

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

PÓS-GRADUAÇÃO RENORBIO

CINTIA DANIELI FERREIRA DA COSTA

ATIVIDADE VASORELAXANTE E ANTI-HIPERTENSIVA DE LQM01, UM NOVO
DERIVADO AMINOGUANIDÍNICO, EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS

Maceió - AL

2017

CINTIA DANIELI FERREIRA DA COSTA

ATIVIDADE VASORELAXANTE E ANTI-HIPERTENSIVA DE LQM01, UM NOVO
DERIVADO AMINOGUANIDÍNICO, EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS

Tese apresentada ao **Programa de Pós-Graduação
RENORBIO** da Universidade Federal de Alagoas
(UFAL), para obtenção do título de **DOUTOR EM
BIOTECNOLOGIA** Área de concentração:
BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE.

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro

Maceió - AL

2017

CINTIA DANIELI FERREIRA DA COSTA

ATIVIDADE VASORELAXANTE E ANTI-HIPERTENSIVA DE LQM01, UM NOVO
DERIVADO AMINOGUANIDÍNICO, EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS.

Tese apresentada ao **Programa de Pós-
Graduação RENORBIO** da Universidade Federal de Alagoas
(UFAL), para obtenção do título de **DOUTOR EM
BIOTECNOLOGIA** Área de concentração:
BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE.

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

Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

C837a Costa, Cintia Danieli Ferreira da.
Atividade vasorelaxante e anti-hipertensiva de LQM01, um novo derivado aminoguanidínico, em ratos espontaneamente hipertensos / Cintia Danieli Ferreira da Costa. – 2017.
80 f. : il. tabs., grafs.

Orientadora: Êurica Adélia Nogueira Ribeiro.
Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 70-80.

1. Derivados aminoguanidínicos. 2. SHR. 3. Vasorrelaxamento.
4. Atividade antihipertensiva. 5. Canal para k+. 6. VOCCs. I. Título.

CDU: 542:615.22

CINTIA DANIELI FERREIRA DA COSTA

Atividade vasorelaxante e anti-hipertensiva de LQM01, um novo derivado aminoguanidínico, em ratos espontaneamente hipertensos.

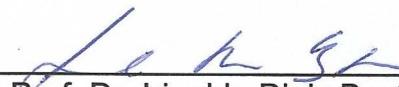
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 29/03/2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Eurica Adélia Nogueira Ribeiro (Orientadora)
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof.^a Dr.^a Luciana Aparecida Cora
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas – Uncisal



Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

“Muitos propósitos há no coração do homem, mas o que prevalece é o propósito do Senhor”

Provérbios 19:21

Dedico este trabalho ao meu amor maior, Jesus. Autor da minha felicidade.

A minha doce mãe, pelo amor, carinho e por sempre acreditar em mim sendo exemplo de
determinação os quais me conduziram
até aqui.

Ao meu esposo Cleiton, pela compreensão e apoio nesta longa jornada científica.

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo apoio;

A minha companheira **Edla Azevedo**, por ter se tornado uma irmã verdadeira, sempre presente e importante em minha vida;

A professora **Êurica Adélia Nogueira Ribeiro** por ter ensinado os caminhos da ciência com paciência e compreensão, por sua confiança e por ser um exemplo de determinação

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e aos demais Professores que contribuíram direta ou indiretamente para realização do trabalho;

Ao Prof. Dr. **João Xavier** pela oportunidade e apoio aos projetos em que estive inserida;

Ao Prof. Dr. **Emiliano de Oliveira Barreto** do instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – UFAL, pelo apoio e experimentos realizados em seu laboratório.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Muito obrigada

Cintia Danieli Ferreira da Costa
Março, 2017.

RESUMO

A Literatura relata efeitos benéficos da aminoguanidina e seus derivados sobre o sistema cardiovascular. Este trabalho utilizou-se de estratégias da Química Medicinal, como hibridação molecular e biososterismo, para síntese de 14 derivados aminoguanidínicos (DAGs) aromáticos, com o propósito de pesquisar alternativas terapêuticas eficazes, seguras e com menos efeitos adversos para o tratamento da hipertensão. Após triagem farmacológica com os 14 DAGs, a fim de selecionar o derivado com melhor eficácia, no que se refere a sua atividade citotóxica e efeito vasorelaxante, o trabalho segue com a caracterização dos efeitos cardiovasculares induzidos por LQM01 em Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR), através de abordagens experimentais *in vitro e in vivo*, utilizando o método de preparações com artéria mesentérica superior isolada de rato e medida direta e indireta pressão arterial, respectivamente. O derivado LQM01 apresentou em ensaios de MTT, atividade citotóxica muito baixa, com redução do crescimento celular apenas em altas concentrações. O derivado 01 também promoveu efeito vasorelaxante semelhante ao fármaco anti-hipertensivo Guanabenzol, controle positivo, em anéis pré-contraídos com FEN, de maneira independente de endotélio. O efeito observado apresentou um desvio significativo da curva-concentração resposta de LQM01 para direita, em anéis pré-contraídos com FEN, na presença do bloqueador TEA 5 mM, um bloqueador não-seletivo dos canais de K^+ do bloqueador 4-AP, um bloqueador seletivo dos K_v (1mM) e TEA 1mM, bloqueador seletivo dos BK_{Ca} sugerindo assim a participação dos K_v , BK_{Ca} no efeito vasorelaxante induzido por LQM01. Assim como, em solução despolarizante de KCl 180mM o vasorelaxamento mostrou-se reduzido, sugerindo a inibição do influxo de Ca^{2+} através dos VOCCs, tal hipótese é justificada pela atenuação das contrações induzidas por $CaCl_2$ em solução despolarizante nominalmente sem Ca^{+2} . Em ratos SHR não-anestesiados, a administração i.v. *in bolus* de LQM01 induziu hipotensão, de maneira independente de dose, com efeito hipotensor mais significativo nas doses de 5 e 10 mg/kg, acompanhado de efeito bradicárdico intenso. No entanto, após depressão do SNC no grupo de animais anestesiados com tiopental sódico, tanto a resposta hipotensora quanto a bradicárdica induzida pelo derivado foi atenuada ou praticamente abolida, respectivamente. Além disto, o derivado LQM01 foi capaz de promover atividade anti-hipertensiva, nas doses de 5 e 10 mg/kg, a por meio de sua administração orogástrica a partir da segunda hora, porém na quarta e sexta hora apenas na maior dose, sem promover alterações significativas sobre a FC, em ambas as doses. Em conclusão: Os dados sugerem que o LQM01 promove efeito vasodilatador através da estimulação de canais para K^+ , K_v e BK_{Ca} , além de inibir o influxo de Ca^{2+} , possivelmente através do bloqueio dos VOCCs, bem como, promover efeito hipotensor, bradicárdico e anti-hipertensivo, que pode ser devido a uma ação direta da substância sobre a MLV, induzindo vasorelaxamento e consequente redução da resistência vascular periférica, contribuindo para sua ação hipotensora, como também pode ter influência inibitória sobre o sistema de controle neural que atua sobre o sistema cardiovascular.

Palavras Chaves: Derivados Aminoguanidínicos. SHR. Vasorelaxamento. Atividade anti-hipertensiva. Canais para K. VOCCs.

ABSTRACT

The literature reports beneficial effects of aminoguanidine and its derivatives on the cardiovascular system. This work utilized strategies of Medicinal Chemistry, such as molecular hybridization and bio-ossification, for the synthesis of 14 aromatic aminoguanidine derivatives (DAGs), in order to investigate effective, safe and less effective adverse therapeutic alternatives for the treatment of hypertension. After pharmacological screening with the 14 DAGs, in order to select the most efficient derivative with respect to its cytotoxic activity and vasorelaxant effect, the work follows with the characterization of the cardiovascular effects induced by LQM01 in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR). Through experimental approaches *in vitro* and *in vivo*, using the method of preparations with superior mesenteric artery isolated from rat and direct and indirect blood pressure measurement, respectively. The LQM01 derivative showed very low cytotoxic activity in MTT assays with reduced cell growth only at high concentrations. The derivative 01 also promoted a vasorelaxant effect similar to the Guanabenz antihypertensive drug, a positive control, in rings pre-contracted with FEN, independently of endothelium. The observed effect showed a significant deviation of the response curve from LQM01 to the right, in pre-contracted FEN rings, in the presence of the 5 mM TEA blocker, a non-selective blocker of the K^+ channels of the 4-AP blocker, a blocker (1mM) and TEA 1mM, a selective BK_{Ca} blocker, thus suggesting the participation of K_v , BK_{Ca} in the vasorelaxation effect induced by LQM01. As in the depolarizing solution of KCl 80mM vasorelaxation was reduced, suggesting the inhibition of Ca^{2+} influx through the VOCCs, such hypothesis is justified by the attenuation of the $CaCl_2$ -induced contractions in the depolarizing solution nominally without Ca^{+2} . In non-anesthetized SHR rats, *i.v.* in bolus administration of LQM01 induced dose-dependent hypotension with a more significant hypotensive effect at doses of 5 and 10 mg/kg, accompanied by an intense bradycardic effect. However, after CNS depression in the group of animals anesthetized with sodium thiopental, both the hypotensive and bradycardic responses induced by the derivative were attenuated or virtually abolished, respectively. In addition, the LMQ01 derivative was able to promote antihypertensive activity, at doses of 5 and 10 mg/kg, by its orogastric administration from the second hour, but at the fourth and sixth hour only at the highest dose, without Significant changes in HR at both doses. Conclusion: The data suggest that LQM01 promotes vasodilator effect through channel stimulation for K^+ , K_v and BK_{Ca} , besides inhibiting Ca^{2+} influx, possibly through blocking VOCCs, as well as promoting hypotensive, bradycardic and anti- Hypertensive, which may be due to a direct action of the substance on the MLV, inducing vasorelaxation and consequent reduction of peripheral vascular resistance, contributing to its hypotensive action, but may also have an inhibitory influence on the neural control system that acts on the cardiovascular system

Key Words: Aminoguanidínicos derived. SHR. Vasorelaxation. Antihypertensive activity. K channels and VOCCs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fármacos que apresentam atividade cardiovascular e têm em sua estrutura a Guanidina.....	24
Figura 2 - Método geral de obtenção de guanilidrazonas.....	25
Figura 3 - Síntese do LQM01.....	25
Figura 4 - Representação esquemática do mecanismo de contração do músculo liso vascular.....	32
Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo de relaxamento do músculo liso vascular.....	33
Figura 6 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito dos DAG sobre contração induzida por FEN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR.....	39
Figura 7 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do LQM01 sobre contração induzida por KCl 80mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR.....	40
Figura 8 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do LQM01 sobre as contrações tônicas induzidas por FEN na presença de bloqueadores de canais para K ⁺ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR.....	42
Figura 9 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do LQM01 sobre os canais de Ca ⁺² dependentes de voltagem na presença de bloqueadores de canais para K ⁺ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR.....	43
Figura 10 - Representação esquemática referente ao protocolo experimental para avaliação do efeito do derivado LQM01 sobre a PAM e FC em ratos SHR não-anestesiados.....	45
Figura 11 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito anti-hipertensivo induzido pelo derivado LQM01 em ratos SHR não anestesiados--	47
Figura 12 – Registro original do efeito da adição de concentrações crescentes do LQM01 (3.10 ⁻⁸ - 10 ⁻⁴ M) em anel de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio, pré-contraído com 10 µM de FEN.....	51
Figura 13 – Registro original do efeito da administração intravenosa da dose de 10mg/Kg de LQM01 em ratos SHR.....	56

Figura 14 – Representação esquemática dos efeitos cardiovasculares induzidos por LQM01 em ratos SHR-----

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-** Efeito dos DAG sobre a viabilidade celular. As células foram expostas aos compostos por 24h antes da avaliação da viabilidade pelo teste de MTT----- 49
- Gráfico 2-** Curva - concentração resposta de LQM01 (3.10^{-8} - 10^{-4} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR, pré-contraídos com FEN (10 μ M) sem endotélio funcional (■) e com endotélio (□)----- 51
- Gráfico 3-** Curva - concentração resposta de LQM01 (3.10^{-8} - 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR, pré-contraídos com FEN (■) e com KCl (80 mM) (●) sem endotélio funcional----- 52
- Gráfico 4-** Efeito do LQM01 (3.10^{-8} - 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR sem endotélio pré-contraídos com 10 μ M de FEN, na ausência (■) e na presença (∇) de TEA 5mM----- 53
- Gráfico 5-** Efeito do LQM01 (3.10^{-8} - 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR sem endotélio pré-contraídos com 10 μ M de FEN, na ausência (■) e na presença (■) de de 10 μ M Glibenclamida----- 53
- Gráfico 6-** Efeito do LQM01 (3.10^{-8} - 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR sem endotélio pré-contraídos com 10 μ M de FEN, na ausência (■) e na presença (□) de 1mM de 4-AP----- 54
- Gráfico 7 -** Efeito do LQM01 (3.10^{-8} - 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR sem endotélio pré-contraídos com 10 μ M de FEN, na ausência (■) e na presença (Δ) de 1mM de TEA----- 55
- Gráfico 8 -** Efeito do LQM01 frente às curvas concentrações-resposta cumulativas ao $CaCl_2$ em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{+2} em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR (n = 6). Controle (■), LQM01 [M]: 3×10^{-5} (○) e 10^{-4} (◇)----- 55
- Gráfico 9-** Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses crescentes do LQM01 (0,5; 1; 5; 10 mg/kg, i.v) em ratos SHR não-anestesiados----- 56
- Gráfico 10-** Efeito do tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.) sobre a resposta hipotensora (A) e bradicárdica (B) induzida pela administração aguda de doses crescentes do LQM01(0,5; 1; 5; 10 mg/kg, i.v.) em ratos SHR inconcientes----- 57

Gráfico 11- Efeito do tratamento subcrônico sobre a PAM e FC, após a administração de salina (controle) e após administração de LQM (5 ou 10 mg/kg, v.o.) em ratos SHR (Tratado) ----- 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição da solução nutritiva Tyrode.-----	36
Tabela 2: Composição da solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 80 mM-----	34
Tabela 3: Efeito dos compostos, em concentrações de 10, 100 ou 1000 μM , sobre a viabilidade celular. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m.-----	48
Tabela 4: Valores de $E_{\text{máx}}$ e pD_2 para os DAG em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraída com FEN (10 μM).-----	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AC	Ciclase de adenilil
ACh	Acetilcolina
AG	Aminoguanidina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
bpm	Batimentos por minutos
[Ca⁺²]	Concentração de Ca ⁺²
[Ca⁺²]_i	Concentração de Ca ⁺² intracelular
[Ca⁺²₄-CaM]	Complexo cálcio-calmodulina
CaM	Calmodulina
Ca_v	Canais de Cálcio dependente de voltagem
Ca_v-L	Canais de Cálcio dependente de voltagem do tipo lento
CE₅₀	Concentração da droga que produz 50 % do efeito máximo
CI₅₀	Concentração de uma droga que inibe 50 % da resposta máxima de um agonista
CMLV	Células da musculatura lisa vascular
COX	Ciclooxigenase
DAG*	Diacilglicerol
DAG	Derivados Aminoguanidínicos
E+	Presença de endotélio funcional
E-	Ausência de endotélio funcional
E_{max}	Efeito máximo
FC	Frequência cardíaca
FEN	Fenilefrina
FHDE	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
FRDEs	Fatores relaxantes derivados do endotélio
GLIB	Glibenclamida
GC	Ciclase de guanilil
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
HR	Hipertensão resistente
IP₃	1,4,5-trifosfato de inositol

i.v.	Intravenoso
[K⁺]_e	Concentração de K ⁺ extracelular
MLC	Cadeia leve da miosina
MLCK	Cinase da Cadeia leve da miosina
MLCP	Fosfatase da Cadeia leve da miosina
MLV	Musculatura lisa vascular
MTT	Método de ensaio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
N	Número de experimentos
NO	Óxido nítrico
NPS	Nitroprussiato de sódio
NOS	Sintase do NO
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PE	Polietileno
PKA	Proteína cinase A
PKG	Proteína cinase G
PLC	Fosfolipase C
PMCA	Ca ²⁺ ATPase da membrana
ROCCs	Canais de Ca ²⁺ operados por receptor
R.S.	Retículo sarcoplasmático
RVPT	Resistência vascular periférica total
SERCA	Ca ²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático
SHR	Ratos Espontaneamente Hipertensos
TEA	Tetraetilamônio
VOCCs	Canais de Ca ²⁺ dependentes de voltagem
x ± e.p.m.	Média ± erro padrão da média
4-AP	4-aminopiridina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO -----	19
2	REVISÃO DA LITERATURA -----	20
2.1	Pesquisa e Desenvolvimento de novos Fármacos -----	20
2.2	Guanihidrazonas -----	22
2.3	Considerações sobre Hipertensão e Ratos Espontaneamente Hipertensos -----	25
2.4	Considerações sobre a Pressão Arterial e Vasorelaxamento -----	22
3	OBJETIVOS -----	34
3.1	Geral-----	34
3.2	Específicos-----	34
4	MATERIAL -----	35
4.1	Obtenção dos derivados aminoguanidínicos-----	35
4.2	Avaliação da Atividade Farmacológica-----	35
4.2.1	Animais-----	35
4.2.2	Drogas e Reagentes-----	36
4.2.3	Soluções Nutritivas-----	36
5	MÉTODO -----	38
5.1	Ensaio Farmacológicos-----	38
5.2	Ensaio Farmacológicos para estudos <i>in vitro</i> -----	38
5.2.1	Preparações com artéria mesentérica superior isolada de rato SHR-----	38
5.2.2	Curva concentração-resposta dos derivados aminoguanidínicos em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR-----	39
5.2.3	Curva concentração-resposta do derivado LQM01 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR com presença de endotélio funcional-----	39
5.2.4	Efeito do LQM01 sobre as contrações induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR -----	40

5.2.5	Efeito do LQM01 sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de TEA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR -----	41
5.2.6	Identificação dos canais de K ⁺ envolvidos na resposta relaxante induzida por LQM01 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR-----	41
5.2.7	Efeito do LQM01 sobre os canais de Ca ⁺² dependentes de voltagem em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR-----	42
5.2.7	Ensaio de viabilidade celular-----	43
5.3	Ensaio farmacológico para estudo <i>in vivo</i> -----	44
5.3.1	Medida direta da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos SHR não anestesiados -----	44
5.3.2	Protocolos experimentais para os estudos <i>in vivo</i> -----	44
5.3.3	Verificação dos efeitos da anestesia com tiopental sódico sobre a resposta hipotensora e bradicárdica induzida pela administração de doses crescentes do derivado LQM01 em ratos SHR-----	45
5.3.4	Avaliação do efeito anti-hipertensivo induzida pelo derivado LQM01 em ratos SHR-----	46
5.4	Análises Estatísticas-----	47
6	RESULTADOS -----	48
6.1	Estudos Farmacológicos com DAG <i>in vitro</i> -----	48
6.1.1	Efeito dos DAG sobre a viabilidade celular em macrófagos da linhagem (J774)-----	48
6.1.2	Estudos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR-----	49
6.1.3	Efeito do LQM01 sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com e sem o endotélio funcional pré-contraídos com FEN-----	50
6.1.4	Efeito de LQM01 sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem o endotélio funcional pré-contraídos com KCl 80 mM -----	51
6.1.5	Efeito do TEA 5mM sobre a resposta relaxante induzida por LQM01 em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio isolada de rato SHR-----	51
6.1.6	Efeito da GLIB sobre a resposta relaxante induzida por LQM01 em anéis de artéria	53

	mesentérica superior sem endotélio isolada de rato SHR-----	
6.1.7	Efeito de 4-AP sobre a resposta relaxante induzida por LQM01 em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio isolada de rato SHR-----	54
6.1.8	Efeito do TEA (1 mM), sobre a resposta relaxante induzida por LQM01 em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio isolada de rato SHR-----	54
6.1.9	Efeito do LQM01 sobre o influxo de Ca ⁺² através dos canais de Ca ⁺² operados por voltagem em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio isolada de rato SHR-----	55
6.2	Estudos Farmacológicos com LQM01 <i>in vivo</i> -----	56
6.2.1	Efeito do LQM01 sobre PAM e FC em ratos SHR não anestesiados-----	56
6.2.2	Efeito de um depressor do SNC (tiopental sódico - 45 mg/kg, i.p.) sobre as respostas hipotensora e bradicárdica induzida por LQM01 em ratos SHR-----	57
6.2.3	Efeito anti-hipertensivo induzido por LQM01 em ratos SHR não anestesiados-----	57
7	DISCUSSÃO -----	59
8	CONCLUSÕES -----	68
9	PERSPECTIVAS -----	69
	REFERÊNCIAS -----	70

1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho enfoca o estudo sobre derivados aminoguanidínicos, moléculas bioativas, e os efeitos cardiovasculares de alguns exemplares em um modelo de hipertensão animal.

