al. Design, synthesis, and evaluation of guanylhydrazones as potential inhibitors or reactivators of acetylcholinesterase. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry** v. 6366, n. November, p. 1–10 , 2015

PETROV, Victor V; FAGARD, Robert H; LIJNEN, Paul J. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. **Hypertension** v. 39, n. 2, p. 258–63 , 2002.

PICARD, Sylvie et al. Aminoguanidine inhibits oxidative modification of low density lipoprotein protein and the subsequent increase in uptake by macrophage scavenger receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 89, p. 6876–6880 , 1992.

PIEK, A.; BOER, R. A. De; SILLJÉ, H. H. W. The fibrosis-cell death axis in heart failure. **Heart Failure Reviews** v. 21, n. 2, p. 199–211 , 2016.

PIMENTEL, A. M L et al. The role of NO-cGMP pathway and potassium channels on the relaxation induced by clonidine in the rat mesenteric arterial bed. **Vascular Pharmacology** v. 46, n. 5, p. 353–359 , 2007.

PINHATTI, Valéria Rodrigues et al. Cytotoxic, mutagenicity, and genotoxicity effects of guanylhydrazone derivatives. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis** v. 806, p. 1–10 , 2016.

PINTO, Alexander R. et al. Revisiting cardiac cellular composition. **Circulation Research** v. 118, n. 3, p. 400–409 , 2016a.

PINTO, Alexander R. et al. Revisiting cardiac cellular composition. **Circulation Research** v. 118, n. 3, p. 400–409 , 2016b.

PIRAS, S. et al. RAGE Expression and ROS generation in neurons: differentiation versus damage. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** v. 2016, 2016.

PORTER, Karen E.; TURNER, Neil A. Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. **Pharmacology and Therapeutics** v. 123, n. 2, p. 255–278 , 2009.

PRABHU, Sumanth D.; FRANGOIANNIS, Nikolaos G. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction. **Circulation Research** v. 119, n. 1, p. 91–112 , 2016.

PRASAD K. Low Levels of Serum Soluble Receptors for AGEs, biomarkers for disease state, myth or reality. **Int J Angiol.** v. 23, n. 1, p. 11–16 , 2014.

PRÉVOT, D. et al. Prolonged treatment with aminoguanidine strongly inhibits adipocyte semicarbazide-sensitive amine oxidase and slightly reduces fat deposition in obese Zucker rats. **Pharmacological Research** v. 56, n. 1, p. 70–79 , 2007.

PUHL, Sarah-Lena et al. Assessing structural and functional responses of murine hearts to acute and sustained β -adrenergic stimulation in vivo. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods** v. 79, p. 60–71 , 2016.

PUTNAM, Wayne et al. Drug management for hypertension in type 2 diabetes in family practice. **Canadian Family Physician Médecin de Famille Canadien** v. 55, n. 7, p. 728–34 , 2009.

PUTT, Mary E. et al. Evidence for co-regulation of myocardial gene expression by MEF2 and NFAT in human heart failure. **Circ Cardiovasc Genet.** v. 2, n. 3, p. 212–219 , 2009.

RAAKE, Philip W. et al. Cardiac G-protein-coupled receptor kinase 2 ablation induces a novel Ca²⁺ handling phenotype resistant to adverse alterations and remodeling after myocardial infarction. **Circulation** v. 125, n. 17, p. 2108–2118 , 2012.

RAAKE, Philip W. et al. G protein-coupled receptor kinase 2 ablation in cardiac myocytes before or after myocardial infarction prevents heart failure. **Circulation Research** v. 103, n. 4, p. 413–422 , 2008.

RADISKY, Evette S; RADISKY, Derek C. Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets. **Frontiers in Bioscience** v. 20, n. 2, p. 1144–63 , 2015.

RASHEED, Zafar; AKHTAR, Nahid; HAQQI, Tariq M. Advanced glycation end products induce the expression of interleukin-6 and interleukin-8 by receptor for advanced glycation end product-mediated activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B in human osteoarthritis chondrocytes. **Rheumatology** v. 50, n. 5, p. 838–851 , 2011.

RASMUSSEN, Dennis D.; BECKWITH, Lauren E; et al. Combining the α 1-adrenergic receptor antagonist, prazosin, with the beta-adrenergic receptor antagonist, propranolol, reduces alcohol drinking more effectively than either drug alone. **Alcoholism Clinical & Experimental Research** v. 38, n. 6, p. 1532–1539 , 2014.

RASMUSSEN, Dennis D.; ALEXANDER, Laura; et al. The α ₂-adrenergic receptor agonist, clonidine, reduce alcohol drinking in alcohol-preferring (P) rats. **Alcohol** v. 48, n. 6, p. 543–549 , 2014.

RASOOL, Mahmood et al. Evaluation of matrix metalloproteinases, cytokines and their potential role in the development of ovarian cancer. **Plos One** v. 11, n. 11, p. e0167149 , 2016.

REDDY, V. Prakash; BEYAZ, Ayse. Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. **Drug Discovery Today** v. 11, n. 13–14, p. 646–654 , 2006.

REVUELTA-LÓPEZ, Elena et al. Relationship among LRP1 expression, Pyk2 phosphorylation and MMP-9 activation in left ventricular remodelling after myocardial

infarction. **Journal of Cellular and Molecular Medicine** v. 21, n. 9, p. 1–14 , 2017.

