

DIMINUIÇÃO DO REMODELAMENTO CARDÍACO APÓS INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO NO TRATAMENTO COM DERIVADOS N-ACILINIDRAZÔNICOS

INFARTO DO MIOCÁRDIO

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde as doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causa de morte no mundo. Estima-se que 17,7 milhões de pessoas morreram por DCV em 2015, 31% de todas as mortes em nível global. No Brasil, em 2007 a taxa de mortalidade para DCV foi de 31,3% dos 540 óbitos por 100 mil habitantes, (Schmidt *et al.*, 2011).

Dentre as DCV o infarto do miocárdio (IM) é a principal causa de morte em todo o mundo, de acordo com *National Heart Lung and Blood Institute*. Além disso, o IM leva a disfunção cardíaca, caracterizando o início da insuficiência cardíaca (IC) (See *et al.*, 2005; Segura *et al.*, 2012; Ferrari *et al.*, 2016). Esta apresenta uma morbidade elevada no mundo ocidental com uma taxa de sobrevivência de apenas 50% após cinco anos de diagnóstico (Mozaffarian *et al.*, 2016).

Fisiopatologia do Infarto do miocárdio

A ocorrência da oclusão de uma artéria coronária epicárdica leva em poucas horas a morte de cardiomiócitos supridos pela coronária obstruída ocasionando o IM. Isso advém do fornecimento reduzido de oxigênio e da deficiência na produção de trifosfato de adenosina levando ao comprometimento da bomba de sódio-potássio e perda da integridade da membrana (Abbate *et al.*, 2002; Frangogiannis 2014).

O reparo cardíaco após o IM é resultado de uma orquestrada e complexa série de eventos, iniciada por inflamação intensa e infiltração de células imunes (fase inflamatória) que promove a digestão e limpeza de células danificadas e matriz extracelular (MEC) (3-4 dias), seguido da fase reparativa com resolução da inflamação, proliferação de fibroblastos cardíacos (FC), formação de cicatriz e neovascularização nos dias subsequentes (Frangogiannis *et al.*, 2012 e Nahrendorf *et al.*, 2010). Uma fase inflamatória desproporcionalmente prolongada, de excessiva magnitude, ou insuficiente suprimida pode levar ao dano sustentável e cicatrização inadequada, perda celular aumentada e disfunção contrátil, promovendo assim a expansão do IM, remodelamento adverso e dilatação da câmara (Kingdom *et al.* 2017).

A intensa resposta inflamatória é caracterizada principalmente por infiltração com neutrófilos, seguida de monócitos/macrófagos e linfócitos. Os monócitos infiltrantes expressam primeiro um fenótipo pró-inflamatório (M1), seguido de uma mudança para um fenótipo angiogênico e fibrótico (M2) (Yan *et al.*, 2013; Nahrendorf *et al.*, 2013). Há inicialmente a

expansão do IM devido a perda de tensão passiva. A dilatação aguda ventricular ocorre com afinamento da parede infartada, sem necrose adicional, e alongamento dos cardiomiócitos. Os FC geram uma cicatriz de colágeno não complacente para a manutenção da geometria ventricular e previne formação de aneurisma (Liao *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2013; Frangogiannis *et al.*, 2014).

O remodelamento ventricular refere-se a mudanças na geometria ventricular e rigidez, bem como mudanças epigenéticas, moleculares e funcionais que incluem tanto cardiomiócitos quanto outras células do coração, na área do IM e região remota (Cohn *et al.*, 2000).

O processo de remodelamento pós IM pode ser dividido em três fases que parcialmente se sobrepõem (Liao *et al.*, 2006), fase inflamatória, fase proliferativa e a fase de maturação. A fase inflamatória é mediada por citocinas que recrutam leucócitos e estes removem células necróticas e liberam fatores de crescimento e citocinas. Os neutrófilos tendem a sofrer apoptose ocasionando o desaparecimento gradual do infiltrado. Os detritos celulares ativam a inflamação através da caspase-1 ativa e conversão de pró-interleucina (IL) - 1 β em IL-1 β madura, fatores estes que aumentam a lesão tecidual e a resposta inflamatória local e sistêmica (Mezzaroma *et al.*, 2011; Van Tassell *et al.*, 2013). Os FC atuam na fase proliferativa, aumentando em número e sintetizando colágeno para formar uma cicatriz. O aumento do estresse da parede ventricular e a ativação neuro-humoral permanente provoca apoptose dos cardiomiócitos na área não isquêmica o que ocasiona o adelgaçamento da parede e dilatação da câmara, produzindo consequentemente aumento da massa do ventrículo esquerdo (VE), mas reduzindo a espessura relativa da parede, ou seja, uma hipertrofia excêntrica, com uma geometria esférica (Abbate *et al.*, 2008). Embora esta dilatação ventricular possa ser benéfica para a manutenção do débito cardíaco através do aumento do volume de enchimento ventricular durante as fases iniciais pós IM, este mecanismo compensatório tende a falhar e há progressiva deterioração da função cardíaca, desenvolvimento da IC, por processos multifatoriais e complexos conhecidos como remodelamento cardíaco (Shih *et al.*, 2011).