A Aminoguanidina e seus derivados têm apresentado em diversos ensaios farmacológicos efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular, como redução ou prevenção de hipertrofia vascular e cardíaca (Soulis et al., 1999; Chang et al., 2006; Stadler et al., 2005), bem como atenuação do aumento da pressão arterial dependente da idade em ratos espontaneamente hipertensos (Wang et al., 2007). Importante mencionar também, o fármaco Guanabenz, um derivado aminoguanidínico, muito utilizado na prática clínica para tratar hipertensão (Holmes et al., 1983; Nguyen et al., 2014).

Embora, novas drogas anti-hipertensivas mais eficazes tenham sido produzidas a cada ano, os efeitos adversos promovido por estes e a conseqüente baixa taxa de adesão farmacológica (Al-Salahi, 2014) contribui amplamente para falta de controle dos níveis de pressão arterial em pacientes hipertensos, resultando assim em implicações de elevada morbimortalidade (Valenzuela-flores, 2016).

Diante do exposto, a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos são fundamentais, visto que, consiste em utilizar-se de diversas estratégias que tem por objetivo produzir fármacos que sejam capazes de apresentar os efeitos farmacológicos desejados, com menos efeitos adversos, com biodisponibilidade adequada, além de apresentar segurança e eficácia em seu emprego terapêutico (Barreiro, 2002; Saklayen; Deshpande, 2016).

Considerando o amplo espectro de atividades biológicas dos derivados de guanilhidrazonas e o baixo custo de produção, este estudo teve como objetivo a pesquisa de novos derivados com a finalidade de buscar alternativas terapêuticas eficazes e seguras para o tratamento da hipertensão ou como modelos e ferramentas farmacológicas que conduzam ao desenvolvimento de novos fármacos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pesquisa e Desenvolvimento de novos Fármacos

O complexo processo de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos tem avançado nas últimas décadas com destaque para evolução das áreas da Química Medicinal e Farmacologia. O planejamento molecular de novas estruturas tem como principal objetivo sintetizar substâncias capazes de apresentarem os efeitos farmacológicos desejados, com biodisponibilidade adequada ao seu emprego terapêutico, seguro e confortável (Barreiro, 2002; Bohnert et al, 2016).

Diversas estratégias da Química Medicinal podem ser empregadas no desenho molecular de novos candidatos a agentes terapêuticos ou novos protótipos de fármacos, sendo também cruciais na etapa de modificação molecular necessária à sua otimização, diminuindo efeitos colaterais e aumentando sua potência, por exemplo (Barreiro, 2009). Dentre algumas alterações que podem ser realizadas, a mudança de vias metabólicas podem modular propriedades farmacocinéticas, prolongar o tempo de meia vida, melhorar a estabilidade metabólica e a biodisponibilidade do composto otimizado. Os métodos para mudar vias metabólicas e melhorar a estabilidade incluem bloqueio do sítio metabólico, redução da lipofilicidade, mudança do tamanho do anel e uso de pró-fármaco (Wang; Liu, 2013).

Das muitas estratégias existentes se destacam a simplificação molecular, a hibridação molecular e o bioisosterismo, (Barreiro, 2009). A hibridação molecular envolve o desenho racional de novos fármacos com base no reconhecimento de sub-unidades farmacofóricas de estrutura molecular de dois ou mais compostos bioativos conhecidos que, através da adequada fusão destas sub-unidades, levará à concepção de uma nova arquitetura híbrida que mantém características pré-selecionados do modelos originais, porém com maior afinidade e potência quando comparado com o protótipo (Fraga, 2009; Zhan et al, 2013). A seleção de dois princípios em um composto com atividade dual é geralmente baseado em sua atividade farmacológica sinérgica ou aditiva tornando possível o desenvolvimento de novas entidades químicas altamente ativas (Guantai et al, 2010). Já a simplificação estrutural representa uma estratégia de planejamento de fármacos com intuito de encurtar rotas sintéticas, mantendo ou melhorando a atividade biológica do modelo original (Crisostomo et al, 2006).

A abordagem de hibridação molecular é uma das ferramentas de modificação estrutural mais valiosa para a descoberta de ligantes e protótipos que apresentam tanto afinidade otimizada para um bioreceptor ou a capacidade para modular mais de um bioreceptor associado com a doença alvo. Utilizando esta abordagem foi possível sintetizar diversas novas substâncias, tais como uma série de derivados do composto Vanilina que foi desenhada, sintetizada e sua atividade biológica foi testada frente a algumas bactérias. No contexto de resistência patogênica aos fármacos já utilizados na terapêutica, a elaboração de novos tipos de agentes antibacterianos é uma tarefa importante para prevenção de sérios problemas de saúde. Muitos dos derivados testados exibiram potente atividade inibitória, assim, os resultados impressionantes destas novas moléculas aumentaram o interesse em híbridos a fim de explorar as suas possibilidades como potenciais agentes antibacterianos (Sun et al, 2014).

Na química medicinal moderna a estratégia chamada “scaffold hopping” tem por objetivo descobrir novos compostos estruturais a partir de compostos ativos conhecidos modificando a estrutura do núcleo central da molécula. Esta tem sido amplamente aplicada pelos químicos medicinais para descobrir compostos equipotentes com novas estruturas químicas com propriedades melhoradas (Sun; Tawa ;Wallqvist, 2012). Sua aplicação tem gerado diversas moléculas com estrutura química nuclear completamente diferente, no entanto, se ligando ao mesmo receptor. Um dos primeiros exemplos de “scaffold hopping” bem sucedido foi a descoberta de ligandos de receptor tipo GABA a partir do núcleo da benzodiazepina. Após a sua descoberta na década de 1950, muitas tentativas foram realizadas para melhorar a sua farmacocinética e farmacodinâmicas, alterando substituintes ou mudando para uma estrutura completamente nova resultando em: Zopiclone, Zolpidem e Zaleplon (Bohm; Flohr; Stahl, 2004).

A modificação ou variação molecular, utilizando principalmente o conceito de bioisosterismo, é o método mais frequentemente utilizado como estratégia para descoberta de novos protótipos de fármacos (Koorolkovas, 1977; Barreiro, 2001). Em seu significado mais amplo no bioisosterismo pode-se analisar a influência da modificação de um átomo ou de um grupo de átomos por seu bioisótero sobre a atividade biológica que o fármaco original apresenta, podendo ser mais ativo, ter ação idêntica ou mesmo antagônica.

O sucesso desta estratégia no desenvolvimento de novas substâncias terapêuticamente úteis tem apresentado um crescimento significativo em diferentes classes terapêuticas, sendo

amplamente utilizada pela indústria farmacêutica na descoberta de novos análogos de inovações terapêuticas comercialmente atrativas, e também como uma ferramenta útil na modificação molecular. Pode haver inúmeras razões para o uso do bioisosterismo na projeção de novas drogas, incluindo a necessidade de melhorar a atividade farmacológica, maior seletividade para um determinado receptor ou isoforma enzimática, com simultânea redução de certos efeitos adversos, ou mesmo otimizar a farmacocinética que o novo composto possa apresentar (Lima ; Barreiro, 2005).

Utilizando as técnicas de bioisosterismo e hibridação molecular uma série de novos derivados foram desenhados e sintetizados como estratégia de planejamento racional de novos protótipos de fármacos, e foram avaliados frente sua potencial atividade cardiovascular. Para tanto, utilizamos como inspiração a estrutura molecular de fármacos com atividade cardiovascular a qual apresenta em sua estrutura a guanidina.

2.2 Guanilhidrazonas

Guanilhidrazonas são derivados guanidínicos e representam uma classe de compostos que apresenta atividades farmacológicas em diversos níveis. Elas derivam do mesmo quimiotipo das aminoguanidinas (França et al., 2016) e compreendem diferentes classes químicas, contendo grupo amidina (guanil), ligados ao grupo hidrazona (Walzer et al., 1994; Mitchel et al., 1998). Derivados da guanidina são moléculas bioativas amplamente estudadas as quais exibem diversos efeitos biológicos, dentre os quais pode-se destacar: atividade anti-hipertensiva, antitumoral, antileucêmica, tripanocida, depressora do sistema nervoso central, inibidora da agregação plaquetária, antibacteriana, antiviral e antimalarial (Martins et al., 2004).

Ensaio clínico e pré-clínico com derivados guanidínicos tem sido extensivamente avaliados revelando compostos com eficiente ação anti-câncer, como o metilglioxal-bis (MGBG), composto protótipo desta classe, *m*-iodobenzilguanidinas (MIBG), piridilcianoguanidina (CHS 828) e MGBG também têm mostrado promissora atividade antitumoral em modelos de tumor pré-clínico, na prática clínica o mitoguzone também se apresentou eficaz no tratamento de diversos tipos de carcinomas (Ekelund et al., 2001; Andreani et al., 2004, 2006). Bis-guanilhidrazona revelou-se como um novo quimiotipo para o desenvolvimento de potentes e seletivos inibidores de Chk2, uma proteína quinase envolvida

na cascata de apoptose celular, esta classe de medicamentos podem ser muito úteis associadas a outros quimioterápicos utilizados na clínica (Jobson et al., 2007).

Análises da relação estrutura-atividade apontam o grupo guanidino fundamental para atividade citotóxica em células leucêmicas (Smets et al., 1988). No entanto, estes derivados, em geral, podem apresentar sintomas relacionados à sua alta toxicidade, hepatotoxicidade, hipoglicemia irreversível e cardiotoxicidade (Janne et al., 1991).

As guanilhidrazonas e sua relação estrutura-atividade têm sido amplamente estudadas em função da sua atividade anti-tripanicida, centenas de derivados de guanilhidrazonas foram sintetizadas e avaliadas (Ulrich; Cerami, 1984; Sundberg et al., 1990; Papanastasiou et al., 2008). Esta área apresenta alto interesse na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, em virtude dos altos índices de morbidade e mortalidade causados por tripanossomas em países pobres como a África (Walzer et al., 1994), em países tropicais e alguns países da América Latina (Who, 2005). A facilidade de síntese e o baixo custo de produção dos derivados de guanilhidrazonas contribuem para sua intensa pesquisa.

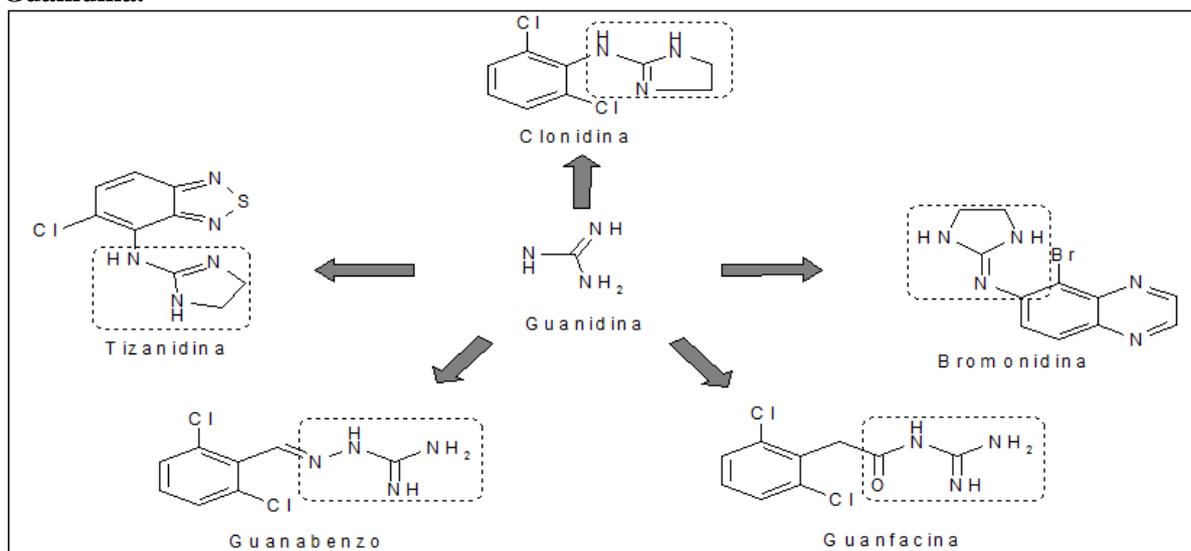
A síntese e relação estrutura-atividade de uma série homóloga de compostos bis-guanilhidrazonas com funções hidrofóbicas foram analisadas como potenciais agentes antimicrobianos, onde a primeira geração destes compostos foi hábil em se ligar e neutralizar lipopolissacarídeos (LPS), endotoxina bacteriana gram-negativa, com potência comparável a Polymixim B, um antibiótico que atua seqüestrando LPS (Khownum et al., 2006). Wu e colaboradores investigaram a relação estrutura-atividade de um conjunto de congêneres de análogos de guanilhidrazonas sobre a capacidade de seqüestrar LPS, onde as moléculas de guanilhidrazonas não substituídas mostraram-se ligeiramente mais ativas que a série N-alquilguanilhidrazonas (2009).

A aminoguanidina (AG) é o protótipo de agentes sequestradores que inibem a formação de AGEs, produto final de glicação avançada, um grupo heterogêneo e complexo de compostos que acumula-se lentamente em tecidos renais e vascular ao longo da vida e em uma taxa muito maior na Diabetes, podendo estar relacionada ao dano vascular observado nesta doença. Alguns estudos relatam efeitos redutores da deterioração derivada da Diabetes após o tratamento com AG em ratos diabéticos induzidos por streptozotocina (STZ), como glomerulosclerose (Parving, 2001), hipertrofia vascular (Soulis et al., 1999) relaxamento aórtico insuficiente (Ozyazgan et al., 2000) e ação preventiva sobre o enrijecimento arterial e hipertrofia cardíaca (Chang et al., 2006; Stadler et al., 2005). Wang e colaboradores

demonstraram que o tratamento crônico com AG em ratos SHR, atenua o aumento da pressão arterial dependente da idade, que parece estar relacionada com a redução dos níveis de Metilglioxal, um metabólito da glicose induzido por AGEs, que contribui para a patogenia da hipertensão, pois causa remodelamento vascular e indução de disfunção endotelial presente em SHR (Wang et al., 2007).

Um representante das guanilhidrazonas com ação farmacológica importante sobre o sistema cardiovascular é o Guanabenz, um agonista α -adrenérgico usado como agente anti-hipertensivo (Holmes et al., 1983). Outros derivados guanidínicos que apresentam semelhantes efeitos farmacológicos são: a clonidina que tem como principais ações a alteração da pressão arterial e da frequência cardíaca (Noronha Neto et al., 2017); a guanfacina que é um agonista α_2 -adrenérgico mais seletivo que a clonidina; o guanabenz que é um agonista α_2 de ação central, que diminui pressão arterial por um mecanismo semelhante ao da clonidina e da guanfecina (Dudek et al., 2015). Além da tizanidina que é também um agonista de receptores α_2 , com algumas propriedades semelhantes às da clonidina. E, finalmente (Cortes et al., 2014), a bromonidina que é também um agonista dos receptores α_2 -adrenérgicos sendo administrado ocularmente para reduzir a pressão intra-ocular (Figura 1) (Chi et al., 2013).

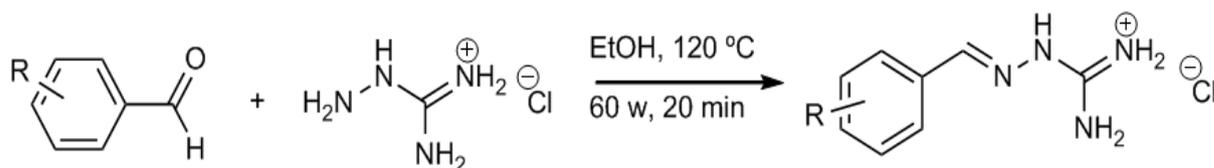
Figura 1: Fármacos que apresentam atividade cardiovascular e têm em sua estrutura a Guanidina.



Fonte: Adaptado de Epifânio, 2011.

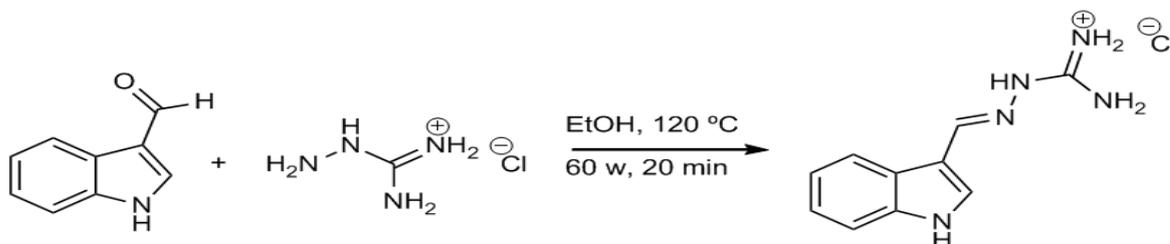
Foram obtidos 14 derivados aminoguanidínicos, os mesmos foram cedidos pelo prof. Dr João Xavier de Araújo Junior da Escola de Enfermagem e Farmácia (Esenfar), Universidade Federal de Alagoas. Após a identificação da unidade de guanidina, como o grupo farmacofórico essencial para a atividade. Em particular, o objetivo foi realizar uma sistemática exploração do grupo arilo que permite a introdução de vários substituintes no fenil anel (Figura 2). Para a obtenção do derivado LQM01 foi utilizado 3-indolcarboxaldéido (1,1 eq.) com cloridrato de aminoguanidina (1 eq.) obtendo o produto com um rendimento de 98% (Figura 3).

Figura 2: Método geral de obtenção de guanilidrazonas:



Partiu-se de vários aldeídos aromáticos substituídos e do cloridrato de aminoguanidina (estequiometria de 1,1:1, respectivamente), em etanol, a 120 °C, em micro-ondas programado com potencia de 60 watts, durante 20 minutos.

Figura 3: Síntese do LQM01:



Partiu-se de 3-indolcarboxaldéido (1,1 eq.) com cloridrato de aminoguanidina (1 eq.). Produto obtido com um rendimento de 98%.

2.3 Considerações sobre Hipertensão e Ratos Espontaneamente Hipertensos

A hipertensão é um grave problema de saúde pública, acometendo cerca de um terço de jovens adultos, quase dois terços dos indivíduos com idade superior a 60 anos, e em aproximadamente 75% dos indivíduos com mais de 70 anos (Abel, 2015). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) a hipertensão afeta cerca de um bilhão de pessoas em todo o mundo e contribui para aproximadamente 9,4 milhões de mortes por doenças cardiovasculares a cada ano. Além disso, estima-se que até o ano 2030, 23 milhões de mortes

cardiovasculares são projetados para serem devido à hipertensão (Shrivastava, 2014). Esta doença é classificada como crônica e de difícil controle, estima-se ainda que metade dos indivíduos hipertensos não consiga atingir valores ótimos de PA (Valenzuela-flores, 2016). Uma das principais causas para esta falta de controle é a baixa taxa de adesão aos tratamentos anti-hipertensivos, que segundo as VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (2010), a taxa de abandono, grau mais elevado de falta de adesão, é crescente após o início da terapêutica, resultando assim em implicações de elevada morbimortalidade.

O diagnóstico da Hipertensão Arterial Sistêmica é realizado através da detecção de níveis elevados e sustentados de PA pela medida casual. A elevação duradoura da PA \geq 140/90 mmHg é definida de modo convencional como hipertensão primária ou essencial sendo considerada uma condição clínica multifatorial, a qual, de acordo com numerosos estudos, resulta da interação de vários genes com fatores ambientais (SBC/VI-DBH, 2010), que além da predisposição genética, também estão associados a uma série de fatores de risco como: obesidade, consumo elevado de álcool e inatividade física (Islam, 2015). A hipertensão, quando não tratada de modo eficaz, pode estar associada a complicações, tais como doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica, doença vascular, má qualidade de vida e, eventualmente, a morte os quais apresentam custos médicos e socioeconômicos elevados (Shrivastava, 2014). Pode ser considerada uma verdadeira síndrome quando vem acompanhada de alteração no metabolismo lipídico e glicídico, obesidade e resistência à insulina (Jordan, 2016).