RHODES, K et al. DNA methylation represses the murine alpha 1(I) collagen promoter by an indirect mechanism. **Mol Cell Biol** v. 14, n. 9, p. 5950–5960 , 1994.

RIBEIRO, Antonio Luiz P. et al. Cardiovascular health in Brazil: trends and perspectives. **Circulation** v. 133, n. 4, p. 422–433 , 2016.

RIBEIRO, Henrique Barbosa et al. Estudo evolutivo da morfologia e função cardíaca em ratos submetidos a estenose aórtica supravalvar. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** v. 81, n. 6, p. 562–568 , 2003.

RIMEHAUG, Audun E. et al. Minimally invasive beat-by-beat monitoring of cardiac power in normal hearts and during acute ventricular dysfunction. **Physiological Reports** v. 4, n. 19, p. e12989 , 2016.

RITTER, Alessandra Mileni Versuti et al. Crosstalk between obesity and MMP-9 in cardiac remodelling –a cross-sectional study in apparent treatment-resistant hypertension. **Blood Pressure** v. 0, n. 0, p. 1–8 , 2016.

RIZZI, Elen et al. 1-Adrenergic blockers exert antioxidant effects, reduce matrix metalloproteinase activity, and improve renovascular hypertension-induced cardiac hypertrophy. **Free Radical Biology and Medicine** v. 73, p. 308–317 , 2014.

RIZZI, Elen; CASTRO, Michele M.; et al. Tempol inhibits TGF- α and MMPs upregulation and prevents cardiac hypertensive changes. **International Journal of Cardiology** v. 165, n. 1, p. 165–173 , 2013.

RIZZI, Elen; CERON, Carla S.; et al. Temporal changes in cardiac matrix metalloproteinase activity, oxidative stress, and TGF- β in renovascular hypertension-induced cardiac hypertrophy. **Experimental and Molecular Pathology** v. 94, n. 1, p. 1–9 , 2013.

ROHINI, Agrawal et al. Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. **Pharmacological Research** v. 61, p. 269–80 , abr. 2010.

ROMANO, Minna M.D.; MACIEL, Benedito C. Alterações cardíacas decorrentes da hipertensão arterial. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo** v. 18, n. 2, p. 169–174 , 2008.

RONA, George; CHAPPEL, Clifford I; BALAZS, Tibor. The effect of breed, age, and sex on myocardial necrosis produced by isoproterenol in the rat. **Journal of Gerontology** v. 14, n. 2, p. 169–173 , 1958.

RONA, George; KAHN, David S.; CHAPPEL, Clifford I. Study on the healing of cardiac necrosis in the rat. **American Journal of Pathology** v. 39, n. 4, p. 473–489 , 1961.

ROTH, Gregory A.; NGUYEN, Grant; et al. Estimates of global and regional premature cardiovascular mortality in 2025. **Circulation** v. 132, n. 13, p. 1270–1282 , 2015.

ROTH, Gregory A.; HUFFMAN, Mark D.; et al. Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013. **Circulation** v. 132, n. 17, p. 1667–1678 , 2015.

ROUSELL, Siân et al. Crystal structure of human MMP9 in complex with a reverse hydroxamate inhibitor. **Journal of Molecular Biology** v. 319, n. 1, p. 173–181 , 2002.

ROY, Ashbeel et al. Cholinergic activity as a new target in diseases of the heart. **Molecular Medicine** v. 20, n. 1, p. 527–37 , 2015.

RUDDY, Jean Marie et al. Differential hypertensive protease expression in the thoracic versus abdominal aorta. **Journal of Vascular Surgery**v. 66, n. 5, p. 1–10 , 2017.

SACZEWSKI, Franciszek; BALEWSKI, Łukasz. Biological activities of guanidine compounds, 2008 - 2012 update. **Expert Opinion on Therapeutic Patents** v. 23, n. 8, p. 965–995 , 2013.

SAGOR, Md. Abu Taher et al. Xanthine oxidase inhibitor, allopurinol, prevented oxidative stress, fibrosis, and myocardial damage in isoproterenol induced aged rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** v. 2015, p. 1–9 , 2015.

SAITO, Reiko et al. Elevated endogenous secretory receptor for advanced glycation end products (esRAGE) levels are associated with circulating soluble RAGE levels in diabetic children. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism** v. 30, n. 01, p. 1–7 , 2017.

SAKAKIBARA, Masaki et al. Association of diabetes mellitus with myocardial collagen accumulation and relaxation impairment in patients with dilated cardiomyopathy. **Diabetes Research and Clinical Practice** v. 92, n. 3, p. 348–355 , 2011.

SAKATA, Noriyuki et al. Nonenzymatic glycation and extractability of collagen in human atherosclerotic plaques. **Atherosclerosis** v. 116, n. 1, p. 63–75 , 1995.

SALAZAR, Norma C et al. GRK2 blockade with β ARKct is essential for cardiac β 2-adrenergic receptor signaling towards increased contractility. **Cell Communication And Signaling**v. 11, n. 1, p. 64 , 2013.

SANGARTIT, Weerapon et al. Tetrahydrocurcumin in combination with deferiprone attenuates hypertension, vascular dysfunction, baroreflex dysfunction, and oxidative stress in iron-overloaded mice. **Vascular Pharmacology**v. 87, p. 199–208, 2016.

SANGI, D.P. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: O emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. **Química Nova** v. 39, n. 8, p. 995–1006 , 2016.