Além disso, a hipóxia durante a isquemia prejudica a integridade das células endoteliais vasculares e sua função de barreira aumenta a permeabilidade vascular, facilitando a infiltração de leucócitos (Eltzschig *et al.*, 2011). Se o período isquêmico for suficientemente prolongado, os programas de morte de cardiomiócitos são ativados, principalmente devido à necrose celular, mas também secundária à apoptose e mecanismos autofágicos (Frangogiannis *et al.*, 2012 e Eltzschig *et al.*, 2011). Necrose, estresse/injúria celular e MEC liberam substâncias que atuam como sinais de lesão, padrões moleculares associados a dano (DAMPs). Os DAMPs se ligam aos receptores de reconhecimento de padrões cognatos (PRRs) do sistema imune inato em células parenquimatosas sobreviventes e leucócitos infiltrantes (e também ativam a via do complemento) para ativar uma cascata de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão celular (Eltzschig *et al.*, 2011; Arslan *et al.*,

2011, de Haan et al., 2013, Ghigo et al., 2014, Mann 201, Prabhu e Frangogiannis 2016; Mann 2015; Latet *et al.*, 2015). Recentemente, foi demonstrado que o fragmento N-terminal da miosina cardíaca ligada proteína-C, a qual é liberado no local de injúria e na circulação após IM, promove ativação do macrófago/monócito via receptor Toll (TLR-2, e TLR-4) e receptor para produtos finais de glicação avançados (RAGE), e elevadas expressão de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 α e IL-6 (Lipps *et al.*, 2016).

Os monócitos/macrófagos podem ser divididos em dois subgrupos de acordo com as suas funções, inflamatórios (Ly6C^{high}) e anti-inflamatórios (Ly6C^{low}). Após o IM, há migração de monócitos inflamatórios (Dewald *et al.*, 2005), com função de remover tecido necrótico e expressem várias citocinas inflamatórias e MMP que desencadeiam o remodelamento tecidual (Maekawa *et al.*, 2004). E quando o sinal inflamatório é reprimido os monócitos anti-inflamatórios são recrutados para promover a angiogênese e depósito de colágeno, contribuindo para a cicatrização do tecido. Os DAMPs são reconhecidos pelos PRR na superfície de macrófagos residentes e monócitos de patrulhamento para iniciar a inflamação mediante a regulação da expressão de quimiocinas que atraem neutrófilos ativando-os e aumentam a produção de citocinas (TNF- α e IL-6) (Soehnlein e Lindbom, 2010). Os neutrófilos recrutados limpam os detritos celulares, degradam a matriz extracelular (ECM) e produzem espécies reativas de oxigênio (ROS), que danificam os tecidos circundantes e exacerba a inflamação. A produção excessiva de ROS, que inclui anión superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio, e a incapacidade do sistema antioxidante para neutralizá-los, causa estresse oxidativo (Saparov *et al.* 2013). As ROS podem ativar diretamente as vias intracelulares ERK, JNK e p38 MAPK em fibroblastos cardíacos (Saparov *et al.*, 2001) e posteriormente afetar os processos de remodelamento cardíaco, incluindo fibrose, deposição de colágeno e ativação de metaloproteínase (MMP) (Nian *et al.*, 2004).

Diversas evidências sugerem que os FC contribuem para a fase inflamatória e de remodelamento através de secreção de importantes citocinas e quimiocinas (Turner et al., 2009, 2010, 2011). A transição da fase inflamatória para a fase fibrótica da remodelação ocorre tipicamente 3 a 7 dias após o IM, dependendo da espécie (Dewald et al., 2004) e parece ser mediada pelo aumento da produção de fatores anti-inflamatórios e profibróticos, como o fator de crescimento transformador- β (TGF- β) e IL-10, derivados tanto de células imunes infiltrantes quanto de células miocárdicas. Em resposta a esses fatores, os FC sintetizam quantidades aumentadas de proteínas estruturais da MEC, particularmente colágenos fibrilares tipo I e III, para facilitar a formação de cicatriz.

O remodelamento equilibrado da MEC é crucial, pois a força inadequada da parede miocárdica levará à dilatação cardíaca, enquanto o acúmulo excessivo ou prolongado da MEC pode resultar em fibrose. Embora a dilatação cardíaca afete primariamente a função sistólica, a fibrose endurece o miocárdio e dificulta a fase de enchimento diastólico (van Nieuwenhoven

and Turner 2013). Os FC expressam níveis aumentados de proteínas contráteis, como a actina do músculo liso alfa (α -SMA), vimentina e proteínas de adesão focal que lhes permitem contrair a área da cicatriz para permitir a cicatrização efetiva (van den Borne et al., 2010).