Uma subpopulação emergente de hipertensos resistentes a terapia, torna-se cada vez mais evidente, contrastando com a conscientização global e consequente melhora do controle da hipertensão nos Estados Unidos (Sim et al, 2013), segundo the seventh Joint National Committe a hipertensão é definida como resistente devido à incapacidade do paciente responder a três agentes antihipertensivos de diferentes classes, um dos quais deverá ser um diurético (Lithovius et al, 2014). Embora as implicações específicas da Hipertensão resistente (HR) não tenham sido bem elucidadas, esta é frequentemente associada com fatores de risco cardiovasculares, tais como a diabetes mellitus, obesidade, idade avançada, apneia obstrutiva do sono, hipertrofia do ventrículo esquerdo e doença renal crônica. Entre os pacientes em um estudo de coorte retrospectivo, realizado nos EUA, aqueles com HR tinham uma taxa mais elevada de eventos cardiovasculares, ao longo do período médio de acompanhamento de 3,8 anos, do que os com não-HR (Lee et al, 2016). Em razão de apresentarem maior risco

cardiovascular compreendem uma população-alvo para novos fármacos anti-hipertensivos. Algumas intervenções como a ativação dos barorreceptores, desnervação simpática renal e redução da atividade do sistema nervoso simpático reduziram efetivamente a PA nos primeiros ensaios clínicos de hipertensão resistente (Judd, 2013).

O manejo da pressão arterial de alta qualidade é multifatorial e requer o engajamento de pacientes, profissionais e sistemas de saúde, familiares e comunidades. Isso inclui expandir a consciência do paciente e do profissional de saúde, modificações de estilo de vida adequado, o acesso aos cuidados, tratamento individualizado, um elevado nível de adesão à medicação e acompanhamento adequado (Mancia et al, 2013). Reconhecendo a necessidade urgente de um controle adequado, a American Heart Association (AHA) colocou a hipertensão como foco principal do seu plano estratégico 2014-2017, com o objetivo de melhorar a saúde cardiovascular dos americanos em 20% reduzindo a taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares e acidente vascular cerebral em 20% até 2020 (Go et al, 2014).

Embora, nos últimos cinquenta anos, um longo caminho tenha sido percorrido em busca do tratamento eficaz no manejo da hipertensão, introduzindo progressivamente no mercado farmacêutico drogas anti-hipertensivas com melhor eficácia, eles ainda possuem sérios efeitos adversos (Al-Salahi, 2014), além disso, a incompleta compreensão, em alguns aspectos, da fisiopatologia da hipertensão denominada “essencial” ou mesmo a hipertensão resistente, contribui para o insucesso do controle pressórico do tratamento farmacológico atual. Permanecendo para o presente século o desafio da pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos e estratégias (Saklayen; Deshpande, 2016)

Estudos farmacológicos em busca de novos agentes anti-hipertensivos têm apresentado grande avanço com uso de modelos animais os quais apresentam grande semelhança fisiopatológica. A participação de fatores genéticos determinando a elevação da PA tornou possível a seleção de ratos geneticamente hipertensos, entre estes podemos citar os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) desenvolvidos por Okamoto e Aoki e seus respectivos controles Wistar Kyoto (WKY). SHR é o modelo animal mais utilizado da hipertensão essencial, distúrbio metabólico e hipertrofia ventricular (Pravenec et al, 2014). Esse apresenta grande importância devido à similaridade da sua fisiopatogenia com a hipertensão essencial no homem, ambas têm origem poligênica, não expressam certos mecanismos pressores e são influenciadas por fatores ambientais; sendo o controle

cardiocirculatório multifatorial. A hipertensão no rato adulto está associada a um aumento da resistência periférica total e um débito cardíaco normal ou diminuído (Pravenec et al, 2013).

Estudos com SHR revelam que o aumento da resistência periférica total esta associada à redução da distensibilidade e complacência vascular nos animais jovens como resultado de uma hipertrofia da camada média, em vez de alterações intrínsecas das propriedades elásticas dos vasos (Pires, Jackson, Dorrance; 2015). Estes animais apresentam alterações de alguns sistemas de neurotransmissores que podem ter relevância funcional, tais como uma neurotransmissão colinérgica prejudicada característica, além de hipofunção dopaminérgica e hiperatividade noradrenérgica, acredita-se que outros mecanismos além destes tenham participação na manutenção da hipertensão arterial de SHR jovens e velhos (Tayebati, Tomassoni, Amenta, 2012; Mourão et al, 2016).

A hipertensão essencial do homem também está associada com anomalias estruturais no sistema cardiovascular, as quais incluem aumento na relação parede *versus* luz das artérias, aumento na resistência periférica, diminuição da complacência venosa (Pires, Jackson, Dorrance; 2015), aumento da quantidade da massa cardíaca e muscular vascular lisa (Beaumont et al, 2016), além de anomalias intrínsecas na função renal (Liakos et al, 2016).

O aumento da resistência periférica é o fator mais importante na hipertensão essencial, o qual ocorre devido a uma redução do calibre das arteríolas como resultado de alterações na contração da musculatura lisa vascular que regula a luz do vaso ou a espessura da mesma. A contratilidade aumentada das arteríolas de resistência remodelada estruturalmente é mediada pelo influxo de cálcio (através de canais de cálcio dependentes ou operados por voltagem tipo L, L-VOCC) e / ou sensibilização ao cálcio aumentado (Zicha et al, 2014); A variação do tônus vascular pode ser determinada pela atividade simpática, além disso, há evidências de que diferentes hormônios pressores como angiotensina II, noradrenalina, vasopressina e insulina contribuem para o estímulo do crescimento da parede vascular, enquanto as substâncias vasodilatadoras têm efeito oposto, inibindo a proliferação celular, sendo assim, o desequilíbrio dos fatores vasoconstritores e vasodilatadores pode resultar em hipertensão (Behuliak et al, 2013).

2.4 Considerações sobre a Pressão Arterial e Vasorelaxamento

O nível de pressão arterial média (PAM) pode ser determinado por apenas duas variáveis: o débito cardíaco (DC) e a resistência vascular periférica total (RVPT). Os fármacos podem interferir nos valores de PA atuando sobre uma ou ambas as variáveis, o débito cardíaco, por exemplo, pode ser diminuído através da inibição da contratilidade miocárdica ou redução da pressão de enchimento ventricular, sendo essa última conseguida através de ações sobre o tônus venoso ou sobre o volume sanguíneo, via efeitos renais. Já a resistência periférica pode ser reduzida por ações sobre o músculo liso, produzindo relaxamento direto dos vasos de resistência, ou ao interferir na atividade de sistemas que produzem constrição dos mesmos vasos, como é o caso do sistema nervoso simpático (Padmanabhan, Caulfield, Dominiczak, 2015).

Os vasodilatadores e diuréticos são as principais classes de medicamentos anti-hipertensivos usados atualmente, os quais reduzem a resistência vascular periférica e o débito cardíaco, respectivamente (Padmanabhan, Caulfield, Dominiczak, 2015). O DC é determinado pelo produto entre o volume de ejeção sistólico (VES) e a frequência cardíaca (FC). Assim sendo, a FC participa da homeostase da PAM como um de seus determinantes primários (McCarty e Shaffer, 2015).

Deste modo, os níveis de PA são regulados por meio de alterações na resistência total e no DC através da ação integrada dos sistemas cardiovascular, renal, neural e endócrino. Os mecanismos regulatórios promovem o controle da PA a curto prazo (neurais), expressando-se em segundos a minutos; a médio prazo (hormonais), em minutos e a longo prazo (aldosterona e sistema rim-volume), que pode ser expresso em horas ou dias (Campagnole-Santos; Haibara, 2001).

O controle neural é feito por meio de eferências do sistema nervoso autônomo, atuando sobre o coração e os vasos. Os barorreceptores arteriais, os quimiorreceptores e os receptores cardiopulmonares bem como a resposta sistêmica do sistema nervoso central (SNC) correspondem aos mecanismos neurais. Os barorreceptores, localizados no arco aórtico e no seio carotídeo, quando estimulados por aumento súbito na PA, reduzem o tônus do sistema nervoso simpático (SNS) para os vasos e coração, promovendo redução da PA e FC pelas vias eferentes vagais, por ativação da via parassimpática (Guyton, 2002; Guyenet, 2006; Karemaker; Wesseling, 2008) Os quimiorreceptores são responsáveis pela regulação local do

tônus da musculatura lisa dos vasos, sendo ativados pela redução de O_2 ou excesso de CO_2 e H^+ (Lohmeier et al., 2016).

Os mecanismos hormonais implicam tanto na elevação da PA através do sistema catecolaminérgico (através da adrenalina e da noradrenalina), o sistema renina-angiotensina e o hormônio antidiurético, como na redução da PA através da liberação do peptídeo natriurético atrial e o sistema calicreína-cininas, assim como as substâncias produzidas localmente pelo endotélio (óxido nítrico, endotelinas e prostaglandinas) (Evora et al., 1995).

A base do controle a longo prazo da PA é o sistema renal e de líquidos corpóreos. A regulação de volume dos líquidos corpóreos (volemia) é efetuada pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona, essencial ao equilíbrio hidroeletrólítico do corpo, que em conjunto são responsáveis pela elevação da PA. O rim atua na regulação da PA através da secreção da renina, a qual converte o angiotensinogênio (produzido pelo fígado) em angiotensina I (Ang I), que pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) é convertida em angiotensina II (Ang II). Este peptídeo atua no sistema cardiovascular promovendo vasoconstrição, aumento da contratilidade cardíaca, hipertrofia cardíaca, nos rins reabsorção tubular de sódio, além de estimular a secreção de aldosterona (Ruan et al, 2010). O equilíbrio dos sistemas vasodilatadores e vasoconstritores se apresenta decisivo na regulação do tônus vascular, onde a PA elevada é causada por alterações da atividade dos mecanismos vasoativos. Na maioria dos modelos de hipertensão experimental, o aumento da PA é resultado do desequilíbrio entre a hiperatividade simpática e deficiência vasodilatadora, que pode ser visto em modelos de SHR e ratos Dahl e sal-sensíveis (Pintérová et al, 2009). O sistema nervoso simpático é um dos maiores sistemas constritores envolvidos na regulação da PA. Este sistema induz contração da musculatura lisa vascular (MLV) por ativar o influxo de Ca^{2+} , através dos canais para cálcio sensíveis a voltagem (Ca_v), aumentando os níveis de cálcio intracelular (Pintérová; Kuneš; Zicha, 2011).

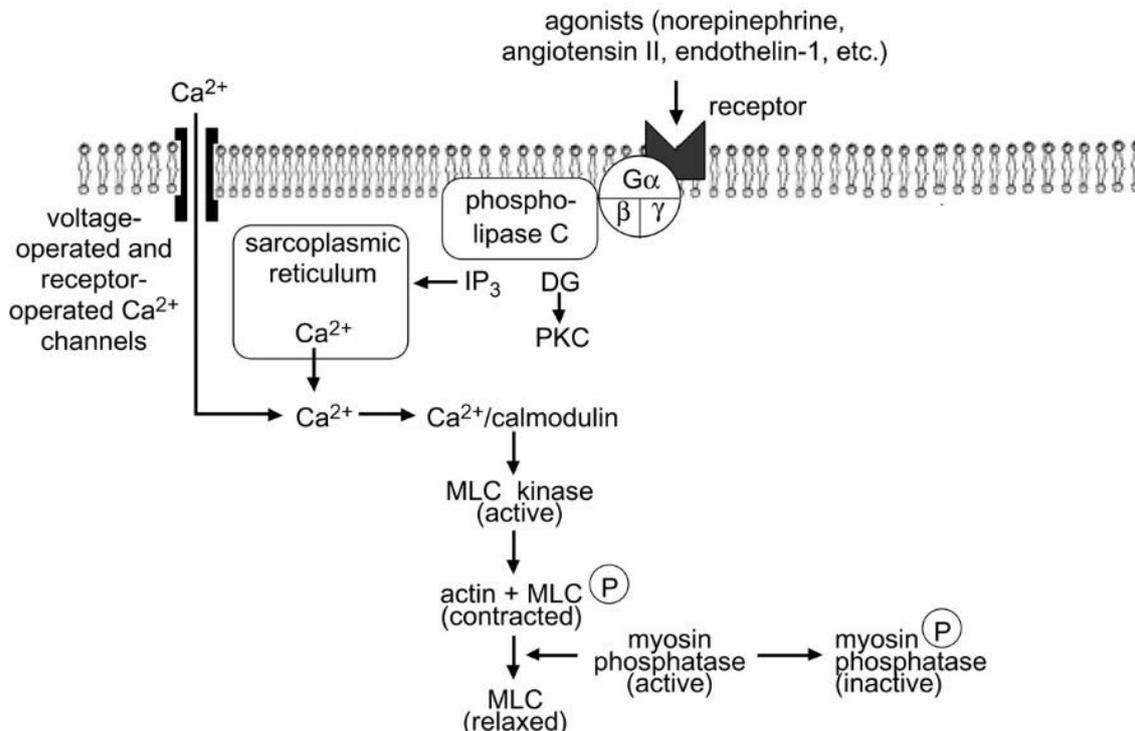
Um dos principais determinantes do tônus vascular, a concentração de cálcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$, é controlada através do potencial de membrana, ao mesmo passo que os níveis de cálcio intracelular também afetam o potencial de membrana, deste modo, o cálcio exerce um controle sobre este, regulado por canais iônicos, trocadores e ATPases dependentes de cálcio (Pintérová; Kuneš; Zicha, 2011). Os canais iônicos presentes na membrana plasmática da musculatura lisa vascular (MLV), assim como as células endoteliais desempenham papel fundamental na manutenção do tônus vascular. Do mesmo modo que os

vasoconstritores dependem da elevação da concentração de Ca^{2+} intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para induzir contração da MLV. As células endoteliais promovem relaxamento das células da musculatura lisa vascular (CMLVs) adjacentes por meio do aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Portanto, o nível da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nas células endoteliais e CMLVs é essencial para a precisa regulação de órgãos e tecidos (Ledoux et al., 2006).

O influxo de Ca^{2+} do meio extracelular se dá através dos canais para cálcio dependente de voltagem do tipo lento (Cav-L), ativado em resposta a uma despolarização de membrana, e dos canais para Ca^{2+} operados por receptores, convém ressaltar que a liberação de Ca^{2+} pelos estoques do retículo sarcoplasmático também são fundamentais para o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$. O influxo de Ca^{2+} na célula é favorecido pela diferença de gradientes químico dos íons Ca^{2+} (Sanders, 2001) e a manutenção deste gradiente é realizado pela atuação das Ca^{2+} ATPase da membrana plasmática (PMCA) e do retículo sarcoplasmático (SERCA) e do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ nas células CMLVs (Floyd; Wray, 2007). Além do cálcio, os íons fosfato representam ferramenta universal na transdução de sinal, pois ambos possuem capacidade de alterar os campos eletrostáticos e a conformação protéica (Calpham, 2007).

O processo contrátil da CMLVs inicia com o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que, assim como o DAG*, pode promover a ativação da proteína cinase C (PKC), a qual fosforila proteínas alvo específicas e Cav-L (Webb, 2003). A estimulação da via da fosfolipase C (PLC), após a ativação de receptores de membrana por ligantes específicos, promove subsequentemente hidrólise dos fosfolipídeos de membrana 4,5-bisfosfato de inositol (PIP_2) e produção do diacilglicerol (DAG*) e 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) (Chalmers et al., 2007). O IP_3 ativa receptores sensíveis ao IP_3 (IP_3R) presentes no retículo sarcoplasmático permitindo a liberação Ca^{2+} , que por sua vez ativa os receptores de rianodina, processo esse denominado de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (CIRC). O Ca^{2+} no meio intracelular das CMLVs forma um complexo com a calmodulina, Ca^{2+} -calmodulina $[(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CAM}]$ (Paulis et al. 2007). Este complexo promove à ativação da enzima cadeia leve de miosina cinase (MLCK), que promove a fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC) permitindo que a miosina interaja com a actina e o trifosfato de adenosina (ATP), resultando na ligação da ponte cruzada da miosina com a actina e conseqüente contração muscular (Figura 4).

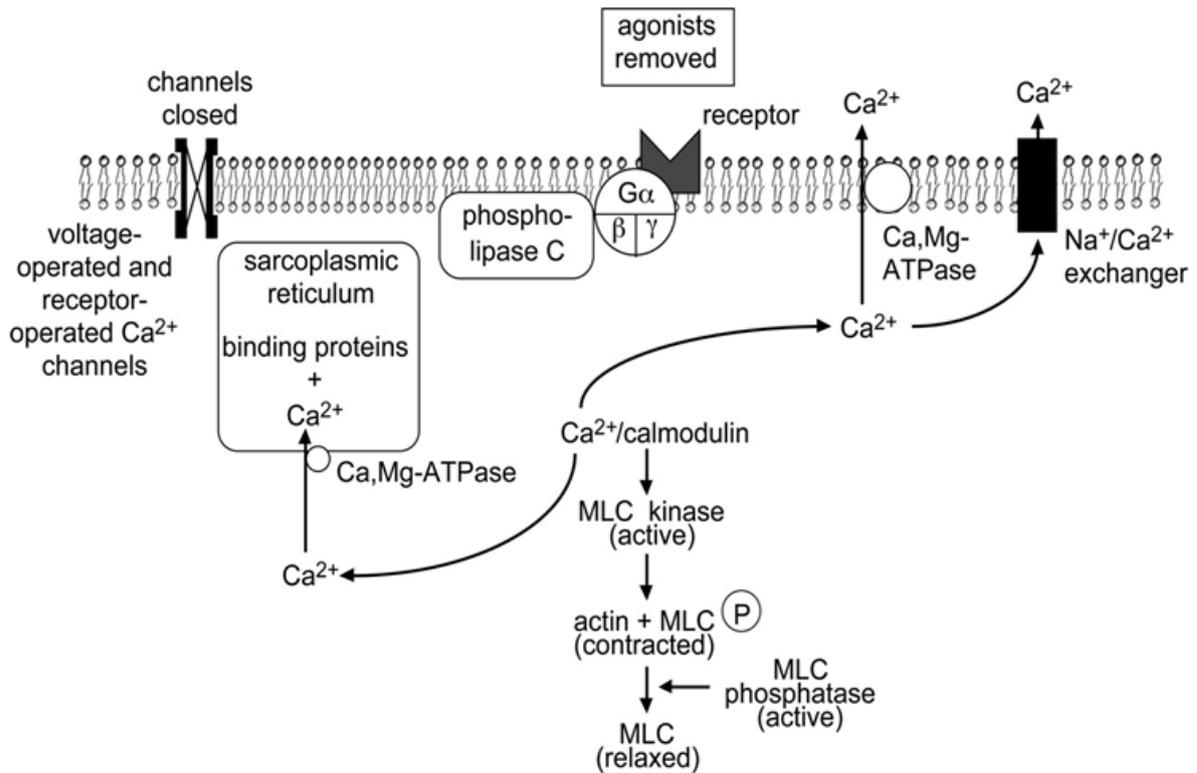
Figura 4 – Representação esquemática do mecanismo de contração do músculo liso vascular.



Vários agonistas (neurotransmissores, hormônios, etc.) se ligam a receptores específicos para ativar a contração no músculo liso. Subsequentemente a esta ligação, a resposta prototípica da célula é aumentar a atividade da fosfolipase C através do acoplamento através de uma proteína G, que resulta em produção de dois potentes segundos mensageiros: IP₃ e DAG e consequente aumento de Ca²⁺ intracelular, a proteína calmodulina liga-se ao Ca²⁺, levando à ativação da quinase de cadeia leve de miosina (MLC quinase). Esta cinase fosforila a cadeia leve da miosina, e, em conjunto com a actina, ocorre o ciclo entre pontes, iniciando o encurtamento da célula do músculo liso. (Adaptado de WEBB, 2003).

O relaxamento muscular ocorre quando há redução da [Ca²⁺]_i interrompendo o complexo Ca²⁺ - calmodulina, inativando a MLCK e ativação da fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP) que remove os fosfatos de alta energia (Webb, 2003). Portanto, a Ca²⁺ - calmodulina e MLCP controlam a atividade da MLCK por meio de fosforilação e desfosforilação da MLC regulando assim o diâmetro dos vasos (Hill et al., 2006, Webb, 2003) (Figura 5).

Figura 5 – Representação esquemática do mecanismo de relaxamento do músculo liso vascular.



O vasorrelaxamento ocorre como resultado da remoção do estímulo contrátil ou por ação direta através de substâncias que estimulam a inibição do mecanismo contrátil. Independentemente, o processo de relaxamento requer uma diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular e aumento da atividade da MLC fosfatase. O retículo sarcoplasmático e a membrana plasmática contêm Ca, Mg-ATPases que removem Ca^{2+} do citosol. O trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ também estão localizados na membrana plasmática e ajudam na diminuição do Ca^{2+} intracelular. Durante o relaxamento, os canais Ca^{2+} operados pelo receptor (ROCCs) e pela voltagem (VOCCs) na membrana plasmática se fecham resultando em uma entrada reduzida de Ca^{2+} na célula. (Adaptado de WEBB, 2003).