SANNOMIYA, Paulina; OLIVEIRA, Maria A.; FORTES, Zuleica B. Aminoguanidine and the prevention of leukocyte dysfunction in diabetes mellitus: a direct vital microscopic study. **British Journal of Pharmacology** v. 122, n. 5, p. 894–898 , 1997.

SANTULLI, Gaetano; IACCARINO, Guido. Adrenergic signaling in heart failure and cardiovascular aging. **Maturitas** p. 1–8 , 2016.

SAVINOVA, Olga V; GERDES, A Martin. Myocyte changes in heart failure. **Heart Failure Clinics** v. 8, n. 1, p. 1–6 , 2012.

SAXENA, Amit et al. IL-1 induces proinflammatory leukocyte infiltration and regulates fibroblast phenotype in the infarcted myocardium. **Journal of Immunology**v. 191, n. 9, p. 4838–48 , 2013.

- SCACCINI, C; CHIESA, G; JIALAL, I. A critical assessment of the effects of aminoguanidine and ascorbate on the oxidative modification of LDL: evidence for interference with some assays of lipoprotein oxidation by aminoguanidine. **Journal of Lipid Research** v. 35, n. 6, p. 1085–1092 , 1994.
- SCHMID, Evelyn et al. Cardiac RKIP induces a beneficial β -adrenoceptor-dependent positive inotropy. **Nature Medicine** v. 21, n. 11, p. 1298–1306 , 2015.
- SCHNALL, Peter L.; DOBSON, Marnie.; LANDSBERGIS, Paul. Globalization, work, and cardiovascular disease. **International Journal of Health Services** v. 46, n. 4, p. 656-692, 2016.
- SELVETELLA, Giulio et al. Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence. **Cardiovascular Research** v. 63, p. 373–80 , 2004.
- SELVETELLA, Giulio; LEMBO, Giuseppe. Mechanisms of cardiac hypertrophy. **Heart Failure Clinics** v. 1, n. 2, p. 263–73 , 2005.
- SERBAN, Andreea Iren et al. AGEs-induced IL-6 synthesis precedes rage up-regulation in HEK 293 cells: an alternative inflammatory mechanism? **International Journal of Molecular Sciences** v. 16, n. 9, p. 20100–20117 , 2015.
- SETHY, S P et al. The role of bioisosterism in molecular modification and drug design : a review. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences and Research** v. 3, n. 1, p. 61–87 , 2013.
- SHARMA, Chetan et al. Advanced glycation End-products (AGEs): an emerging concern for processed food industries. **Journal of Food Science and Technology** v. 52, n. 12, p. 7561–7576 , 2015.
- SHARMA, Om P.; BHAT, Tej K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry** v. 113, n. 4, p. 1202–1205 , 2009.
- SHI, Aimin et al. Epidemiological aspects of heart diseases (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine** v. 12, n. 3, p. 1645–1650 , 2016.
- SHI, Huairui et al. Metabolites of hypoxic cardiomyocytes induce the migration of cardiac fibroblasts. **Cellular Physiology and Biochemistry** v. 41, n. 01, p. 413–421 , 2017.
- SHIMIZU, Ippei; MINAMINO, Tohru. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** v. 97, p. 245–262 , 2016.
- SHIN, Seoungwoo et al. Anti-glycation activities of phenolic constituents from *Silybum marianum* (milk thistle) flower in vitro and on human explants. **Molecules** v. 20, n. 3, p. 3549–3564 , 2015.
- SHINDE, Arti V.; FRANGOGIOANNIS, Nikolaos G. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. **J Mol Cell Cardiol.** v. 70, p. 74–82 , 2014.
- SICA, Domenic A. Centrally acting antihypertensive agents: an update. **Journal of Clinical Hypertension** v. 9, n. 5, p. 399–405 , 2007.

SIEBENMANN, C; LUNDBY, C. Regulation of cardiac output in hypoxia. **Scand J Med Sci Sports** v. 25,n.4, p. 53–59 , 2015.

SILVA, Fábio Pedrosa Lins et al. Synthesis and anticancer activities of novel guanylhydrazone and aminoguanidine tetrahydropyran derivatives. **Molecules** v. 21, n. 6, p. 1–11 , 2016.

SIMARD, Elie et al. Receptor for advanced glycation end-products signaling interferes with the vascular smooth muscle cell contractile phenotype and function. **Plos One** v. 10, n. 8, p. e0128881 , 2015.

SIMM, Andreas. Protein glycation during aging and in cardiovascular disease. **Journal of Proteomics** v. 92, p. 248–259 , 2013.

SINGH, Varun Parkash et al. Advanced glycation end products and diabetic complications. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology** v. 18, n. 1, p. 1–14 , 2014.

SMITH, Jeffrey S.; RAJAGOPAL, Sudarshan. The β -arrestins: Multifunctional regulators of G protein-coupled receptors. **Journal of Biological Chemistry** v. 291, n. 17, p. 8969–8977 , 2016.

SMRCKA, Alan V. Regulation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C at the nuclear envelope in cardiac myocytes. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**v. 65, n. 3, p. 203–10 , 2015.

SOLIMAN, Mona M. Effects of aminoguanidine, a potent nitric oxide synthase inhibitor, on myocardial and organ structure in a rat model of hemorrhagic shock. **Journal of Emergencies, Trauma and Shock** v. 7, n. 3, p. 190–195 , 2014.

SOLIMAN, Mona M. Preservation of myocardial contractile function by aminoguanidine, a nitric oxide synthase inhibitors, in a rat model of hemorrhagic shock. **Pakistan Journal of Medical Sciences** v. 29, n. 6, p. 1415–1419 , 2013.