Neste estudo, buscou-se avaliar o efeito vasorrelaxante de derivados aminoguanidínicos sintéticos, além de caracterizar *in vitro*, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR, e *in vivo*, em ratos SHR conscientes, os efeitos cardiovasculares e o mecanismo de ação do derivado que apresentou maior potencial terapêutico para o tratamento anti-hipertensivo, o LQM01.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos cardiovasculares induzidos pelo derivado LQM01 através de uma abordagem *in vivo* e *in vitro*.

3.2 Específicos

- Testes *in vitro*

- Avaliar o efeito dos 14 derivados aminoguanidínicos sintéticos sobre artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR.
- Avaliar o efeito citotóxico dos 14 derivados aminoguanidínicos sintéticos sob macrófagos da linhagem (J774).
- Investigar o efeito do derivado LQM01 sobre artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR, com ênfase para a avaliação do papel dos canais de membrana.

- Testes *in vivo*

- Caracterizar o efeito agudo a partir da administração intravenosa (i.v.) do derivado LQM01 sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos SHR não-anestesiados;
- Investigar os possíveis mecanismos de ação implicados nos efeitos *in vivo* induzidos pelo derivado LQM01 em ratos SHR não-anestesiados através do uso de ferramentas farmacológicas específicas;
- Caracterizar a atividade anti-hipertensiva a partir do efeito subcrônico da administração oral do derivado LQM01 sobre a PA e FC em ratos SHR.

4 MATERIAL

4.1 . Obtenção dos derivados aminoguanidínicos

Para obtenção dos derivados aminoguanidínicos partiu-se de quantidades equimolares de aldeídos aromáticos e cloridrato de aminoguanidina, os reagentes foram colocados simultaneamente dentro de um balão de 50 mL de fundo redondo acoplado a um condensador de refluxo. Adicionou-se 5 mL de etanol PA e uma barra magnética. A mistura reacional obtida foi levada à refluxo durante 12 horas. Ao final deste tempo, todo o material de partida havia sido consumido e, em alguns casos, observava-se a formação de um precipitado.

O etanol foi evaporado completamente e ao produto obtido foi adicionado acetato de etila. Após trituração, a suspensão obtida foi filtrada sob vácuo e os produtos foram obtidos em rendimentos quantitativos. 14 derivados foram isolados, identificados e cedidos pelo prof. Dr João Xavier de Araújo Junior da Escola de Enfermagem e Farmácia (Esenfar), Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

4.2 Avaliação da Atividade Farmacológica

4.2.1 Animais

Em todos os protocolos experimentais foram utilizados Ratos machos Espontaneamente Hipertensos (SHR).

Todos os animais pesando entre 250 e 350 g foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal da UFAL. Estes animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas (6-18 horas), tendo livre acesso à alimentação e água. Todos os animais utilizados neste trabalho foram manipulados de acordo com normas estabelecidas pela Comissão de Ética da UFAL (MEZADRI et al., 2004). Todos os experimentos desenvolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL (CEP), certidão número 44/2014.

4.2.2 Drogas e Reagentes

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes ferramentas farmacológicas: tiopental sódico (Cristália), sal sódico de heparina (Roche), cloridrato de acetilcolina (ACh), cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN), nitroprussiato de sódio (NPS), glibenclamida (GLIB), 4-aminopiridina (4-AP), tetraetilamônio (TEA) (todas da sigma). As substâncias foram dissolvidas em água destilada. Todas as substâncias foram diluídas em água destilada (experimentos *in vitro*) ou salina (experimentos *in vivo*), para concentrações desejadas.

4.2.3 Soluções Nutritivas

Todas as soluções eram aeradas com mistura carbogênica (95 % O₂ e 5 % CO₂) e mantidas a 37 °C. As soluções nutritivas foram:

Tabela 1: Composição da solução de Tyrode.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	158,3
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,42
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,0
KCl	4,0
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,05
C ₆ H ₁₂ O ₆	5,6

Tabela 2: Composição da solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 80 mM.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	78,3
NaHCO₃	10,0
KH₂PO₄	0,42
CaCl₂.2H₂O	2,0
KCl	80,0
MgCl₂.6H₂O	1,05
C₆H₁₂O	5,6

5 MÉTODO

5.1 Ensaios Farmacológicos

Foram utilizadas duas diferentes formas de abordagens: uma com ensaios farmacológicos *in vitro*, utilizando artéria mesentérica superior isolada, e outra com ensaios farmacológicos *in vivo*, utilizando animais íntegros.

5.2 Ensaios farmacológicos para estudo *in vitro*

5.2.1 Preparações com artéria mesentérica superior isolada de rato SHR.

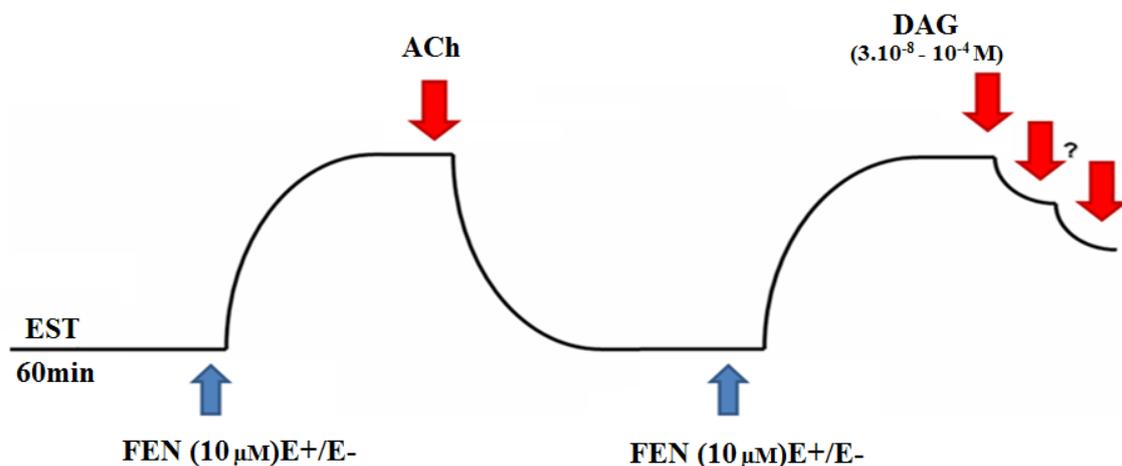
Os ratos foram anestesiados e sacrificados por exsanguinação. Em seguida, através de uma incisão no abdômen do animal, foi retirada a artéria mesentérica superior. Anéis do primeiro segmento da artéria (1 - 2 mm) foram obtidos livres de tecido conectivo e adiposo, e foram mantidos em cubas contendo 10 mL de solução nutritiva de Krebs a 37° C e gaseificada com uma mistura carbogênica (95 % de O₂ e 5 % de CO₂). Os anéis foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força (Dataq, Brasil) acoplado a um sistema de aquisição de dados (Dataq, Brasil) para o registro das contrações isométricas. Cada anel será submetido a uma tensão constante de 0,5g por um período de no mínimo 60 min. Durante este tempo, a solução nutritiva será trocada a cada 15 min. para prevenir a interferência de metabólitos (Altura; Altura, 1970).

Anéis sem endotélio funcional foram obtidos mecanicamente através do atrito entre as paredes internas do vaso. A presença (E+) ou ausência (E-) do endotélio funcional foi verificada pela habilidade, medida em percentagem (%), da ACh (100 µM) em relaxar os anéis pré-contraídos com 10 µM de FEN. Serão considerados com endotélio funcional, os anéis que apresentarem relaxamentos superiores a 70% sobre a pré-contração com FEN. Já os anéis com relaxamentos inferiores a 10%, serão considerados sem endotélio funcional (Furchgott; Zawadzki, 1980) para os protocolos realizados em anéis com ausência de endotélio o mesmo foi removido mecanicamente e foi obtida uma nova curva concentração-resposta.

5.2.2 Curva concentração-resposta dos derivados aminoguanidínicos em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR.

Foi realizado um triagem farmacológico com 15 derivados aminoguanidínicos (DAG), através da obtenção de uma curva concentração-resposta para cada derivado analisado, para tal procedimento, após o período de estabilização de 60 min e posterior verificação do endotélio funcional, como descrito no item 4.2.1, foi induzida uma contração com FEN (10 μ M) (aproximadamente 30 minutos) e concentrações crescentes para cada derivado ($3 \cdot 10^{-8}$ - 10^{-4} M), foram adicionadas às cubas de maneira cumulativa, para obtenção de uma curva concentração-resposta na ausência do endotélio vascular (Figura 6). O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração produzida pelo FEN na ausência do endotélio vascular. A eficácia do efeito vasorelaxante dos derivados foram avaliadas através dos valores do Em_{\max} .

Figura 6: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito dos DAG sobre contração induzida por FEN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR.



5.2.3 Curva concentração-resposta do derivado LQM01 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR com endotélio intacto.

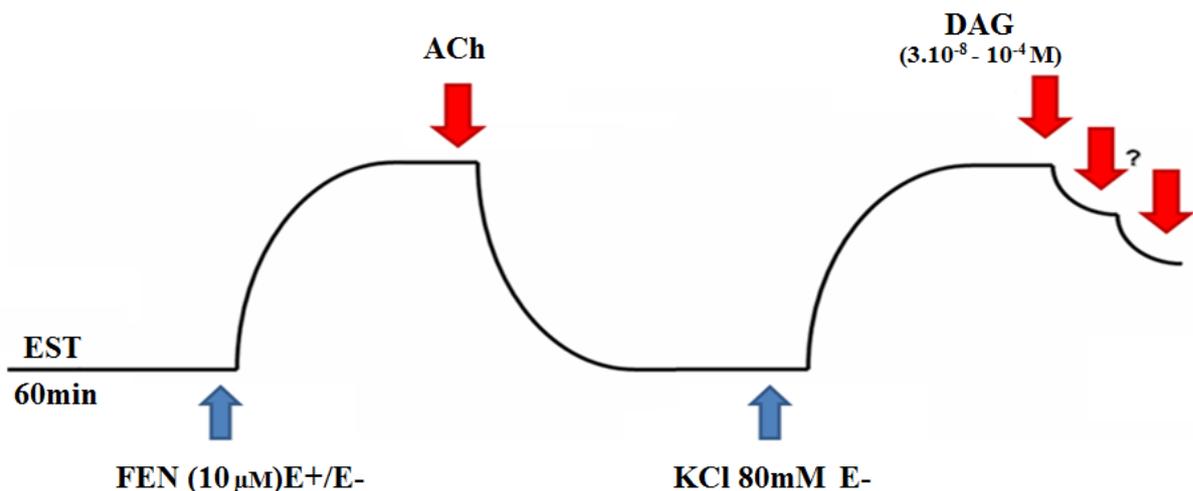
Foi obtida uma curva concentração-resposta como descrito anteriormente no item 5.2.2 com a presença do endotélio funcional intacto (Figura 6). O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração produzida pelo FEN na ausência do endotélio

vascular. A eficácia do efeito vasorelaxante do derivado LQM01 foi avaliada através dos valores do $E_{máx}$.

5.2.4 Efeito do LQM01 sobre as contrações induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR.

Após a verificação da ausência do endotélio funcional, como descrito no item 5.2.1, o meio nutritivo de cada preparação foi trocado por uma solução com elevada concentração de K^+ (KCl 80 mM). Este processo foi então repetido com o objetivo de se obter duas concentrações com magnitude similar para o KCl 80mM. No componente tônico e sustentado da segunda contração, com o tempo médio de 30 minutos para a estabilização, foi adicionado à cuba concentrações crescentes do LQM01 ($3 \cdot 10^{-8}$ - 10^{-4} M) de maneira cumulativa (Figura 7). O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração produzida pelo KCl 80 mM na presença ou na ausência do endotélio vascular. A eficácia do efeito vasorelaxante do LQM01 foi avaliado através dos valores do $E_{máx}$, obtidos para KCl 80mM e FEN.

Figura 7: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do LQM01 sobre contração induzida por KCl 80mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR.



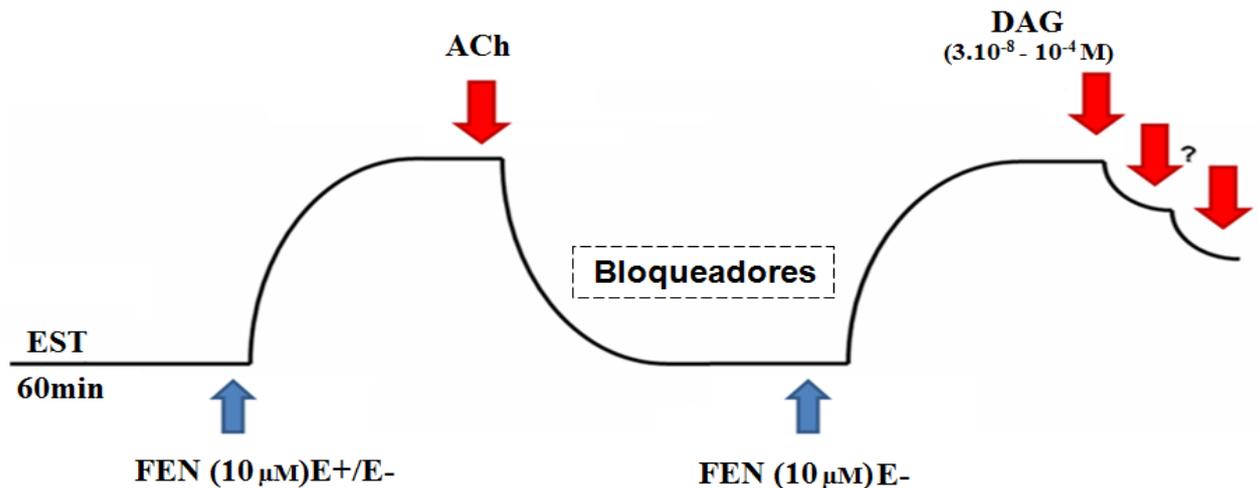
5.2.5 Efeito do LQM01 sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de TEA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR.

Após a verificação da integridade do endotélio, como descrito no item 5.2.1, as preparações eram incubadas com 5 mM de Tetraetilamônio (TEA), bloqueador não-seletivos dos canais de K^+ . Após 30 minutos, era induzida uma nova contração tônica com FEN (10 μ M) e, em seguida, uma curva concentração-resposta cumulativa para LQM01 era obtida (Figura 8). O relaxamento obtido após a adição do bloqueador era comparado com o relaxamento obtido na ausência do bloqueador. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pela FEN. Os valores de CE_{50} foram obtidas por regressão linear ou não-linear, a partir das curvas de relaxamento, obtida na ausência e na presença do bloqueador. Os valores de pD_2 ($-\log CE_{50}$) foram obtidos dos valores de CE_{50} de cada experimento.

5.2.6 Identificação dos canais de K^+ envolvidos na resposta relaxante induzida por LQM01 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR.

Após a verificação da ausência do endotélio, como descrito no item 5.2.1, as preparações eram incubadas separadamente com 10 μ M de GLIB, um bloqueador seletivo de canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), ou com TEA (1 mM), que nesta concentração é considerado um bloqueador seletivo dos canais BK_{ca} (canais para K^+ ativados por grande condutância de Ca^{2+}) ou 4-AP(1mM), 4-Aminopiridina, um bloqueador de canais para K^+ dependentes de voltagem (Brayden, 1996) por 20 minutos antes da pré-contração com FEN (10 μ M) e, em seguida, uma curva concentração-resposta cumulativa para o LQM01 era obtida (Figura 8). Os relaxamentos obtidos após a adição dos bloqueadores foram comparados com os relaxamentos obtidos na ausência dos mesmos. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pela FEN. Os valores de CE_{50} foram obtidos como descrito no item 4.2.5. Os valores de pD_2 ($-\log CE_{50}$) foram obtidos dos valores de CE_{50} de cada experimento.

Figura 8: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do LQM01 sobre as contrações tônicas induzidas por FEN na presença de bloqueadores de canais para K^+ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR



5.2.7 Efeito do LQM01 sobre os canais de Ca^{+2} dependentes de voltagem em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR.

O objetivo deste protocolo foi caracterizar o tipo de antagonismo exercido por LQM01 frente às contrações induzidas por despolarização de membrana. Os experimentos foram realizados em anéis sem endotélio funcional. Nas condições basais de tônus, o Tyrode foi substituído pela solução despolarizante com 60 mM de KCl (curva padrão). As preparações foram lavadas com solução Tyrode livre de Ca^{+2} e nela mantidas por 15 minutos. Em seguida, os anéis foram expostos a solução despolarizante de KCl 60 mM nominalmente sem Ca^{+2} por 15 minutos, e uma curva concentração-resposta cumulativa foi obtida pela adição cumulativa de $CaCl_2$ (3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} , 10^{-3} e 3×10^{-3} M) ao meio. O LQM01 (3×10^{-5} e 10^{-4} M), em preparações individuais, foram incubados por 15 minutos. Após a incubação do LQM01 era feita uma segunda curva cumulativa ao $CaCl_2$. Os resultados foram analisados comparando-se os efeitos máximos (E_{max}) obtidos das curvas com $CaCl_2$ na ausência (controle) e na presença das diferentes concentrações dos dois compostos (Figura 9).

5.3 Ensaio Farmacológicos para Estudos *in vivo*

5.3.1 Medida direta da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos SHR não anestesiados

Ratos foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.), e cateteres de polietileno (PE), um segmento de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente), soldado a um segmento de PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente), preenchidos com solução salina heparinizada (1: 20 v/v), foram implantados na aorta abdominal e na veia cava inferior, via artéria e veia femoral esquerdas, respectivamente. Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal (*scapulae*).

A PA e FC foram medidas 24h após o procedimento cirúrgico pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão (BLPR, AECAD, Brasil) pré-calibrado acoplado a um amplificador (Modelo 04P, AECAD, Brasil) e conectado a um micro-computador equipado com placa conversora analógico-digital usando um software AQCAD (AVS Projetos, SP, Brasil). A frequência escolhida para amostragem dos dados foi de 500 Hz. Para cada ciclo cardíaco, o computador calculará pressão arterial sistólica, diastólica e média, e o intervalo de pulso (referido como frequência cardíaca). O cateter venoso foi implantado para a administração das drogas. Após os experimentos os animais foram eutanasiados com tiopental sódico (i.v.).

5.3.2 Protocolos experimentais para os estudos *in vivo*

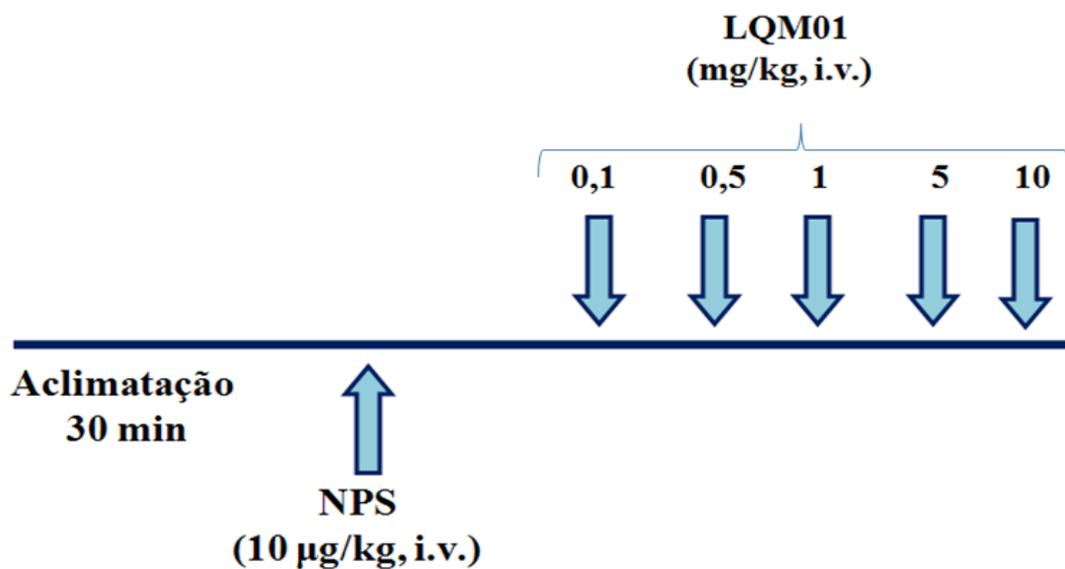
Para obtenção de uma curva dose-resposta, os animais foram mantidos em aclimatação por um período de no mínimo 30 min., para estabilização dos parâmetros cardiovasculares, e em seguida foi administrado nitroprussiato de sódio (10 µg/kg, i.v.) para verificar a eficácia da implantação do cateter venoso. Após 15 min., doses crescentes do derivado LQM01(0,1; 0,5; 1; 5; 10mg/kg) foram administradas de forma randômica pela via endovenosa *in bolus* com intervalos de tempo suficiente para que os parâmetros cardiovasculares retornem aos seus valores da linha de base (Figura 10).