SONG, Jiao et al. Selective non-zinc binding MMP-2 inhibitors: Novel benzamide Ilomastat analogs with anti-tumor metastasis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters** v. 26, n. 9, p. 2174–2178 , 2016.

SONG, Yao Hong et al. Icarin attenuates cardiac remodelling through down-regulating myocardial apoptosis and matrix metalloproteinase activity in rats with congestive heart failure. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** v. 63, n. 4, p. 541–549 , 2011.

SONGUR, Ahmet; OZEN, Oguz Aslan; SARSILMAZ, Mustafa. The toxic effects of formaldehyde on the nervous system. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology** v. 203, p. 105–118 , 2010.

SOULIS, T et al. Effects of aminoguanidine in preventing experimental diabetic nephropathy are related to the duration of treatment. **Kidney International**v. 50, n. 2, p. 627–34 , 1996.

SPÄTER, Daniela et al. How to make a cardiomyocyte. **Development** v. 141, n. 23, p. 4418–31 , 2014.0036-8075.

- SPEGGIORIN, Simone et al. A new morphologic classification of congenital tracheobronchial stenosis. **Annals of Thoracic Surgery** v. 93, n. 3, p. 958–961 , 2012.
- SPEGGIORIN, Simone et al. Virtual 3D modeling of airways in congenital heart defects. **Frontiers in Pediatrics** v. 4, n. 116, p. 1–8 , 2016.
- STADEL, Rebecca; AHN, Kwang H.; KENDALL, Debra A. The cannabinoid type-1 receptor carboxyl-terminus, more than just a tail. **Journal of Neurochemistry** v. 117, n. 1, p. 1–18 , 2011.0022-3042.
- STADLER, Krisztián et al. Beneficial effects of aminoguanidine on the cardiovascular system of diabetic rats. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews** v. 21, n. 2, p. 189–196 , 2005.
- STANTON, Hubert C. Estimation of grossly detectable isoproterenol-induced myocardopathies in rats using the rido transformation. **Toxicology and Applied Pharmacology** v. 9, p. 218–224 , 1966.
- STARK, Joalice C C et al. Effect of overexpressed adenylyl cyclase VI on beta 1- and beta 2-adrenoceptor responses in adult rat ventricular myocytes. **British Journal of Pharmacology** v. 143, n. 4, p. 465–476 , 2004.
- STEVENS, Antony; SCHMIDT, Maria I.; DUNCAN, Bruce B. Gender inequalities in non communicable disease mortality in Brazil. **Ciência e Saúde Coletiva** v. 17, n. 10, p. 2627–2634 , 2012.
- SUANTAWEE, Tanyawan; CHENG, Henrique; ADISAKWATTANA, Sirichai. Protective effect of cyanidin against glucose- and methylglyoxal-induced protein glycation and oxidative DNA damage. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 93, p. 814–821 , 2016.
- SUGITA, Michiko et al. iNOS deficiency ameliorates skeletal muscle insuline resistance but does not alter unexpected lower blood glucoes levels after burn injury in C57BL/6 mice. **Metabolism** v. 61, n. 1, p. 127–136 , 2012.
- SUH, K S et al. Methylglyoxal induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Free radical Research** v. 48, n. 2, p. 206–17 , 2014.
- SUN, Juan et al. Vanillin derivatives as the selective small molecule inhibitors of FtsZ. **Medicinal Chemistry Research** v. 23, n. 6, p. 2985–2994 , 2014.
- SUN, M K; REGUNATHAN, S; REIS, D J. Cardiovascular responses to agmatine, a clonidine-displacing substance, in anesthetized rat. **Clinical and Experimental Hypertension** v. 17, n. 1–2, p. 115–28 , 1995.
- SYROVATKINA, Viktoriya et al. Regulation, signaling, and physiological functions of G-proteins. **Journal of Molecular Biology** v. 428, n. 19, p. 3850–3868 , 2016.
- SZENDE, Béla; TYIHÁK, Erno. Effect of formaldehyde on cell proliferation and death. **Cell Biology International** v. 34, p. 1273–1282 , 2010.
- TAGGART, Peter et al. Significance of neuro-cardiac control mechanisms governed by higher regions of the brain. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical** v. 199, p. 54–65 ,

2016.

TAKIGAWA, Shinya et al. Guanabenz downregulates inflammatory responses via eIF2 α dependent and independent signaling. **International Journal of Molecular Sciences** v. 17, n. 5, p. 1–12 , 2016.

TANIMOTO, Mitsuo et al. Effect of pyridoxamine (K-163), an inhibitor of advanced glycation end products, on type 2 diabetic nephropathy in KK-Ay/Ta mice. **Metabolism: Clinical and Experimental** v. 56, n. 2, p. 160–167 , 2007.

TERUI, Gen et al. Effect of pioglitazone on left ventricular diastolic function and fibrosis of type III collagen in type 2 diabetic patients. **Journal of Cardiology** v. 54, n. 1, p. 52–58 , 2009.

TEWSON, Paul; QUINN, Anne Marie; HUGHES, Thomas E. A multiplexed fluorescent assay for independent second messenger systems: Decoding GPCR activation in living cells. **J Biomol Screen** v. 18, n. 7, p. 797–806 , 2014.

THAM, Yow Keat et al. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. **Archives of Toxicology** v. 89, n. 9, p. 1401–1438 , 2015.