Os valores de PAM e FC foram expressos em porcentagem, computados antes (valores da linha de base) e imediatamente após a administração das substâncias, calculadas através das fórmulas (equação 1 e 2).

$$1) \text{ Valores de PAM (\%)} = \frac{(\text{PAM após} - \text{PAM antes}) \times 100}{\text{PAM antes}}$$

$$2) \text{ Valores de FC (\%)} = \frac{(\text{FC após} - \text{FC antes}) \times 100}{\text{FC antes}}$$

Figura 10: Representação esquemática referente ao protocolo experimental para avaliação do efeito do derivado LQM01 sobre a PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados.



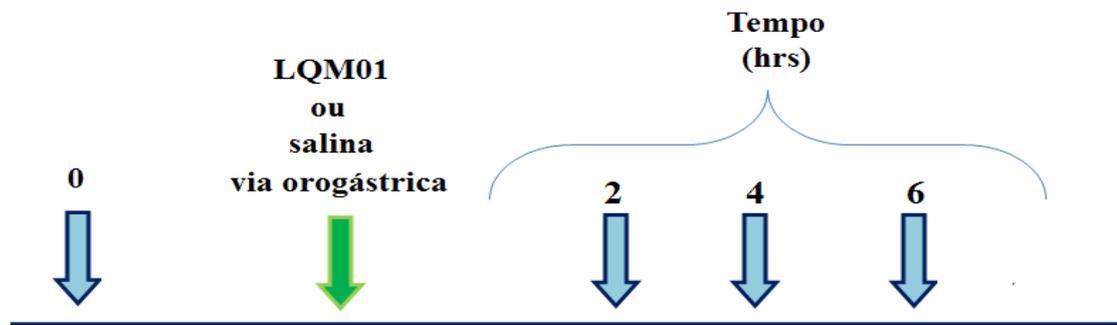
5.3.3 Verificação dos efeitos da anestesia com tiopental sódico sobre a resposta hipotensora e bradicárdica induzida pela administração de doses crescentes do derivado LQM01 em ratos SHR.

Após o procedimento cirúrgico descrito no item 5.2.2 sob efeito do anestésico tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.), um barbitúrico com ação anestésica geral (Morgan; Mikhail; Murray, 2006), foi obtido uma curva dose-resposta como descrito item 5.2.3.

5.3.4 Avaliação do efeito anti-hipertensivo induzida pelo derivado LQM01 em ratos SHR

Os valores de PA sistólica foram medidos por meio do método indireto de pletismografia de cauda. Para tal procedimento, inicialmente os ratos foram aquecidos em estufa a 37°C por 20 min e acondicionados em um meio de contenção, e a região proximal da cauda foi encaixada a um manguito de borracha acoplado ligado ao esfigmomanômetro para insuflar e desinsuflar automaticamente em intervalos fixos de aproximadamente 50 segundos. Próximo ao manguito foi acoplado um transdutor de pulso (sensor) que capta os sinais a serem enviados e registrados em computador para a realização das medidas da pressão arterial sistólica. A PAS era considerada como sendo o primeiro sinal de pulso do retorno do processo de perda e retorno do sinal de pulso na insuflação e desinsuflação. O procedimento experimental teve início após período de adaptação de no mínimo três dias de adaptação dos animais e da estabilização dos sinais de pulso e frequência cardíaca. A PAS foi considerada como a média de no mínimo cinco medidas. O sinal era captado e conectado a um amplificador de sinais, RTBP 2000 Rat Tail Blood Pressure System For Rats And Mice (Kent Scientific Corporation) e conectado a um conversor analógico digital PowerLab/400 (ADInstruments, Austrália). A comunicação de dados entre o powerlab e o computador se dá através de um cabo conectado a uma placa SCSI onde o software “Chart for Windows” gerava os registros de pulso, pressão da bomba e FC a partir dos dados enviados pelo amplificador de sinais e conversor analógico digital. Os animais foram divididos em três grupos de cinco animais cada, grupo controle, o qual foi administrado salina por via orogástrica e os grupos tratados, os quais receberam uma única dose de 5 ou 10 mg/kg do derivado LQM01 via orogástrica. Os valores de PA foram registrados antes (0 hora) e após o tratamento (em 2, 4 e 6 horas após administração) (Figura 11). A porcentagem de redução de PA e FC foram calculadas considerando os valores antes do tratamento como 100% de atividade (Vergara-Galicia et al., 2008).

Figura 11: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito anti-hipertensivo induzido pelo derivado LQM01 em ratos SHR não anestesiados.



5.4 Análise Estatística

Os resultados obtidos neste estudo foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m). Foram realizados testes “t” de Student não-pareados, para análise de diferença entre todas as médias e ANOVA “one way” seguida do pós-teste de Bonferroni. As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando valor obtido para “p” foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$). As curvas foram obtidas através de regressão não-linear. O valor de $E_{m\acute{a}x}$ corresponde à média percentual de relaxamento dos DAG para cada condição estudada. Para os experimentos de viabilidade celular as diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newman-Keuls-Student. Toda a análise estatística e plotagem das curvas foram realizadas utilizando o programa estatístico Graph-Pad Prism 5.0.

6 RESULTADOS

6.1 Estudos Farmacológicos com DAG *in vitro*

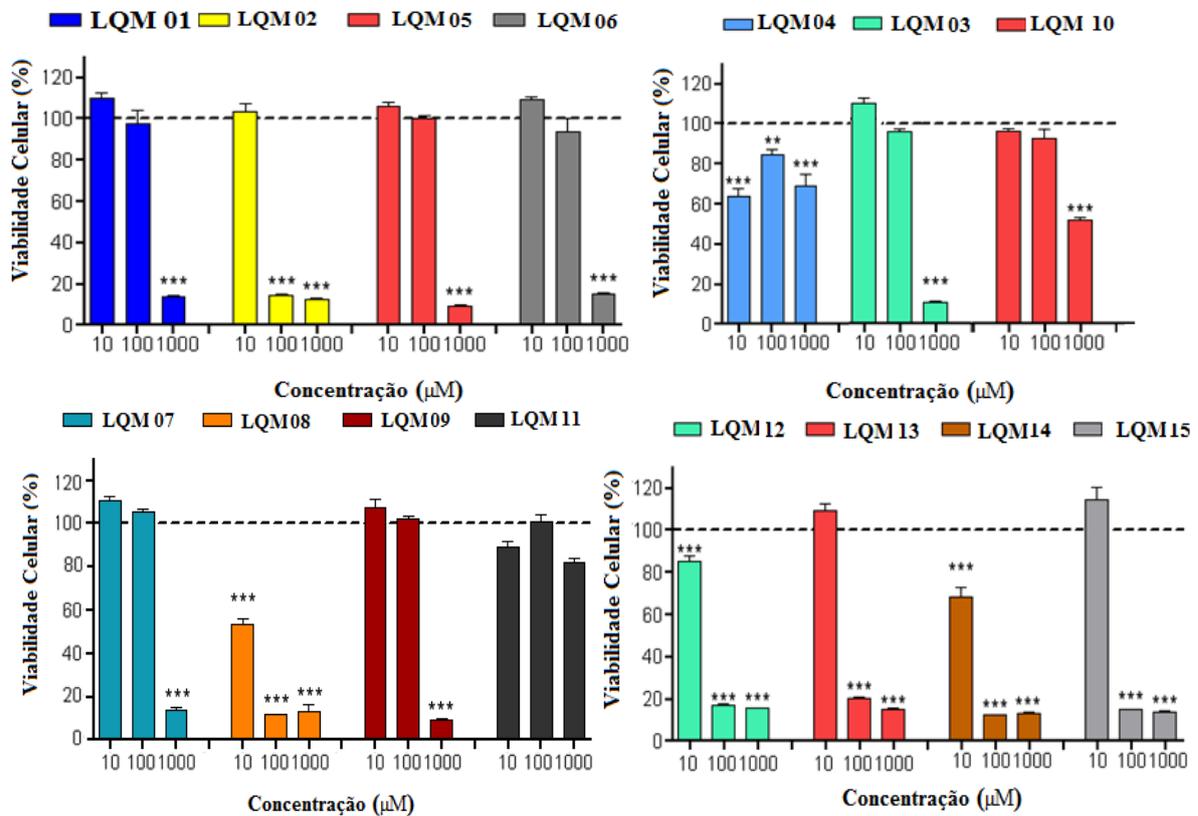
6.1.1 Efeito dos DAG sobre a viabilidade celular em macrófagos da linhagem (J774)

Inicialmente foi avaliado o efeito citotóxico dos DAG sob macrófagos da linhagem (J774), os quais foram expostos aos derivados em concentrações de 10, 100 ou 1000 μM em meio de cultura suplementado durante 24 h. Os derivados exibiram valores menores de 20% a maiores de 100% de viabilidade celular (Gráfico 1). Os valores estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3: Efeito dos compostos, em concentrações de 10, 100 ou 1000 μM , sobre a viabilidade celular. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m.

DAG	10 μM	100 μM	1000 μM
01	110,3 \pm 2,12	97,77 \pm 6,14	13,61 \pm 0,56
02	103,6 \pm 3,95	14,37 \pm 0,84	12,26 \pm 0,63
03	107,9 \pm 2,42	96,45 \pm 1,27	10,64 \pm 0,20
04	64,13 \pm 3,47	84,86 \pm 2,15	69,05 \pm 5,71
05	106,2 \pm 1,96	100,0 \pm 1,70	9,30 \pm 0,42
06	109,6 \pm 1,02	93,69 \pm 6,62	15,02 \pm 0,60
07	110,6 \pm 1,63	105,6 \pm 1,38	13,86 \pm 1,20
08	53,58 \pm 2,26	11,57 \pm 0,52	13,26 \pm 3,06
09	107,5 \pm 3,58	102,4 \pm 1,27	9,36 \pm 0,45
10	94,37 \pm 2,42	94,68 \pm 3,46	51,04 \pm 2,09
11	89,37 \pm 1,34	100,68 \pm 3,98	81,04 \pm 1,05
12	85,47 \pm 2,14	16,97 \pm 0,37	15,65 \pm 0,27
13	109,2 \pm 3,08	20,55 \pm 0,51	15,12 \pm 0,28
14	68,41 \pm 4,32	12,17 \pm 0,55	13,34 \pm 0,34
15	114,5 \pm 5,66	15,03 \pm 0,22	13,89 \pm 0,38

Gráfico 1 - Efeito dos DAG sobre a viabilidade celular. As células foram expostas aos compostos por 24h antes da avaliação da viabilidade pelo teste de MTT



As barras representam a média \pm E.P.M. da viabilidade das células. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newman-Keuls-Student. (***) representam $P < 0,001$ quando comparado ao grupo de células viáveis representado pela linha pontilhada.

6.1.2 Estudos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR

Foi realizado um triagem farmacológico com os 15 derivados aminoguanidínicos (DAG), dentre eles o Guanabenz (12), utilizado como padrão positivo, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR com ausência de endotélio funcional.

Todos os derivados ($3 \cdot 10^{-8}$ - 10^{-4} M) promoveram vasorelaxamento de maneira dependente de concentração em artéria mesentérica pré-contraídos com FEN (10 μ M) com valores de $E_{m\acute{a}x}$ variando de $34,17 \pm 8,2$ %, $n=6$ para $100,92 \pm 0,93$ %, $n=6$ e pD_2 variando de $3,34 \pm 0,35$, $n=6$ para $6,50 \pm 0,09$, $n=6$ expressos na tabela 4. O tempo máximo de estabilização do relaxamento entre uma concentração e outra foi de 5 min, com uma duração máxima de relaxamento total de 30 min.

Tabela 4: Valores de Emáx e pD2 para os DAG em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraída com FEN (10 µM).

Derivado Aminoguanidínico	Emáx % Vasorelaxamento	pD2
LQM 01	100,92 ± 0,93	5,70 ± 0,02 ***
LQM02	62,21 ± 7,2***	4,38 ± 0,11***
LQM 03	40,80 ± 6,49***	3,50 ± 0,35***
LQM 04	34,17 ± 8,2**	3,34 ± 0,35***
LQM 05	52,86 ± 5,96***	4,15 ± 0,11***
LQM 06	81,88 ± 3,5**	4,65 ± 0,11***
LQM 07	100,52 ± 7,86	5,5 ± 0,09 ***
LQM 08	70,46 ± 3,82***	4,75 ± 0,07***
LQM 09	79,02 ± 3,82***	6,02 ± 0,09**
LQM 10	79,50 ± 4,01***	4,68 ± 0,09***
LQM 11	66,45 ± 8,05**	5,46 ± 0,21***
GUANABENZO (12)	100,69 ± 0,2	6,49 ± 0,06
LQM 13	100,0 ± 0,08	6,07 ± 0,05**
LQM 14	90,74 ± 10,53*	5,60 ± 0,10**
LQM15	59,30 ± 3,9***	4,67 ± 0,17***

Os valores estão expressos com media ± e.p.m. de 6 experimentos. *p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001 *versus* GUANABENZO(12).

6.1.3 Efeito do LQM01 sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com e sem o endotélio funcional pré-contraídos com FEN

O LQM01 ($3 \cdot 10^{-8}$ - 10^{-4} M) promoveu vasorelaxamento de maneira dependente de concentração, em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN (10 µM). A presença do endotélio não alterou a resposta vasorelaxante induzida pelo derivado, como demonstrado pelos valores de Emáx obtidos de

artérias sem endotélio funcional (pD_2 : $5,70 \pm 0,02$ e $Emáx = 100,92 \pm 0,93$ %, $n=6$) e anéis com endotélio (pD_2 : $5,80 \pm 0,05$ e $Emáx = 100,19 \pm 2,09$ %, $n=6$) (Gráfico 2). O tempo máximo de estabilização do relaxamento entre uma concentração e outra foi de 5 min, com uma duração máxima de relaxamento total de 30 min (Figura12).

Figura 12 –Registro original do efeito da adição de concentrações crescentes do LQM01 ($3 \cdot 10^{-8}$ - 10^{-4} M) em anel de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR sem endotélio, pré-contraído com $10 \mu M$ de FEN.

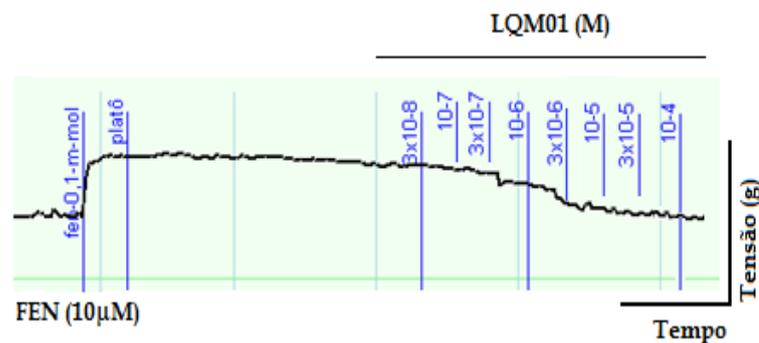
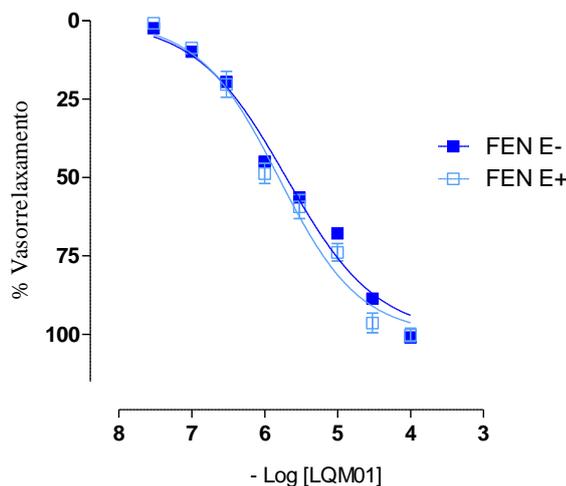


Gráfico 2 - Curva - concentração resposta de LQM01 ($3 \cdot 10^{-8}$ - 10^{-4} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR, pré-contraídos com FEN ($10 \mu M$) sem endotélio funcional (■) e com endotélio (□).



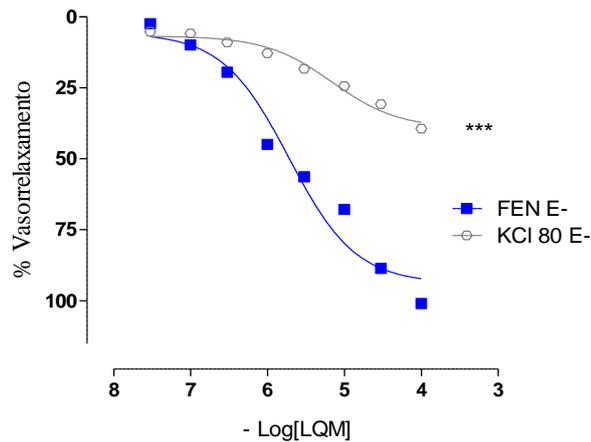
Os valores estão expressos com média \pm e.p.m. ($n= 6$).

6.1.4 Efeito de LQM01 sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem o endotélio funcional pré-contraídos com KCl 80 mM

O relaxamento promovido por LQM01 ($3 \cdot 10^{-8}$ - 10^{-4} M) em anéis mesentéricos de ratos pré-contraídos com FEN, sem endotélio funcional ($pD_2 = 5,70 \pm 0,02$ e $Emáx = 100,92 \pm 0,93$

%, n=6) foi significativamente alterado após pré-contração com solução despolarizante KCl 80mM ($E_{\text{máx}} = 39,31 \pm 1,30$ %, n=6) (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Curva - concentração resposta de LQM01 (3.10^{-8} - 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR, pré-contraídos com FEN (■) e com KCl (80 mM) (●) sem endotélio funcional.

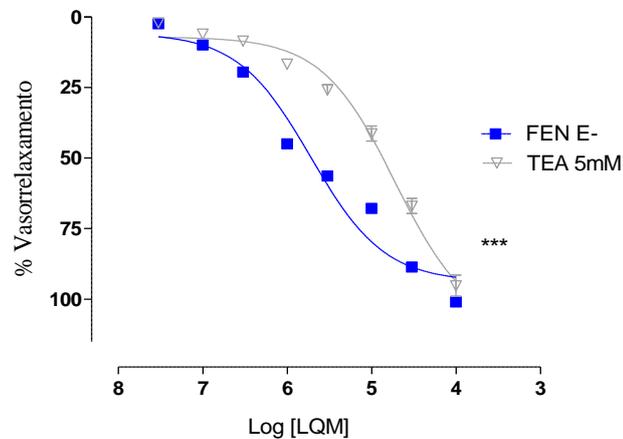


Os valores estão expressos com média \pm e.p.m. (n= 6) *** $p < 0,001$ versus controle.

6.1.5 Efeito do TEA 5mM sobre a resposta relaxante induzida por LQM01 em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio isolada de rato SHR.

O relaxamento promovido por LQM01 em anéis mesentéricos de ratos pré-contraídos com FEN, na ausência do endotélio funcional ($pD_2 = 5,70 \pm 0,02$ e $E_{\text{máx}} = 100,92 \pm 0,93$ %, n=6) foi significativamente deslocado para a direita com redução do efeito máximo e da potência, $p < 0,001$, na presença de TEA 5 mM, um inibidor não seletivo dos canais de K^+ ($pD_2 = 4,95 \pm 0,03$ e $E_{\text{máx}} = 95,22 \pm 3,73$ %, n=6) (Gráfico4).

Gráfico 4 - Efeito do LQM01 (3.10^{-8} - 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR sem endotélio pré-contraídos com $10 \mu\text{M}$ de FEN, na ausência (■) e na presença (▽) de TEA 5mM.

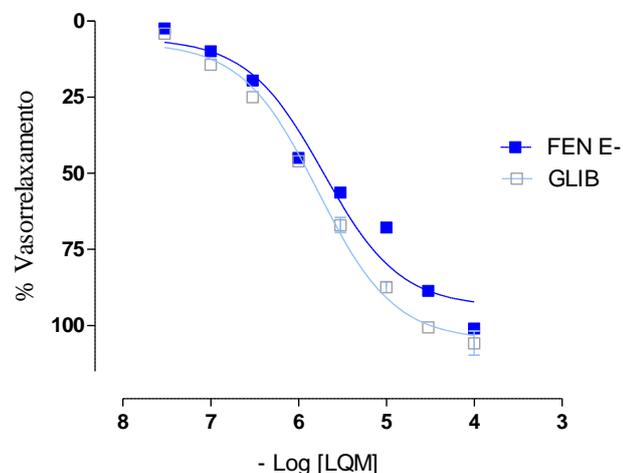


Os valores estão expressos com média \pm e.p.m. (n= 5) ***p<0,001 *versus* controle.