THE WORLD BANK. **World Development Indicators**. [S.l: s.n.], 2016.

THOMAS, M C et al. The role of AGEs and AGE inhibitors in diabetic cardiovascular disease. **Current Drug Targets** v. 6, n. 4, p. 453–474 , 2005.

THORNALLEY, Paul J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v. 419, p. 31–40

TIAN, Xufan; KANG, Dong Soo; BENOVIC, Jeffrey L. β -arrestins and G protein-coupled receptor trafficking. **Handbook of Experimental Pharmacology** v. 219, p. 173–186 , 2014.

TINBERG, Christine E et al. Computational design of ligand binding proteins with high affinity and selectivity. **Nature** v. 501, n. 7466, p. 212–216 , 2013.

TOISCHER, Karl et al. Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. **Circulation** v. 122, n. 10, p. 993–1003 , 2010.

TREDER, Adam P. et al. New imidazoline/ α 2-adrenoceptors affecting compounds-4(5)-(2-aminoethyl)imidazoline (dihydrohistamine) derivatives. Synthesis and receptor affinity studies. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** v. 19, n. 1, p. 156–167 , 2011..

TRIPOSKIADIS, Filippos et al. The Sympathetic Nervous System in Heart Failure. Physiology, Pathophysiology, and Clinical Implications. **Journal of the American College of Cardiology** v. 54, n. 19, p. 1747–1762 , 2009.

TSIKAS, Dimitrios. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. **Journal of Chromatography B** v. 851, n. 1–2, p. 51–70 , 15 maio 2007.

TULPULE, Ketki; DRINGEN, Ralf. Formaldehyde in brain: An overlooked player in neurodegeneration? **Journal of Neurochemistry** v. 127, n. 1, p. 7–21 , 2013.1471-4159.

TUMANOV, Vasily V.; TISHKOV, Alexander A.; MAYR, Herbert. Nucleophilicity parameters for alkyl and aryl isocyanides. **Angewandte Chemie - International Edition** v. 46, n. 19, p. 3563–3566 , 2007.

TURNER, Neil a et al. Interleukin-1 alpha stimulates proinflammatory cytokine expression in human cardiac myofibroblasts. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** v. 10, p. 1117–1127 , 2009.

TUTEJA, Narendra. Signaling through G protein coupled receptors. **Plant Signaling & Behavior** v. 4, n. 10, p. 942–7 , 2009.

UCHIDE, Noboru et al. Regulation of matrix metalloproteinases-2 and -9 gene expression in cultured human fetal membrane cells by influenza virus infection. **Biological & Pharmaceutical Bulletin** v. 39, n. 12, p. 1912–1921 , 2016.

UHLE, Florian et al. Role of the RAGE axis during the immune response after severe trauma: a prospective pilot study. **Mediators of Inflammation** v. 2015 , 2015.

USTA, M F et al. The protective effect of aminoguanidine on erectile function in streptozotocin diabetic rats. **The Journal of Urology** v. 170, n. 4 Pt 1, p. 1437–1442 , 2003.

USTA, Mustafa F. et al. The protective effect of aminoguanidine on erectile function in diabetic rats is not related to the timing of treatment. **BJU International** v. 94, n. 3, p. 429–432 , 2004.

UTHMAN, Olalekan A. et al. Multiple risk factor interventions for primary prevention of cardiovascular disease in low- and middle-income countries (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews** n. 8 , 2015.

VADLA, Gangadhara Prasadachari; VELLAICHAMY, Elangovan. Anti-fibrotic cardio protective efficacy of aminoguanidine against streptozotocin induced cardiac fibrosis and high glucose induced collagen up regulation in cardiac fibroblasts. **Chemico-Biological Interactions** v. 197, n. 2–3, p. 119–128 , 2012.

VAN BERLO, Jop H.; MAILLET, Marjorie; MOLKENTIN, Jeffery D. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. **Journal of Clinical Investigation** v. 123, n. 1, p. 37–45 , 2013.

VAN DOREN, Steven R. Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin. **Matrix Biology** n. i, p. 1–8 , 2015.

VAN HEEREBEEK, Loek et al. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: Importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. **Circulation** v. 117, n. 1, p. 43–51 , 2008.

VANDOOREN, Jennifer; STEEN, Philippe E. Van den; OPDENNAKKER, Ghislain. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.** v. 48, n. 3, p. 222–272 , 2013.