6.1.6 Efeito da GLIB sobre a resposta relaxante induzida por LQM01 em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio isolada de rato SHR

O relaxamento promovido por LQM01 em anéis mesentéricos de ratos pré-contraídos com FEN, na ausência do endotélio funcional na presença de GLIB ($10 \mu\text{M}$), um bloqueador seletivo dos canais K_{ATP} , ($pD_2 = 5,94 \pm 0,03$ e $E_{\text{max}} = 105,82 \pm 3,97 \%$) apresentou-se potencializado quando comparado ao relaxamento induzido na ausência do bloqueador ($pD_2 = 5,70 \pm 0,02$ e $E_{\text{max}} = 100,92 \pm 0,93 \%$, n=6) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Efeito do LQM01 (3.10^{-8} - 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR sem endotélio pré-contraídos com $10 \mu\text{M}$ de FEN, na ausência (■) e na presença (□) de de $10 \mu\text{M}$ Glibenclamida.

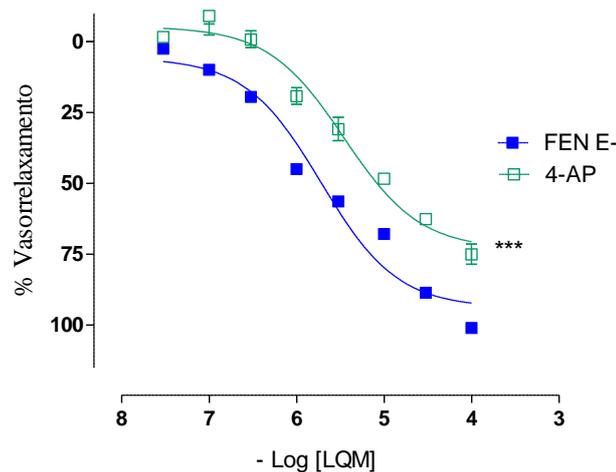


Os valores estão expressos com média \pm e.p.m. (n= 6).

6.1.7 Efeito de 4-AP sobre a resposta relaxante induzida por LQM01 em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio isolada de rato SHR

A presença de 4-AP (1mM), um inibidor seletivo dos canais de K^+ dependentes de voltagem, alterou o relaxamento promovido por LQM01 em anéis mesentéricos de ratos pré-contraídos com FEN, na ausência do endotélio funcional ($pD_2 = 5,70 \pm 0,02$ e $E_{máx} = 100,92 \pm 0,93$, $n=6$) promovendo um significativo deslocamento da curva para a direita e com redução do efeito máximo ($pD_2 = 4,88 \pm 0,05$ e $E_{máx} = 75,00 \pm 3,53$ %, $n=6$) (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Efeito do LQM01 (3.10^{-8} - 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR sem endotélio pré-contraídos com $10 \mu M$ de FEN, na ausência (■) e na presença (□) de 1mM de 4-AP (n = 6).

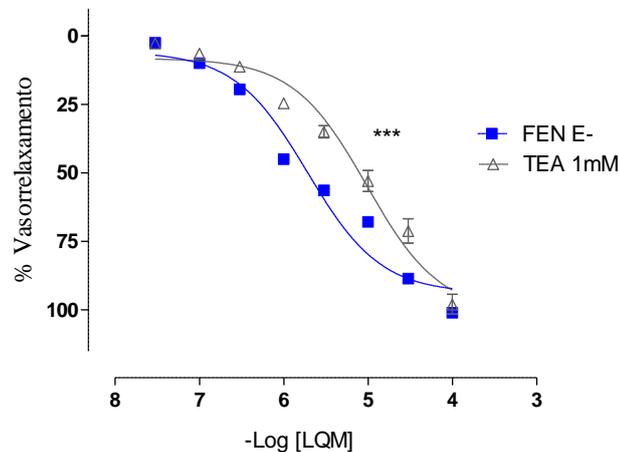


Os valores estão expressos com média \pm e.p.m. ($n=6$) *** $p < 0,001$ versus controle.

6.1.8 Efeito do TEA (1 mM), sobre a resposta relaxante induzida por LQM01 em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio isolada de rato SHR

Os anéis mesentéricos incubados na presença de TEA com concentração de 1 mM, um bloqueador dos canais BK_{ca} , ($pD_2 = 5,17 \pm 0,04$ e $E_{máx} = 97,96 \pm 3,60$ %) (Gráfico 7) promoveu um desvio significativo da curva para direita no relaxamento promovido por LQM01 em anéis mesentéricos de ratos pré-contraídos com FEN, na ausência do endotélio funcional ($pD_2 = 5,70 \pm 0,02$ e $E_{máx} = 100,92 \pm 0,93$, $n=6$).

Gráfico 7 - Efeito do LQM01 (3.10^{-8} - 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR sem endotélio pré-contráidos com $10 \mu\text{M}$ de FEN, na ausência (\blacksquare) e na presença (\triangle) de 1mM de TEA

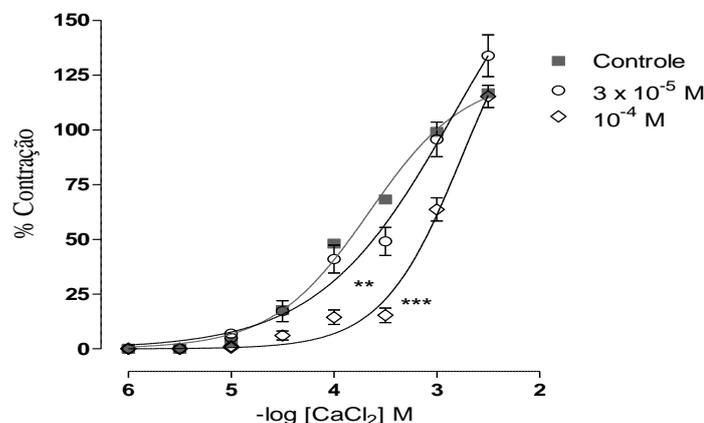


Os valores estão expressos com média \pm e.p.m. (n= 6) *** $p < 0,001$ versus controle.

5.1.9 Efeito do LQM01 sobre o influxo de Ca^{+2} através dos canais de Ca^{+2} operados por voltagem em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio isolada de rato SHR

O LQM01 nas concentrações de 3×10^{-5} ($pD_2 = 2,76 \pm 0,29$ e $E_{\text{máx}} = 99,37 \pm 3,33$, n=6) e 10^{-4} M ($pD_2 = 2,88 \pm 0,05$ e $E_{\text{máx}} = 86,01 \pm 1,22$, n=6) promoveram atenuação das contrações induzidas por CaCl_2 em solução despolarizante nominalmente sem Ca^{+2} . As curvas cumulativas ao CaCl_2 ($pD_2 = 3,65 \pm 0,02$ e $E_{\text{máx}} = 116,71 \pm 1,26$, n=6) foram desviadas significativamente para direita na presença do derivado (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Efeito do LQM01 frente às curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{+2} em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR (n = 6). Controle (\blacksquare), LQM01 [M]: 3×10^{-5} (\circ) e 10^{-4} (\diamond).



Os valores estão expressos com média \pm e.p.m. (n= 6). ANOVA “one-way” seguido de Bonferroni. *** $p < 0,001$ vs Controle.

6.2 Estudos Farmacológicos com LQM01 *in vivo*

6.2.1 Efeito do LQM01 sobre PAM e FC em ratos SHR não anestesiados

Após um período de estabilização dos parâmetros hemodinâmicos, a administração de maneira randômica de doses LQM01 (0,5; 1; 5, 10 mg/kg, i.v.), promoveu uma hipotensão significativa ($-23,5 \pm 3,6$; $-32,9 \pm 3,9$; $-38,2 \pm 3,9$; $-56,8 \pm 1,8$ e $-57,9 \pm 1,0$ %, respectivamente) e uma bradicardia ($1,7 \pm 2,9$; $5,6 \pm 3,1$; $-0,9 \pm 1,6$; $-64,6 \pm 6,2$ e $-70,9 \pm 5,3$ %, respectivamente) de maneira dose dependente em ratos SHR não anestesiados (Figura13), (Gráfico 9).

Figura 13 – Registro original do efeito da administração intravenosa da dose de 10mg/Kg de LQM01 em ratos SHR.

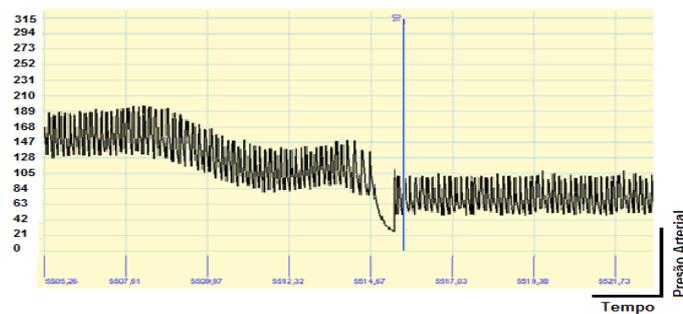
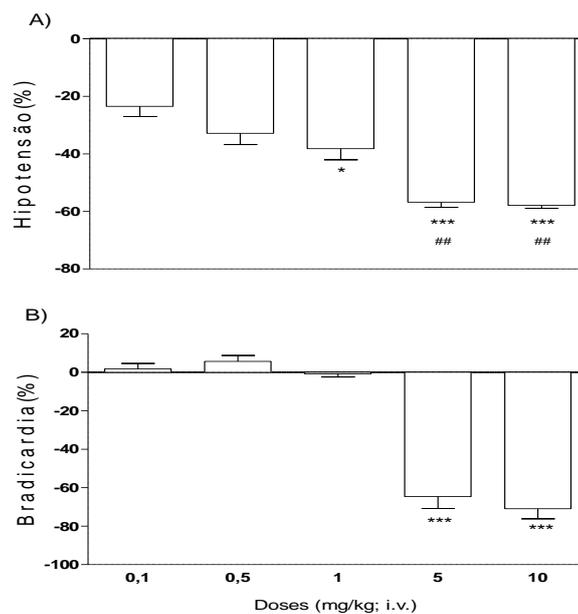


Gráfico 9 – Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração aguda de doses crescentes do LQM01 (0,5; 1; 5; 10 mg/kg, i.v) em ratos SHR não-anestesiados.

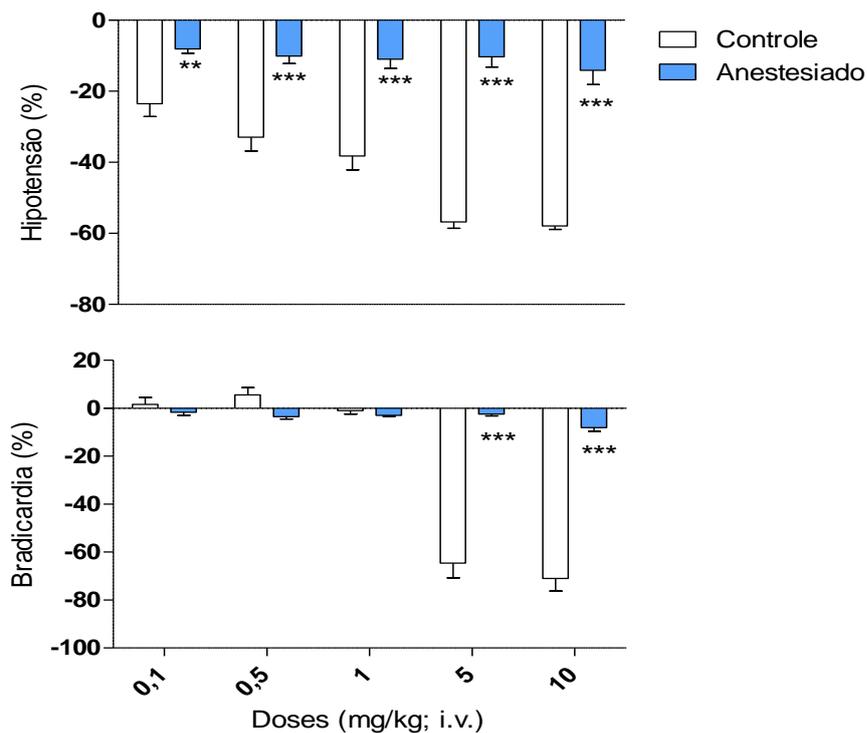


Valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n=5) * $p < 0,05$ versus 0,1 mg/kg. ## $p < 0,01$ versus 1 mg/kg. *** $p < 0,001$ versus 0,1; 0,5 mg/kg (A); versus demais doses (B).

6.2.2 Efeito de um depressor do SNC (tiopental sódico - 45 mg/kg, i.p.) sobre as respostas hipotensora e bradicárdica induzida por LQM01 em ratos SHR.

O efeito hipotensor induzido por LQM01 foi atenuado em todas as doses ($-8,1 \pm 1,2$; $-10,1 \pm 2,1$; $-11,0 \pm 2,6$; $-10,3 \pm 2,9$ e $-14,1 \pm 4,0$ %, respectivamente) após a inibição da ação do SNC com tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.) além de bloquear o efeito bradicárdico ($-1,7 \pm 1,2$; $3,4 \pm 1,1$; $3,0 \pm 0,3$; $2,5 \pm 0,7$ e $8,1 \pm 1,6$ %, respectivamente) representado no gráfico abaixo (Gráfico 10).

Gráfico 10 – Efeito do tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.) sobre a resposta hipotensora (A) e bradicárdica (B) induzida pela administração aguda de doses crescentes do LQM01(0,5; 1; 5; 10 mg/kg, i.v.) em ratos SHR inconcientes.



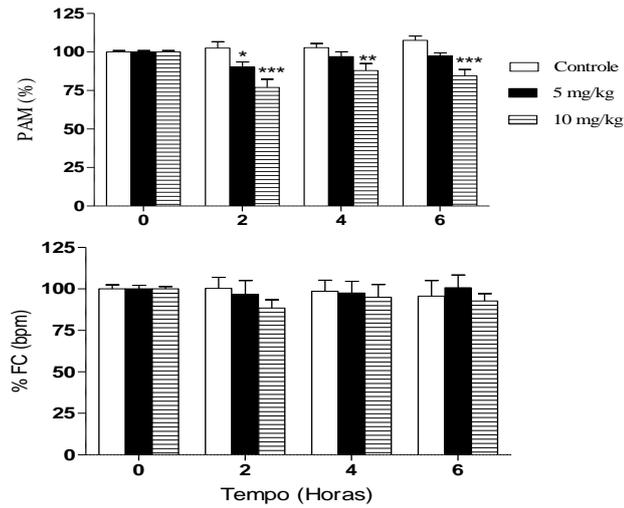
Valores estão expressos como média \pm e.p.m.(n=5) ** p < 0,01 e *** p < 0,001 versus controle.

6.2.3 Efeito anti-hipertensivo induzido por LQM01 em ratos SHR não anestesiados

A administração de uma única dose intragástrica de 5 ou 10 mg/kg do LQM01 produziu redução significativa da PAM, apenas na segunda hora para dose de 5 mg/kg e na segunda até a sexta hora (Gráfico 11). LQM não apresentou efeito significativo sobre a FC.

Os valores de PAM e FC antes da administração da substância foram considerados como 100% (0 h) de atividade.

Gráfico 11 – Efeito do tratamento subcrônico sobre a PAM e FC, após a administração de salina (controle) e após administração de LQM (5 ou 10 mg/kg, v.o.) em ratos SHR (Tratado).



Valores estão expressos como média \pm e.p.m.(n=8) * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ versus controle.

7 DISCUSSÃO

Em busca por novos agentes terapêuticos que atuem em nível cardiovascular, 14 novos derivados aminoguanidínicos aromáticos foram avaliados e durante o desenvolvimento deste estudo constatou-se que todas as substâncias testadas foram hábeis em causar vasorelaxamento, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR. O derivado LQM01, portador de um núcleo indólico, apresentou resultados de maior relevância, com eficácia equivalente ao fármaco anti-hipertensivo, utilizado como controle positivo, o Guanabanzo, entretanto com menor efeito citotóxico em ensaios de viabilidade celular.

Deste modo, o derivado aminoguanidínico LQM01 foi capaz de induzir vasorelaxamento independente de endotélio devido a uma provável ativação de canais para potássio e bloqueio de canais para Ca^{2+} . Além disto, a substância avaliada também foi capaz de produzir efeito hipotensor e bradicárdico independente de dose através da administração i.v. em ratos não-anestesiados e atividade anti-hipertensiva após tratamento por via oral.

Todos os derivados aminoguanidínicos estudados neste trabalho foram previamente submetidos a testes de proliferação celular (MTT), haja vista as guanilhidrazonas têm revelado alto potencial citotóxico, sendo diversos derivados guanidínicos sintéticos alvo de intensa avaliação pré-clínica e clínica de tumores, apresentando elevada ação citotóxica em diferentes linhagens de células leucêmicas e saudáveis (Ekelund, 200; Andreani et al., 2005; 2008).

Sete derivados (LQM01, 03, 05, 06, 07, 09, 10) exibiram atividade citotóxica muito baixa, apresentando 100% ou mais de viabilidade celular nas duas primeiras concentrações, com redução do crescimento celular apenas em altas concentrações (1000 μ M), no entanto, o derivado LQM11 não apresentou inibição do crescimento celular em nenhuma das concentrações testadas. Tais substâncias revelaram menor ação citotóxica quando comparadas ao Guanabanzo que exibiu $85,47 \pm 2,14$ % de viabilidade celular apenas na concentração de 10 μ M, assim como LQM02, 13 e 15 com 20% ou menos de viabilidade celular para as duas últimas concentrações. As substâncias LQM08 e 14 expressaram maior atividade citotóxica com inibição da proliferação celular para as três concentrações analisadas, com menos de 70% de viabilidade celular. A análise citotóxica dos derivados revelou oito derivados (LQM01, 03, 05, 06, 07, 09, 10 e 11) com ótimos resultados de viabilidade celular, constituindo substâncias promissoras para análise em diversos ensaios farmacológicos. Deste

modo, após os testes descritos anteriormente, os mesmos derivados foram avaliados frente seu potencial efeito sobre o sistema cardiovascular.

Após a análise da ação citotóxica dos derivados, avaliou-se também a atividade vasodilatadora desenvolvida pelos os mesmos. Tendo em vista a classe de fármacos vasodilatadores serem amplamente utilizados na atualidade para tratar hipertensão (Padmanabhan, Caulfield, Dominiczak, 2015), uma vez que a redução da pressão arterial pode ser alcançada por meio de alterações no tônus vascular, ou seja, na atividade contrátil das células da musculatura lisa do vaso. O tônus do vaso constitui o maior determinante da sua resistência, logo a resistência vascular periférica desempenha papel fundamental na regulação da pressão sanguínea (Jackson, 2010).

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo inicial selecionar, dentre os 14 DAG, aquele que se mostrasse mais eficaz e mais potente em promover relaxamento em anéis de artéria mesentérica superior isolado de rato SHR.

A escolha dos ratos SHR para o presente estudo deve-se ao fato de ser o modelo animal mais utilizado e constitui um excelente modelo experimental para investigação de fatores que envolvem a patogenia da hipertensão arterial, uma vez que estes animais exibem distúrbios hemodinâmicos e metabólicos de natureza multifatorial (Pravenec et al., 2014), bem como um aumento na reatividade vascular acompanhada de hiperresponsividade à agonistas vasoconstrictores (Oh et al., 2005), além das alterações estruturais e funcionais dos vasos sanguíneos que ocorrem de maneira semelhante na hipertensão humana, dentre os quais são alvos da terapia anti-hipertensiva, em razão de serem importantes mecanismos patológicos que culminam no aumento na pressão arterial (Oh et al., 2008).

O estado hipertensivo está associado a inúmeras condições patológicas como a disfunção endotelial e o estresse oxidativo. A célula endotelial metaboliza, sintetiza e libera uma variedade de substâncias, incluindo substâncias vasoativas que regulam o tônus vascular e a pressão sanguínea, por isso, na disfunção endotelial a manutenção do tônus vascular encontra-se prejudicada (Dharmashankar e Widlansky, 2010; Park e Park, 2015). Em pacientes com hipertensão, assim como em diversos modelos animais de hipertensão, tem se observado um vasorelaxamento dependente de endotélio reduzido, o que se deve a uma menor liberação de fatores vasodilatadores derivados do endotélio, tais como: o NO, prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (Su, 2015).

Em razão da disfunção endotelial e a ineficiente produção de vasodilatadores pelas células endoteliais vasculares na síndrome hipertensiva, optamos por realizar todos os experimentos em anéis de artéria com ausência de endotélio funcional, com o propósito de selecionar substâncias que venham produzir relaxamento vascular sem interferência dos fatores derivados do endotélio.

Para avaliarmos a capacidade vasorelaxante dos DAG nós utilizamos uma abordagem *in vitro* utilizando anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato. O modelo de artéria mesentérica foi escolhido e não aquele com aorta, por considerar que um vaso de condutância e de grosso calibre tem um papel limitado nas variações globais da resistência periférica (Mulvany; Aalkjaer, 1990). Já os vasos de pequeno calibre, como é o caso da artéria mesentérica, que apresentam maior resistência e são mais amplamente implicados na regulação do débito e da pressão capilar, refletem melhor as evoluções da resistência periférica global (Folkow, 1979; Folkow, 1987).

Portanto, nas condições citadas acima, todas as substâncias testadas induziram vasorelaxamento dependente de concentração e com ausência de endotélio intacto em anéis pré-contraídos com fenilefrina (FEN), um agonista α -adrenérgico. Entretanto, houve um desvio da curva concentração-resposta dos DAG para a direita, quando comparado com o Guanabenzol, o qual se revelou mais potente em relaxar anéis mesentéricos. O relaxamento induzido pelos DAG apresentou uma redução do efeito máximo em relação ao Guanabenzol, no entanto, os derivados LQM01,07 e 13 não demonstraram diferenças significativas para este parâmetro analisado. Contudo, pode-se afirmar que os derivados LQM01, 07 e 13 exibiram respostas vasorelaxantes tão eficazes quanto o Guanabenzol.

Diante dos resultados expostos acima, três substâncias (LQM01, 07 e 13) revelaram alto potencial terapêutico sobre o sistema cardiovascular, todavia o derivado LQM13 apresentou maior efeito citotóxico quando comparado ao LQM01 e 07, não havendo diferenças significativas entre os mesmos. Sendo assim, os DAG 01 e 07 exibiram os melhores resultados, nas análises já descritas, dentre os 14 compostos testados.

Neste trabalho optamos por dar continuidade aos estudos com o derivado LQM01, prosseguindo com a investigação dos efeitos induzidos sobre o sistema cardiovascular, bem como investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nestes efeitos.

Dando seguimento à abordagem *in vitro*, em anéis de artéria mesentérica superior pré-contraídos com FEN (10 μ M), o LQM01 induziu vasorelaxamento dependente de

concentração em anéis sem endotélio. O mesmo efeito foi observado em anéis com a presença de endotélio funcional, não havendo qualquer alteração na potência ou eficácia do composto. Sugerindo que o efeito vasorrelaxante de LQM01, em anéis de artéria mesentérica isolada de rato, não parece ser mediado por fatores vasoativos liberados pelo endotélio vascular, mas provavelmente pela ação direta do derivado sobre o músculo liso arterial.

A fenilefrina é um agonista seletivo dos receptores α_1 -adrenérgicos, a estimulação farmacomecânica ativa a via da PLC iniciando uma cascata de eventos que irá promover aumento das concentrações de Ca^{2+} no meio intracelular, culminando em contração da MLV. Estes receptores estão acoplados a proteína $G_{q/11}$ e após a ativação da PLC esta enzima catalisa a hidrólise do PIP_2 em IP_3 e DAG, o IP_3 ativa os receptores do retículo sarcoplasmático (compartimento intracelular de estoque de Ca^{2+}), promovendo a liberação de Ca^{2+} no citosol. O DAG juntamente com a elevação do Ca^{2+} promove a ativação da PKC, que promove a fosforilação de enzimas envolvidas no processo contrátil, como a MLCK, resultando em contração muscular (McCarron et al., 2003; Thorneloe; Nelson, 2005; Salamanca; Khalil, 2005). Deste modo, pode-se sugerir que o composto pode estar inibindo alguma etapa do processo contrátil induzido por FEN de maneira independente de fatores derivados do endotélio.

Pode-se induzir vasorelaxamento independente do endotélio vascular, através da ação direta nas CMLV, por exemplo, por meio da estimulação de canais para K^+ ou bloqueio dos canais para Ca^{2+} . A atividade dos canais para potássio são grandes determinantes do potencial de membrana e por isso, geralmente são mediadores centrais na modulação fisiológica da contratilidade da musculatura lisa (Haick; Byron, 2016). Os canais para K^+ são proteínas efetoras que constituem uma via de condução iônica dominante nas células da MLV. Como tal, a sua atividade contribui de forma importante para a determinação e regulação do potencial de membrana e do tônus vascular. A contração e relaxamento do MLV são regulados pelo potencial de membrana através de mudanças na atividade dos canais para K^+ , sendo a atividade destes canais um importante mecanismo de vasoconstrição e vasodilatação, onde alterações na atividade dos mesmos, também culminam em mudanças na atividade dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_v) (Brayden, 1996; Jackson, 2000). Deste modo, os canais para K^+ constituem determinantes importantes da pressão sanguínea (Ledoux et al., 2006).

O gradiente eletroquímico dos íons K^+ é tal que a ativação dos canais para K^+ no MLV, resulta em abertura dos mesmos na membrana plasmática, provocando a difusão deste cátion para fora da célula. O efluxo destes íons produz uma mudança de potencial de membrana para valores mais negativos, culminando em hiperpolarização da membrana, a qual bloqueia os canais Ca_v e resulta em vasodilatação (Lawson, 2000; Ko et al., 2010).

Para investigar se a ativação dos canais para K^+ está envolvida no efeito vasorelaxante induzido por LQM01, foram realizados protocolos experimentais onde as preparações de anéis mesentéricos sem endotélio foram pré-incubados com TEA (5 mM), nesta concentração o TEA é considerado um bloqueador não-seletivo dos canais de K^+ . Nas condições descritas, houve um desvio da curva para direita com redução significativa da potência e eficácia, quando comparado com a curva controle sem a presença do bloqueador. Isto sugere que provavelmente os canais para K^+ estão envolvidos no relaxamento induzido por LQM01 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato SHR, e sua ativação não depende da presença do endotélio vascular.

No entanto, evidências atuais revelam que tanto na microcirculação, como em outros músculos vasculares, têm sido identificados diferentes tipos de canais para K^+ expressos na membrana das CMLV, dentre eles: canais para K^+ dependentes de voltagem (K_v); canais para K^+ sensíveis a ATP (K_{ATP}); canais para K^+ sensíveis ao Ca^{2+} de grande condutância (BK_{Ca}) (Wey et al., 2005; Gutman et al., 2005; Ko et al., 2008).

Os K_{ATP} são canais regulados pelos níveis de ATP intracelular, que se fecham quando a concentração intracelular de ATP aumenta, mas outras vias de transdução de sinais também podem regular estes canais. Diversos trabalhos comprovam a importância destes canais na regulação do potencial de repouso e conseqüentemente do tônus vascular na microcirculação. K_{ATP} parecem participar do mecanismo de ação de vasodilatadores como adenosina e prostaciclina através de AMPc e PKA (Jackson, 2000). Estes canais estão pouco abertos em condições normais, tendo uma pequena influência na manutenção do potencial de repouso, entretanto, em condições patológicas em que a concentração de ATP esteja reduzida ou quando ocorre aumento do AMPc intracelular, estes canais são ativados e produzem uma potente vasodilatação (Brayden, 2002).

Os canais K_v apresentam distribuição ubíqua e também são ativados através da despolarização da membrana plasmática, após atingir um potencial limiar de cerca de -30mv (Jackson, 2000). Além disto, trabalhos recentes refutam o papel modulatório das PKA sobre

estes canais (Brignell et al., 2015). Estudos com artérias de resistência, arteríolas e CMLV isoladas das mesmas evidenciam a participação dos K_V na regulação do potencial de membrana em repouso e do tônus vascular, essencial para o controle da concentração de Ca^{2+} citosólico, deste modo a abertura destes canais exhibe grande importância na fase de repolarização do potencial de ação (Mackie; Byron, 2008).

Os BKCa são encontrados em diversas células, são canais regulados por alterações nos níveis de Ca^{2+} intracelular, os quais podem ser ativados, por aumento de concentração citosólica de Ca^{2+} , ou por influxo deste íon do meio extracelular ou ainda por sua liberação do retículo sarcoplasmático (Zhang et al., 2006). Nas CMLV, estes canais estão muito próximos dos receptores de ryanodina, que podem ativar os canais através do aumento local de Ca^{2+} . Estes canais permitem o efluxo de K^+ , antagonizando a despolarização da membrana plasmática, promovendo assim vasodilatação. Como os canais em questão também são sensíveis a voltagem, a despolarização da membrana promove ativação dos BKCa a fim de contrariar a contração da MLV via inibição dos Ca_V (Clements; Terentyev; Sellke, 2015). Sua ativação ocorre a fim de interromper, por feedback negativo, mecanismos de despolarização e contração muscular. Na hipertensão, a expressão destes canais na membrana da MLV está aumentada, isto se dá provavelmente em resposta ao aumento da reatividade vascular observada na hipertensão. Contudo os BKCa desempenham papel fundamental na regulação do tônus vascular e da pressão sanguínea (Jackson, 2000).

Diante do exposto, a fim de se identificar quais canais para K^+ estariam participando da ação do derivado analisado, foram realizados protocolos experimentais utilizando bloqueadores específicos para cada tipo de canal a ser investigado. Os anéis de artéria mesentérica sem endotélio foram pré-incubadas separadamente com: GLIB (10 μ M), um bloqueador seletivo dos K_{ATP} ; 4-AP (1mM), um bloqueador seletivo dos K_V e TEA (1mM), que nesta concentração bloqueia seletivamente os BKCa.

Na presença de Glibenclamida, o efeito vasorelaxante de LQM01 apresentou-se potencializado, sendo assim, provavelmente não há envolvimento desta via no efeito investigado. Por outro lado, os anéis pré-incubados com 4-AP exibiram um deslocamento significativo da curva para direita e redução nos valores de $E_{m\acute{a}x}$, podendo então sugerir a participação dos K_V no relaxamento induzido por LQM01 em anéis mesentéricos. Bem como o efeito vasorelaxante avaliado também apresentou um desvio significativo para direita,

quando na presença do bloqueador TEA (1mM), sugerindo portanto, um possível envolvimento de canais BK_{Ca} no efeito induzido pelo derivado.

O cálcio constitui-se um regulador primário do tônus do músculo liso vascular, além de apresentar papel fundamental na manutenção da contração do músculo liso, esta manutenção é dependente do influxo de Ca^{2+} do meio extracelular através dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, Ca_v e/ou operado por receptores (ROCCs) (Gurney, 1994; Karaki; Weiss, 1998). A literatura relata que a elevação da concentração de Ca^{2+} nas células do músculo liso promove despolarização de membrana, por abertura dos Ca_v e conseqüente aumento do influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular, assim como pode ser mediada por liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, promovendo uma contração sustentada (Somlyo; Somlyo, 1994;; Kobayashi; Kanaide; Nakamura, 1986; Godfrain, 2005). É possível inibir esta resposta contrátil por meio do bloqueio dos Ca_v , gerando nestas condições vasorelaxamento (Godfrain, 2005).

Deste maneira, avaliou-se a participação dos canais de Ca^{2+} no efeito vasorelaxante de LQM01 em anéis mesentéricos pré-contraídos com a solução despolarizante de KCl 80 mM, onde o derivado foi capaz de promover um relaxamento dependente de concentração. Contudo, o efeito induzido mostrou-se significativamente menor quando comparada com a curva obtida com o agente contracturante FEN, apresentando redução do $Emáx$ para $39,31 \pm 1,30$ %. Estes resultados apresentam indícios de que a vasodilatação avaliada possa envolver outra via de sinalização adicional, sugerindo o bloqueio dos Ca_v , visto que drogas antagonistas de canais para Ca^{2+} promovem inibição das contrações induzidas na MLV por aumento da concentração de K^+ extracelular (Godfrain, 2005; Galicia et al., 2008).

A fim de avaliar a hipótese se o LQM01 estaria realmente bloqueando o influxo de Ca^{2+} através dos VOCCs, avaliou-se o efeito do derivado frente às curvas concentrações-resposta cumulativas ao $CaCl_2$, em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{+2} . Este protocolo experimental se baseia no fato de que a contração se dará, quase que exclusivamente, pelo Ca^{+2} proveniente do meio extracelular, uma vez que a despolarização promovida pela elevada $[K^+]_e$ induz a abertura dos VOCCs. Observou-se que LQM01 promoveu um desvio significativo para a direita das curvas concentrações-resposta cumulativas ao $CaCl_2$.

Possivelmente, o mecanismo de ação do LQM01 envolva a ativação dos K_v e BK_{Ca} e em parte, inibição do influxo de Ca^{2+} através do bloqueio dos canais para Ca^{2+} dependentes de

voltagem, culminando em repolarização e hiperpolarização da membrana celular, resultando em vasodilatação.

Como foi demonstrada a capacidade de LQM01 em relaxar anéis de artéria mesentérica isolada de ratos SHR, buscou-se também avaliar o efeito do derivado sobre os parâmetros cardiovasculares em ratos SHR. Para este fim, utilizou-se uma abordagem *in vivo*, utilizando ratos conscientes com livre movimentação, onde foram avaliados os parâmetros PAM e FC. Os protocolos *in vivo* foram realizados com animais não anestesiados a fim de se evitar a influência da anestesia e do estresse cirúrgico nos parâmetros cardiovasculares (Smith; Hutchins, 1980; Fluckiger et al., 1985).

A administração aguda (i.v.) *in bolus* de doses randomizadas da substância em ratos hipertensos não-anestesiados induziu uma resposta transiente caracterizada por hipotensão, de maneira independente de dose, com grande efeito hipotensor nas doses de 5 e 10 mg/kg, acompanhado de efeito bradicárdico intenso também nestas doses. Deste modo, LQM01 foi capaz de promover efeito hipotensor e bradicárdico agudo, com rápido retorno aos valores basais.

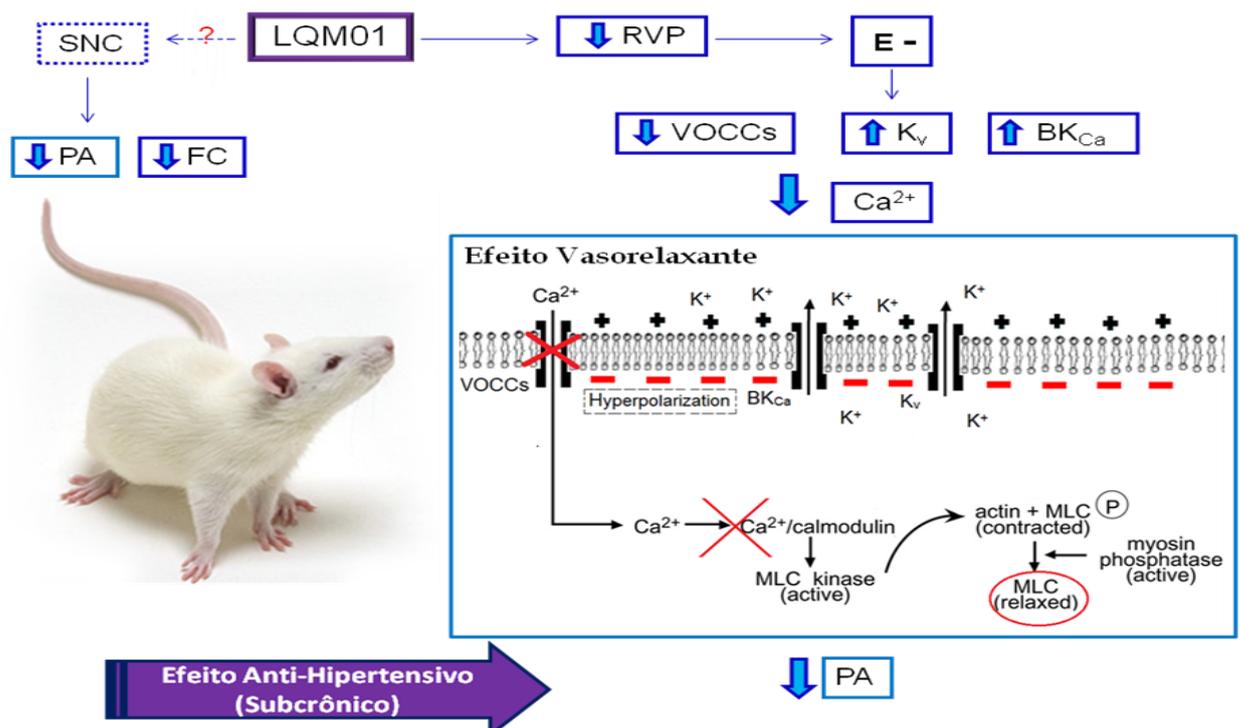
Com o propósito de avaliar se há envolvimento do sistema nervoso central nos efeitos induzidos por LQM01, o mesmo protocolo foi realizado com um grupo de animais sob efeito de anestesia com tiopental sódico, visto que a literatura descreve bem os efeitos produzidos por anestésicos sobre o sistema cardiovascular, alterando os principais sistemas de regulação da pressão arterial, como o sistema nervoso simpático e o barorreflexo (Fluckiger et al., 1985; Dorward et al., 1985), induzindo depressão das sinapses do sistema nervoso central e promovendo alterações no funcionamento dos principais sistemas neurais de controle autônomo envolvidos na regulação da PAM e FC (Korner et al., 1968; White; Mcritchie, 1973; Zimpfer et al., 1982). Constatou-se que tanto a resposta hipotensora quanto a bradicárdica induzida pelo derivado foi atenuada ou praticamente abolida, respectivamente, após depressão do SNC no grupo de animais anestesiados. Estes resultados sugerem a participação do sistema nervoso central nos efeitos pressóricos e cardíacos produzidos por LQM01, o que pode estar associada à redução do fluxo simpático sobre o sistema cardiovascular, corroborando com as ações induzidas pela classe de anti-hipertensivos, utilizada como inspiração para o desenho molecular dos derivados aminoguanidínicos, tais fármacos promovem seus efeitos devido uma ação simpatolítica central, por meio da ativação de receptores α_2 -adrenérgicos (Szabo, 2002; Bousquet, 2000), no entanto, se faz necessários

experimentos mais aprofundados que comprovem o envolvimento do antagonismo do sistema nervoso simpático nestes efeitos.

Diante das respostas cardiovasculares agudas demonstrados acima, através da administração i.v. *in bolus* da substância, objetivou-se em seguida, investigar se o LQM01 era capaz de promover atividade anti-hipertensiva a partir da administração orogástrica do derivado. Para isto, foi realizado um protocolo de medida indireta da PA e FC, através do método de pletismografia de cauda, em ratos SHR conscientes, onde tais parâmetros foram avaliados antes e após o tratamento com LQM01 (5 e 10 mg/kg), durante um período de seis horas. O composto analisado induziu resposta anti-hipertensiva com as duas doses utilizadas a partir da segunda hora, o efeito anti-hipertensivo persiste na quarta e sexta hora apenas para a maior dose avaliada, sem promover alterações significativas sobre a FC em ambas as doses testadas. Este composto apresenta alto potencial na terapia anti-hipertensiva julgando por sua capacidade de reduzir a pressão arterial de maneira sustentada em ratos espontaneamente hipertensos. Esta atividade anti-hipertensiva pode ser em parte devido à redução da resistência vascular periférica, como demonstrado através do efeito vasorelaxante induzido por LQM01 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR.

O esquema que segue abaixo corresponde à representação hipotética do mecanismo de ação de LQM01 produzindo seus efeitos sobre o sistema cardiovascular (Figura 14).

Figura 14 – Representação esquemática dos efeitos cardiovasculares induzidos por LQM01



8 CONCLUSÕES

Os resultados expressos neste trabalho demonstram que o derivado aminoguanidínico LQM01 promove efeito vasodilatador independente de endotélio em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR, provavelmente, por meio da estimulação de canais para K^+ , por ativação dos K_v e BK_{Ca} além de atenuar o influxo de Ca^{2+} , por meio da inibição do influxo de Ca^{2+} através dos VOCCs. Isto posto, a resposta vasodilatadora parece ser causada por repolarização e hiperpolarização da membrana das CMLV

Nas condições experimentais *in vivo*, o derivado induziu resposta anti-hipertensiva, durante pelo menos 6 horas, a partir de sua administração por via oral, além disto, também foi capaz de promover efeito hipotensor e bradicárdico em ratos SHR não-anestesiados, a partir de sua administração por via intravenosa. Tais efeitos foram causados possivelmente devido a uma ação direta do LQM01 sobre a MLV, assim sendo, a hipotensão parece ser mediada por diminuição da resistência vascular periférica em decorrência da vasodilatação promovida pela ativação dos K_v , BK_{Ca} e bloqueio dos VOCCs e, somada a uma diminuição do débito cardíaco em função da bradicardia, como também pode ter influência inibitória sobre o sistema de controle neural que atua sobre o sistema cardiovascular.