- VASAN, S; FOILES, P G; FOUNDS, H W. Therapeutic potential of AGE inhibitors and breakers of AGE protein cross-links. **Expert Opinion on Investigational Drugs** v. 10, n. 11, p. 1977–1987 , 2001.
- VASDEV, Sudesh et al. Fructose and moderately high dietary salt-induced hypertension: Prevention by a combination of N-acetylcysteine and l-arginine. **Molecular and Cellular Biochemistry** v. 337, n. 1–2, p. 9–16 , 2010.
- VAYTTADEN, Sharat J. et al. Quantitative modeling of GRK-mediated β 2AR regulation. **PLoS Computational Biology** v. 6, n. 1 , 2010.
- VELAGALETI, Raghava S. et al. Left ventricular hypertrophy patterns and incidence of heart failure with preserved versus reduced ejection fraction. **American Journal of Cardiology** v. 113, n. 1, p. 1–16 , 2014.
- VERGARO, Giuseppe et al. Inhibition of Galectin-3 Pathway Prevents Isoproterenol-Induced Left Ventricular Dysfunction and Fibrosis in Mice. **Hypertension** v. 67, n. 3, p. 606–612 , 2016.
- VERRECCHIA, Franck; CHU, Mon Li; MAUVIEL, Alain. Identification of Novel TGF- α /Smad Gene Targets in Dermal Fibroblasts using a Combined cDNA Microarray/Promoter Transactivation Approach. **Journal of Biological Chemistry** v. 276, n. 20, p. 17058–17062 , 2001.
- VIEGAS-JUNIOR, Claudio et al. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Current Medicinal Chemistry** v. 14, n. 17, p. 1829–1852 , 2007..
- VINIK, A I; MASER, R E; ZIEGLER, D. Review Article Autonomic imbalance : prophet of doom or scope for hope? **Diabetic Medicine** v. 28, p. 643–651 , 2011.
- VINIK, Aaron I. The conductor of the autonomic orchestra. **Frontiers in Endocrinology** v. 3, p. 1–13 , 2012.
- VISSE, Robert; NAGASE, Hideaki. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. **Circulation Research** v. 92, n. 8, p. 827–839 , 2003.
- WAGNER, D R et al. Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced cardiac expression of tumor necrosis factor- α . **Circ Res** v. 82, n. 1, p. 47–56 , 1998.
- WAINFORD, Richard D.; KAPUSTA, D. R. Functional selectivity of central G $\beta\gamma$ -subunit proteins in mediating the cardiovascular and renal excretory responses evoked by central ?? 2-adrenoceptor activation in vivo. **British Journal of Pharmacology** v. 166, n. 1, p. 210–220 , 2012.
- WALLUKAT, Gerd. The beta-adrenergic receptors. **Herz** v. 27, n. 7, p. 683–90 , nov. 2002.
- WANG, Baiqiu et al. Decreased Smad 7 expression contributes to cardiac fibrosis in the infarcted rat heart. **American Journal of Physiology** v. 282, n. 5, p. H1685-96 , 2002.

- WANG, Fang Fang et al. Correlation between growth differentiation factor-15 and collagen metabolism indicators in patients with myocardial infarction and heart failure. **Journal of Geriatric Cardiology** v. 13, n. 1, p. 88–93 , 2016.
- WANG, Jessica Jen Chu et al. Genetic Dissection of Cardiac Remodeling in an Isoproterenol-Induced Heart Failure Mouse Model. **PLoS Genetics** v. 12, n. 7, p. 1–30 , 2016.
- WANG, Xiaoxia et al. Increased methylglyoxal and advanced glycation end products in kidney from spontaneously hypertensive rats. **Kidney International** v. 66, n. 6, p. 2315–2321 , 2004.
- WANG, Xiaoxia et al. Vascular methylglyoxal metabolism and the development of hypertension. **Journal of Hypertension** v. 23, n. 8, p. 1565–1573 , 2005.0263-6352.
- WANG, Zhongqun et al. Advanced glycation end-product N-carboxymethyl-Lysine accelerates progression of atherosclerotic calcification in diabetes. **Atherosclerosis** v. 221, n. 2, p. 387–396 , 2012.
- WASFY, Meagan M et al. Endurance exercise-induced cardiac remodeling: not all sports are created equal. **Journal of the American Society of Echocardiography** v. 28, p. 1434–1440 , 2015.
- WATARI, Kenji; NAKAYA, Michio; KUROSE, Hitoshi. Multiple functions of G protein-coupled receptor kinases. **Journal of Molecular Signaling** v. 9, n. 1, p. 1 , 2014.
- WAUTIER, Marie-Paule; GUILLAUSSEAU, Pierre-Jean; WAUTIER, Jean-Luc. Activation of the receptor for advanced glycation end products and consequences on health. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews** , 2016.
- WEBER, Karl T et al. Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. **Nature reviews. Cardiology** v. 10, n. 1, p. 15–26 , 2013.
- WEBSKY, Martin Von et al. The novel guanylhydrazone CPSI-2364 ameliorates ischemia reperfusion injury after experimental small bowel transplantation. **Transplantation** v. 95, n. 11, p. 1315–23 , 2013.
- WEI, Zhi Yu et al. Synthesis and biological evaluation of chalcone derivatives containing aminoguanidine or acylhydrazone moieties. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters** v. 26, n. 24, p. 5920–5925 , 2016.
- WEINER, Rory B; BAGGISH, Aaron L. Exercise-Induced Cardiac Remodeling. **Progress in Cardiovascular Diseases** v. 54, n. 5, p. 380–386 , 2012.
- WELLS, J. Michael; GAGGAR, Amit; BLALOCK, J. Edwin. MMP generated matrikines. **Matrix Biology** v. 44–46, p. 122–129 , 2015.
- WERMUTH, C. G. et al. Glossary of terms used in medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry** v. 70, n. 5, p. 1129–1143 , 1998.978-0-444-52149-1.
- WIDYANTORO, Bambang et al. Endothelial cell-derived endothelin-1 promotes cardiac fibrosis in diabetic hearts through stimulation of endothelial-to-mesenchymal transition. **Circulation** v. 121, n. 22, p. 2407–2418 , 2010.

WILKINS, Benjamin J.; MOLKENTIN, Jeffery D. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 322, n. 4, p. 1178–1191 , 2004.

WILSON, Michael F. et al. Comparison of guanfacine versus clonidine for efficacy, safety and occurrence of withdrawal syndrome in step-2 treatment of mild to moderate essential hypertension. **The American Journal of Cardiology** v. 57, n. 9 , 1986.

WOLFF, Donald J.; LUBESKIE, Andrew. Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v. 316, n. 1, p. 290–301 , 1995.

WONG, Fung Fuh; HUANG, Yu Ying; CHANG, Chun Hsi. Evaluation of electrophilic heteroaromatic substitution: Synthesis of heteroaromatic-fused pyrimidine derivatives via sequential three-component heterocyclization. **Journal of Organic Chemistry** v. 77, n. 19, p. 8492–8500 , 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Brazil: WHO statistical profile**. [S.l: s.n.], 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global health estimates: Deaths by cause, age, sex and country, 2000-2015**. World Health Organization Geneva: [s.n.], 2016a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Estimates Summary Tables: Projection of Deaths by Cause, Age and Sex**. [S.l: s.n.], 2013a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Expenditure Database**. [S.l: s.n.], 2016b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Risks: Mortality and burden of disease attributable to selected major risks**. World Health Organization [S.l: s.n.], 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Noncommunicable diseases (NCD) country profiles**. [S.l: s.n.], 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics 2013**. [S.l: s.n.], 2013b.

WRODNIGG, Tanja M; EDER, Brigitte. The Amadori and Heyns Rearrangements: Landmarks in the History of Carbohydrate Chemistry or Unrecognized Synthetic Opportunities? **Glycoscience** v. 215, p. 115–152 , 2001.

WU, Lingyun; JUURLINK, Bernhard H J. Increased methylglyoxal and oxidative stress in hypertensive rat vascular smooth muscle cells. **Hypertension** v. 39, p. 809–814 , 2002.

WU, M S et al. Aminoguanidine prevents the impairment of cardiac pumping mechanics in rats with streptozotocin and nicotinamide-induced type 2 diabetes. **Br. J. Pharmacol.** v. 154, n. 4, p. 758–764 , 2008.

WU, Xiongyan et al. IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2/STAT3 signaling pathway. **Oncotarget** v. 8, n. 13, p. 20741-20750, 2017.

- XIA, Yunfeng; ENTMAN, Mark L.; WANG, Yanlin. CCR2 Regulates the Uptake of Bone Marrow-Derived Fibroblasts in Renal Fibrosis. **PLoS One** v. 8, n. 10, p. 1–12 , 2013.
- XIAO, Rui-Ping. Beta-Adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to Gs and Gi proteins. **Science Signaling** n. 104, p. 1–11 , 2001.
- XIE, Feng et al. Regulation of TGF- β Superfamily Signaling by SMAD Mono-Ubiquitination. **Cells** v. 3, n. 4, p. 981–993 , 2014.
- XIE, Jianling et al. Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). **Cellular Signalling** v. 25, n. 11, p. 2185–2197 , 2013.
- XU, Fengyun et al. TGF- β /SMAD Pathway and its regulation in hepatic fibrosis. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry** v. 64, n. 3, p. 157–67 , 2016.
- XU, Li et al. Inhibition of autophagy increased AGE/ROS-mediated apoptosis in mesangial cells. **Cell Death and Disease** v. 7, n. 11, p. e2445 , 2016.
- XU, Xiao-Liang et al. Synthesis and antitumor activity of novel 2-substituted indoline imidazolium salt derivatives. **Organic & Biomolecular Chemistry** v. 13, p. 1550–1557 , 2015.
- YAMAGISHI, Sho-ichi; MATSUI, Takanori. Role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in liver disease. **European journal of medical research** v. 20, n. 1, p. 15 , 2015.
- YAMAGISHI, Sho-ichi; MATSUI, Takanori. Soluble form of a receptor for advanced glycation end products (sRAGE) as a biomarker. **Frontiers in Bioscience** v. 2, p. 1184–95 , 2010.
- YAMAGISHI, Sho-ichi; MATSUI, Takanori; NAKAMURA, Kazuo. Kinetics, role and therapeutic implications of endogenous soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in diabetes. **Current Drug Targets** v. 8, n. 10, p. 1138–43 , 2007.
- YAN, Xiaohua et al. Smad7 protein interacts with receptor-regulated Smads (R-Smads) to inhibit transforming growth factor- β (TGF- β)/Smad signaling. **Journal of Biological Chemistry** v. 291, n. 1, p. 382–392 , 2016.
- YANG, Jun et al. Cardiovascular effects of agmatine within the rostral ventrolateral medulla are similar to those of clonidine in anesthetized rats. **Experimental Brain Research** v. 160, n. 4, p. 467–472 , 2005.
- YARMOHMMADI, Fatemeh et al. Protective effects of agmatine on doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity in rat. **European Journal of Pharmacology** v. 796, p. 39–44 , 2017.
- YILDIZ, G et al. Comparison of antioxidant activities of aminoguanidine, methylguanidine and guanidine by luminol-enhanced chemiluminescence. **British Journal of Pharmacology** v. 124, n. 5, p. 905–910 , 1998.
- YIN, Qian et al. Downregulation of β -adrenoceptors in isoproterenol-induced cardiac remodeling through HuR. **PLoS One** v. 11, n. 4, p. 1–14 , 2016.

YOKOYAMA, T et al. Angiotensin II and mechanical stretch induce production of tumor necrosis factor in cardiac fibroblasts. **The American Journal of Physiology** v. 276, n. 45, p. H1968–H1976 , 1999.