Os estudos com LQM01 revelam efeitos cardiovasculares significativos, caracterizando uma molécula com alto potencial para o tratamento de patologias que atingem o sistema cardiovascular. Sendo necessários mais experimentos para que possa caracterizar melhor seus efeitos cardiovasculares e colaterais, bem como a segurança no seu uso para fins terapêuticos em humanos.

9. PERSPECTIVAS

- Investigar os efeitos de LQM01 sobre correntes de K^+ , através dos K_v e BK_{Ca} , utilizando técnica de “Patch-Clamp”
- Investigar os efeitos de LQM01 sobre correntes de Ca^{2+} , através dos Ca_v , utilizando técnica de “Patch-Clamp”
- Avaliar a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares
- Investigar o mecanismo dos efeitos cardiovasculares in vivo
- Avaliar a participação do SNC no efeito hipotensor e bradicárdico
- Avaliar o efeito anti-hipertensivo crônico durante 21 dias

REFERÊNCIAS

Abel, N. et al. Eighth Joint National Committee (JNC8) Guidelines and the Outpatient Management of Hypertension in the African-American Population. *N Am J Med Sci.* 7(10): 438–445. 2015.

Al-salahi. Biological effects of a new set 1,2,4-triazolo[1,5-a]quinazolines on heart rate and blood pressure. *Chem Central.* J.8 (1): 3. 2014.

Andreani, A. et al. Synthesis and antitumor activity of guanylhydrazones from 6-(2,4-dichloro-5-nitrophenyl)imidazo[2,1-b]thiazoles and 6-pyridylimidazo[2,1-b]thiazoles. *J Med Chem.* 49 (26):7897-901, 2006.

Andreani, A. et al. New antitumor imidazo[2,1-b]thiazole guanylhydrazones and analogues. *J Med Chem.* 51(4):809-16. 2008.

Barbosa, JH. et al. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab,* 52 : (6) 940-950. 2008.

Barreiro, EJ. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. *Quím. Nova* [online]. 25: (6b) 1172-1180. 2002.

Barreiro EJ. A Química medicinal e o paradigma do composto-protótipo *Rev. Virtual Quim.* 1(1). 2009.

Beaumont, E. et al. Vagus nerve stimulation mitigates intrinsic cardiac neuronal remodeling and cardiac hypertrophy induced by chronic pressure overload in guinea pig. *J Physiol Heart Circ Physiol.* 34:2159–219. 2016.

Behuliak, M. et al. Ca²⁺ sensitization and Ca²⁺ entry in the control of blood pressure and adrenergic vasoconstriction in conscious Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 31: 2025-2035. 2013.

Bohm, H-J; Flohr, A; Martin. Stahl Scaffold hopping. *Drug Discovery Today: Technologies.* 1(3). 2004.

Bohnert, T. et al . Evaluation of a New Molecular Entity as a Victim of Metabolic Drug-Drug Interactions - an Industry Perspective. *Drug Metab Dispos.* 2016.

Bousquet, P. Identification and Characterization of I1 Imidazoline Receptors. Their Role in Blood Pressure Regulation. *Am. J. Hypertens.* 13: 845–848. 2000.

Brayden, JE. Potassium Channels in Vascular Smooth Muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23, 1069–1076. 1996.

Brayden JE. Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 29:312–6. 2002.

Brignell, JL. et al. Steady-State Modulation of Voltage-Gated K⁺ Channels in Rat Arterial Smooth Muscle by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase and Protein Phosphatase 2B. 2015.

Calpham, DE. Calcium signaling. *Cell.* 14:1047-1058. 2007.

Campagnole-Santos MJ; Haibara AS. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens*, v. 8, p. 30-40. 2001.

Chalmers, S. et al. Prevenção da hipertensão e sua relação com o estilo de vida de trabalhadores. *Acta Paulista de Enfermagem.* 18: (2)184-189, 2005.

Chang, K-C. et al. Aminoguanidine prevents arterial stiffening and cardiac hypertrophy in streptozotocin-induced diabetes in rats. *British Jour of Pharmacol.* 147, 944–950. 2006.

Chi, W. et al.. Efficacy of combined administration of 0.2% brimonidine and 0.5% betaxolol in treatment of primary open angle glaucoma and ocular hypertension. *Eye Sci.* 28(4):190-4. 2013.

Clements, RT; Terentyev D; Sellke FW. Ca²⁺-Activated K⁺ Channels as Therapeutic Targets for Myocardial and Vascular Protection. *Circulation Journal* 79. 2015.

Cortes, J; Hall, B; Redden, DJ. Profound symptomatic bradycardia requiring transvenous pacing after a single dose of tizanidine. *Emerg Med.* 48(4):458-60. 2014.

Crisóstomo, FRP. et al. Molecular Simplification in Bioactive Molecules: Formal Synthesis of (+)-Muconin. *J. Org. Chem.* 71, 2339-2345. 2006.

Dharmashankar, K ; Widlansky, ME. Vascular Endothelial Function and Hypertension: Insights and Directions. *Curr Hypertens Rep.* 12(6): 448–455. 2010.

Dudek, M. et al. Comparison of the Anorectic Effect and Safety of the Alpha2-Adrenoceptor Ligands Guanfacine and Yohimbine in Rats with Diet-Induced Obesity. *PLoS One.* 10(10): e0141327. 2015.

Dorward, P. K. et al. The renal sympathetic baroreflex in the rabbit. Arterial and cardiac baroreceptor influences, resetting, and effects of anesthesia. *Circ Res.* 57: 618-633. 1985.

Ekelund, S. P; Nygren; R. Larsson, R. Guanidino-containing drugs in cancer chemotherapy: biochemical and clinical pharmacology, *Biochem. Pharmacol.* 61:1183–1193. 2001.

Epifânio, WAN. Síntese e avaliação citotóxica de derivados aminoguanidínicos planejados como protótipos de fármacos antineoplásicos. Dissertação de mestrado (Química e Biotecnologia) Universidade Federal de Alagoas. 2011

Evora, PRB. et al. Endotélio e óxido nítrico: História, fisiologia e as primeiras observações relacionadas com a hipertensão arterial. *Hiper. Ativo.* 2:(2)1-20, 1995.

Floyd R; Wray S. Calcium transporters and signaling in smooth muscle. *Cell Calcium.* v.42: 467-476, 2007.

Fluckiger, JP. et al. Attenuation of the baroreceptor reflex by general anesthetic agents in the normotensive rat. *Eur J Pharmacol.* 12;109(1):105-9. 1985.

Folkow, B. Relationship between vessel design and hemodynamics along the precapillary resistance compartment in normo and hypertension. *Blood Vess.*, 16: 277-280, 1979.

Folkow, B. Structure and function of the arteries in hypertension. *Am Heart J*, 114: 938-948, 1987.

França, PH. et al. Preliminary in vitro evaluation of the anti-proliferative activity of guanylhydrazone derivatives. *Acta Pharm.* 66(1):129-37. 2016.

- Fraga, CAM . Drug hybridization strategies: before or after lead identification? *Expert Opin Drug Dis.*4:605–609. 2009.
- Guantai, EM. et al. Design, synthesis and in vitro antimalarial evaluation of triazole-linked chalcone and dienone hybrid compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.*18:8243–8256. 2010.
- Go, AS. et al. An Effective Approach to High Blood Pressure Control, A Science Advisory From the American Heart Association, *the American College of Cardiology, and the Centers for Disease Control and Prevention Journal of the American College of Cardiology.* 63 (12). 2014.
- Godfrain, T. Antioxidant effect and The Therapeutic Mode of action Calcium of action Calcium Channel Blockers in hypertension and atherosclerosis. *Philosophical transactions of Royal Society: Biological Sciences.* 360 (1464): 2259-2272. 2005.
- Gourney, AM. Mechanism of Drug-induced vasodilatation. *journal of pharmacy and pharmacology,* 46: 242-251. 1994.
- Guyenet PG. The sympathetic control of pressure. *Nature.* 7: 335-346, 2006.
- Haick JM; Byron KL. Novel treatment strategies for smooth muscle disorders: Targeting Kv7 potassium channels, *Pharmacology & Therapeutic.*S0163-7258(16)30062-6. 2016.
- Hill, MA. et al Arteriolar myogenic signalling mechanisms: Implications for local vascular function. *Clin Hemorheol Microcirc.* 34: 67-79. 2006.
- Holmes, B. et al. Guanabenz. A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in hypertension. *Drugs.* 26(3):212-29. 1993.
- Hongmao, S; Gregory, T; Anders, W. Classification of scaffold-hopping Approaches. *Drug Discovery Today.* 17: 7-8. 2012.
- Huang, B. et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel 2-(Pyridin-3-yloxy) acetamide Derivatives as Potential Anti-HIV-1 Agents, *Chem Biol Drug Des;* 87: 283–289. 2016.

Islam, SM. et al. Prevalence of risk factors for hypertension: A cross-sectional study in an urban area of Bangladesh. *Glob Cardiol Sci Pract.* 20; (4):43. 2015.

Janne, J; Alhonen, L; Leinonen, P. Polyamines: From molecular Biology to Clinical Applications. *Ann Med* 23: 241- 259. 1991.

Jackson, WF. Ion Channels and Vascular Tone. *Hypertension.* 35(2):173-178. 2000.

Jobson, AG. et al. Identification of a Bis-guanylhydrazone [4,4_-Diacetyldiphenylurea-bis(guanylhydrazone); NSC 109555] as a Novel Chemotype for Inhibition of Chk2 Kinase. *Mol Pharmacol* 72(4):876–884. 2007.

Judd, EK; Oparil S. Novel strategies for treatment of resistant Hypertension. *Kidney International Supplements.* 3, 357–363. 2013.

Karaki, H. Weiss, G.B. Calcium release in smooth muscle. *life science.* 42: 111–122. 1998.

Karemaker, JM; Wesseling KH .Variability in cardiovascular control: the baroreflex reconsidered. *Cardiovascul Eng.* 8: 23-29. 2008.

Khownium, K. et al. Novel endotoxin-sequestering compounds with terephthalaldehyde-bis-guanylhydrazone scaffolds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16:1305–1308. 2006.

Korner, PI. et al. The effects of chloralose-urethane and sodium pentobarbitone anesthesia on the local and autonomic components of the circulatory response to arterial hypoxia. *J Physiol (Lond).*199, 283-302. 1968.

Ledoux, J. et al. Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. *Physiology.* 21: (6)9-78. 2006.

Lee, KN. et al. Prevalence and characteristics of resistant hypertension at primary clinics in Korea: a nationwide cross-sectional study. *Clinical Hypertension.* 22:4. 2016.

Liakos, CI. et al. Twenty-Four-Hour Urine α 1 -Microglobulin as a Marker of Hypertension-Induced Renal Impairment and Its Response on Different Blood Pressure-Lowering Drugs. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 309(1):H127-36. 2016.

Lima, LM; Barreiro, EJ. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. *Current Medicinal Chemistry*, 12: 23-49. 2005

Lithovius, R. et al. Antihypertensive treatment and resistant hypertension in patients with type 1 diabetes by stages of diabetic nephropathy. *Diabetes Care*. 37(3):709–17. 2014.

Lohmeier, TE. et al. Chronic Interactions Between Carotid Baroreceptors and Chemoreceptors in Obesity Hypertension. *Hypertension*. 68(1):227-35. 2016.

Mackie, AR; Byron, KL. Cardiovascular Kv7 Channel Function and Pharmacology. doi:10.1124/mol.108.049825. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics *Mol Pharmacol* 74:1171–1179. 2008.

Mancia, G. et al. Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 34:2159–219. 2013.

Martins, TLC. et al. Synthesis of Guanylhydrazones under Microwaver Irradiation. *Synthetic Communications*. 34: 3891-3899. 2004.

McCraty, R; Shaffer, F. Heart Rate Variability: New Perspectives on Physiological Mechanisms, Assessment of Self-regulatory Capacity, and Health Risk. *Global Advances In Health And Medicine* 4(1): 46-61. 2015.

Mitchel, BA; Brown, MH; Skurray, RA. Multidrug Efflux Pump from *Staphylococcus aureus*. Comparative Analysis of Resistance to Diamidines, Biguanidines and Guanylhydrazones. *Antimicrob. Agents and Chemotherap*. 42(2):475-477. 1997.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65: 55-63. 1983. FOLKOW, B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev*, v. 62, p. 347-504. 1982.

Mourão, AA. et al., Does the median preoptic nucleus contribute to sympathetic hyperactivity in spontaneously hypertensive rats? *Auton Neurosci*. 195:29-33. 2016.

Mulvany, M. J.; Aalkjaer, C. Structure and function of small arteries. *Physiol Res*, v. 70, p. 921-951. 1990.

- Nguyen, PH. et al. Structure-activity relationship study around guanabenz identifies two derivatives retaining antiprion activity but having lost α 2-adrenergic receptor agonistic activity. *ACS Chem Neurosci*. 5(10):1075-82. 2014.
- Noronha Neto, CC. et al. Clonidine versus Captopril for Severe Postpartum Hypertension: A Randomized Controlled Trial. *PLoS One*. 26; 12 (1): e0168124. 2017.
- Oh, K.-S. et al. The effects of chronic treatment with *Morus bombycis* KOIDZUMI in spontaneously hypertensive rats, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 30 (7):1278–1283. 2007.
- Oh, K.-S. et al. Antihypertensive, vasorelaxant, and antioxidant effect of root bark of *Ulmus macrocarpa*, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 31(11) 2090–2096, 2008.
- Ozyazgan, S. et al. Impaired relaxation in aorta from streptozotocin-diabetic rats: effect of aminoguanidine treatment. *Int. J. Exp. Diabet. Res.*, 1, 145–153. 2000.
- Padmanabhan S; Caulfield M; Dominiczak AF. Genetic and molecular aspects of hypertension. *Circ Res*. 13;116(6):937-59. 2015.
- Papanastasiou, I. et al. Design, Synthesis, and Trypanocidal Activity of New Aminoadamantane Derivatives. *J. Med. Chem*. 51 (5):1496–1500. 2008.
- Park, K-H; Park, W-J. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *J Korean Med Sci*. 30: 1213-1225. 2015.
- Parving, HH. Diabetic nephropathy: prevention and treatment. *Kidney Int.*, 60, 2041–2055. 2001.
- Paulis, L. et al. Nifedipine-sensitive noradrenergic vasoconstriction is enhanced in spontaneously hypertensive rats: the influence of chronic captopril treatment. *Acta Physiol (Oxf)*. 191: 255-266. 2007.
- Pintérová, M. et al. Impaired Control of L-Type Voltage-Dependent Calcium Channels in Experimental Hypertension. *Physiol. Res*. 8(2):S43-S54. 2009.
- Pintérová, M. et al. Altered Neural and Vascular Mechanisms in Hypertension. *Physiol. Res*. 60: 381-402, 2011.

- Pires, PW; Jackson, WF; Dorrance, AM. Regulation of myogenic tone and structure of parenchymal arterioles by hypertension and the mineralocorticoid receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 309(1):H127-36. 2015
- Pravenec, M. et al. Folate deficiency is associated with oxidative stress, increased blood pressure, and insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 26:135-140. 2013.
- Pravenec, M. et al. Recent Progress in the Genetics of Spontaneously Hypertensive Rats. *Physiol. Res.* 63 (1): S1-S8. 2014.
- Ruan, C-H. et al. Prostacyclin for Pulmonary Arterial Hypertension. *Texas Heart Institute Journal.* 37: (4) 391-399. 2010.
- Rubaiy, HN. The therapeutic agents that target ATP-sensitive potassium channels. *Acta Pharm.* 1;66(1):23-34. 2016.
- Saklayen, M G; Deshpande , NV. Timeline of History of Hypertension Treatment. *Review. Frontiers in Cardiovascular Medicine.* 3 (3). 2016.
- Sanders, KM. Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J Appl Physiol,* 91: 1438-1449. 2001.
- Shrivastava, SRS; Prateek, SS; Jegadeesh, R. The Determinants and Scope of Public Health Interventions to Tackle the Global. Problem of Hypertension. *Int J Prev Med.* 5(7): 807–812. 2014.
- Sim, JJ. et al.Characteristics of Resistant Hypertension in a Large Ethnically Diverse Hypertension Population of an Integrated Health System. *Mayo Clin Proc.* 88(10): 1099–1107. 2013.
- Smets, LA; Bout, B; Wisse, J. Cytotoxic and antitumor effects of the Norepinephrine analogue meta-iodo-benzylguanidine (MIBG). *Cancer Chemother Pharmacol.* 21: 9-13. 1988.
- Smith, TL; Hutchins, PM. Anesthetic effects on hemodynamics of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Am J Physiol.* 238: H539-H544. 1980.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Rev Bras Hipertens.* 17(1):7-10. 2010.

Somlyo, AP; Somlyo, AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature.* 17;372(6503):231-6. 1994.

Soulis, T. et al. A novel inhibitor of advanced glycation end-product formation inhibits mesenteric vascular. 1999.

Stadler, K. et al. Beneficial effects of aminoguanidine on the cardiovascular system of diabetic rats. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 21, 189–196. 2005.

Su, JB. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. *World J Cardiol.* 26; 7(11): 719-741. 2015.

Sun, J. et al. Vanillin derivatives as the selective small molecule inhibitors of FtsZ. *Med Chem Res* 23:2985–2994. 2014.

Sundberg, RJ. et al. Cationic antiprotozoal drugs. Trypanocidal activity of 2-(4'-formylphenyl)imidazo[1,2-a]pyridinium guanylhydrazones and related derivatives of quaternary heteroaromatic compounds. *J Med Chem.* 33(1):298-307. 1990.

Szabo, B. Imidazoline Antihypertensive Drugs: A Critical Review on Their Mechanism of Action. *Pharmacol. Ther.* 93, 1–35. 2002.

Tayebati, SK; Tomassoni, D; Amenta, F. Spontaneously hypertensive rat as a model of vascular brain disorder: microanatomy, neurochemistry and behavior. *J Neurol Sci.* 322(1-2):241-9. 2012.

Urich, P; Cerami, A. Trypanocidal 1,3 arylene diketone bis (guanylhydrazone) Structure-Activity relationship among substituted and heterocyclic analogues. *J Med Chem.* 27: 35-40. 1984.

Valenzuela-Flores, AA. et al. Recomendaciones de la guía de práctica clínica de hipertensión arterial en el primer nivel de atención. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 54(2):249-60. 2016.

- Viegas-Junior, C; Danuello A, Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. *Current Medicinal Chemistry*, 14: 1829-1852. 2007.
- Walzer, PD. Guanylhydrazones in therapy of pneumocystis carinii pneumonia in immunosuppressed rats. *Antimicrob Agents Chemother*. 32: 2572-2576. 2005.
- Wang, J. Liu, H. Lead compound optimization strategy (1)-changing metabolic pathways and optimizing metabolism stability. *Acta pharmacy. sinica*. 48(10):1521-31. 2013.
- Wang, X. et al. Attenuation of Hypertension Development by Aminoguanidine in Spontaneously Hypertensive Rats: Role of Methylglyoxal. *The American Journal of Hypertensio*. 20: 629–636. 2007.
- Webb, RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advences in Physiology Education*. 27: 201-206. 2003.
- Wenyan, Wu. et al. Structure-Activity Relationships of Lipopolysaccharide Sequestration in Guanylhydrazone-bearing Lipopolyamines *Bioorg Med Chem*. 15; 17(2): 709–715. 2009.
- White, SW; Mcritchie, RJ. Nasopharyngeal reflexes: Integrative analysis of evoked respiratory and cardiovascular effects. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 5: 17-31. 1973.
- Zhan, P. et al. Hiv-1nrtis: Structural Diversity, Pharmacophore Similarity, and Implications for Drug Design . *Medicinal Research Reviews*, 33 (s1): E1–E72. 2013.
- Zicha J. et al. The Interaction of Calcium Entry and Calcium Sensitization in the Control of Vascular Tone and Blood Pressure of Normotensive and Hypertensive Rats .*Physiol. Res*. 63 (1): S19-S27. 2014.
- Zimpfer, M. et al. Pentobarbital alters compensatory neural and humoral mechanisms in response to hemorrhage. *Am J Physiol*. 243: H713-H721. 1982.