YU, P. et al. Involvement of semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated deamination in atherogenesis in KKAY diabetic mice fed with high cholesterol diet. **Diabetologia** v. 45, n. 9, p. 1255–1262 , 2002.

YU, Pei; XU, Xian-Bing; YU, Shu-Juan. The effect of pH and amino acids on the formation of methylglyoxal in glucose-amino acid model system. **Journal of the Science Food and Agriculture** , 2016.

YU, Peter H. et al. Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics** v. 1647, n. 1–2, p. 193–199 , 2003.1570-9639.

YUE, Lixia; XIE, Jia; NATTEL, Stanley. Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. **Cardiovascular Research** v. 89, n. 4, p. 744–753 , 2011.

YUE, S et al. Hyperglycemia and Liver Ischemia Reperfusion Injury: A Role for the Advanced Glycation Endproduct and Its Receptor Pathway. **American Journal of Transplantation** v. 15, n. 11, p. 2877-2887, 2015.

ZAMILPA, Rogelio; LINDSEY, Merry L. Extracellular matrix turnover and signaling during cardiac remodeling following MI: causes and consequences. **J Mol Cell Cardiol.** v. 48, n. 3, p. 558–563 , 2010.

ZARAIN-HERZBERG, Angel; FRAGOSO-MEDINA, Jorge; ESTRADA-AVILÉS, Rafael. Calcium-regulated transcriptional pathways in the normal and pathologic heart. **IUBMB Life** v. 63, n. 10, p. 847–855 , 2011.

ZBINDEN, Gerhard; MOE, Robert A. Pharmacological studies on heart muscle lesions induced by isoproterenol. **Annals of the New York Academy of Sciences** v. 156, n. 1, p. 294–308 , 1969.

ZEISBERG, Elisabeth M et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. **Nature Medicine** v. 13, n. 8, p. 952–961 , 2007.

ZHANG, Dandan; ZHAO, Qiang; WU, Beili. Structural studies of G protein-coupled receptors. **Molecules and Cells** v. 38, n. 10, p. 836–42 , 2015.

ZHANG, Heng et al. Inhibition of myocardial ischemia / reperfusion injury by exosomes secreted from mesenchymal stem cells. **Stem Cells International** v. 2016 , p. 1-8, 2016.

ZHANG, Juan et al. The regulation of TGF- β /SMAD signaling by protein deubiquitination. **Protein and Cell** v. 5, n. 7, p. 503–517 , 2014.

ZHANG, Xiaoying et al. Cardiotoxic and cardioprotective features of chronic β -Adrenergic signaling. **Circulation Research** v. 112, n. 3, p. 498–509 , 2013.

ZHANG, Yang et al. Deletion of interleukin-6 alleviated interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy of mice through affecting TGF β 1 and miR-29 pathways. **Scientific Reports** v. 6, p. 1-11 , 2016.

ZHANG, Zhen et al. Glucagon-like peptide-1 attenuates advanced oxidation protein product-mediated damage in islet microvascular endothelial cells partly through the RAGE pathway. **International Journal of Molecular Medicine** v. 38, n. 4, p. 1161–1169 , 2016.

ZHENG, H. et al. Selective recruitment of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) controls signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 109, n. 18, p. 7055–7060 , 2012.

ZHENG, Xiao-Zhu et al. Cardioprotective effect of novel sulphonamides-1,3,5-triazine conjugates against ischaemic-reperfusion injury via selective inhibition of MMP-9. **Chemical Biology & Drug Design** v. 88, n. 5, p. 756–765 , 2016.

ZHOU, Jingmin et al. Qiliqiangxin inhibits angiotensin II-induced transdifferentiation of rat cardiac fibroblasts through suppressing interleukin-6. **Journal of Cellular and Molecular Medicine** v. 19, n. 5, p. 1114–1121 , 2015.

ZHU, Baoling et al. Gender-related differences in β -adrenergic receptor-mediated cardiac remodeling. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology** v. 94, n. 12, p. 1–28 , 2016.

ZILE, Michael R. et al. Myocardial stiffness in patients with failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin. **Circulation** v. 131, n. 14, p. 1247–1259 , 2015.

ZIMMERMAN, G a et al. Neurotoxicity of advanced glycation endproducts during focal stroke and neuroprotective effects of aminoguanidine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 92, n. 9, p. 3744–8 , 1995.

ZOU, Yunzeng; KOMURO, Issei; YAMAZAKI, Tsutomu. Both Gs and Gi proteins are critically involved in isoproterenol-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Journal of Biological Chemistry** v. 274, n. 14, p. 9760–9770 , 1999.

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação interespecies dos efeitos cardioprotetores de uma substância sintética derivada da aminoguanidina no modelo de hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol.", **Protocolo nº 65/2015**, sob a responsabilidade de **Éurica Adélia Nogueira Ribeiro**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 13/11/2015.

Vigência do Projeto	20.11.2015 a 01.03.2016
Espécie/linhagem	Camundongo isogênico/C57BL/6 Rato heterogênico/Wistar
Nº de animais	120 camundongos 120 ratos
Peso/idade	20-25g/7 semanas (camundongos) 150-180g/7 semanas (ratos)
Sexo	Machos
Origem/Local de Manutenção	Biotério Central da UFAL/Laboratório experimental da ESENFAR - UFAL

Maceió, 19 de novembro de 2015.

Prof. Dr. Silvana Ayres Martins
Coordenadora CEUA/UFAL

Prof. Dra. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da Comissão de
Ética no Uso de Animais
SIAPE 1120858