De forma controversa os FC também são fonte de proteases, incluindo as MMP, enzimas com função de degradar todos os componentes proteicos da MEC miocárdica (Spinale, 2007). Os FC expressam várias MMPs diferentes, incluindo MMP-1, -2, -3, -9 e -14, e sua expressão e ativação podem ser moduladas diferencialmente por vários fatores pró-inflamatórios (IL-1, TNF α) e profibróticos (TGF- β , Ang II) (Turner e Porter, 2012). Os FC controlam ainda a atividade proteolítica das MMPs por meio da regulação da expressão e secreção de TIMPs, os inibidores endógenos de MMPs, sendo TIMP-1 e TIMP-2 as principais formas expressas por eles (Brown et al., 2007; Turner et al., 2010).

De acordo com os argumentos acima apresentado os eventos que ocorrem após o IM são claramente complexos e regulados temporal e quantitativamente por alterações de moléculas bioativas. Contudo, são necessários mais estudos para se compreender a interação entres os fatores pró-inflamatórios e prófibrótico para o desenvolvimento de novas terapias para reduzir o remodelamento cardíaco sem alterar os processos essenciais de reparo.

RECEPTORES DE ADENOSINA

Os receptores de adenosina (AR) são acoplados à proteína G e classificados em, A₁-AR e A₃-AR que ativam proteína G_{i/o} promovendo a inibição de adenilato ciclase (AC) e A₂-AR, com ação via proteína G_s e ativação de AC (Mubagwa e Flameng 2001). O A₂-AR foi subsequentemente dividido de acordo com a existência de sítios de ligação de alta afinidade (A_{2A}-AR) versus baixa afinidade (A_{2B}-AR) pela adenosina. Além disso, A_{2B}-AR também ativam proteína G_{q/11} em diferentes tipos celulares (Feoktistov e Biaggioni, 1997, Linden *et al.*, 1999). Os quatro subtipos de AR estão expressos em todo o coração em diferentes níveis de expressão (Yang *et al.*, 2007; Chandrasekera *et al.*, 2010). A adenosina atuando nestes receptores medeia uma diversidade de ações ajustando a função cardiovascular, melhorando o equilíbrio energético celular e promovendo a resistência celular ao estresse ou lesão (Olsson e Pearson, 1990; Shryock e Belardinelli, 1997), ocorre uma ativação sincrônica dos subtipos de AR resultando na transdução de sinais complementares e opostos para a regulação ajustada destas funções (Vecchio *et al.*, 2017).

Uma vez que o sistema de AR auxilia a formação, desenvolvimento, regulação fisiológica e estresse ou resistência à doenças cardíacas, torna-se alvo importante para desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças cardiovasculares.

Há evidências funcionais da presença de A_{2A}-AR ventricular com ação inotrópica positiva em miócitos de mamíferos (Dobson e Fenton, 1997; Monahan *et al.*, 2000), envolvendo o aumento do transiente de Ca²⁺ dependente de proteína cinase A (PKA) (Dobson *et al.*, 2008). Contudo, os estudos relacionados à função contrátil da ativação deste receptor em músculo cardíaco ainda são controversos, há estudos que demonstram efeitos contráteis diretos da ativação de A_{2A}-AR em ventrículo de roedores (Xu *et al.*, 1996; Morrison *et al.*, 2002), enquanto outros trabalhos não identificaram a sensibilidade ventricular aos A_{2A}-AR (Lasley e Mentzer, 1992; Willems & Headrick, 2007). A hiper-expressão de A_{2A}-AR foi associada ao aumento da contratilidade cardíaca, assim como ao aumento da expressão de SERCA2a e recaptação de Ca²⁺ pelo RS (Chan *et al.*, 2008). O papel da sinalização mediada por A_{2A}-AR em modelo de isquemia e reperfusão em ratos sugere benefícios sobre a função e hemodinâmica cardíaca.

O A_{2A}-AR é expresso também em células do sistema imune como neutrófilos, monócitos, macrófagos, células T, e sua ativação pela adenosina ou análogos resulta em uma ampla gama de resposta anti-inflamatória e imunossupressora (Hasko *et al.*, 2008). Ativação de A_{2A}-AR em macrófagos pode suprimir resposta inflamatória pela regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, inibição da liberação de TNF- α e IL-12 (Kreckler *et al.*, 2006; Hasko *et al.*, 2000). A redução da liberação de TNF- α foi associada com a redução da ativação da via de sinalização de NF κ B, além disso, a ativação de A_{2A}-AR também promove a liberação da citocina anti-inflamatória IL-10. E como sugeriu Patel e colaboradores (2009), a ativação seletiva de A_{2A}-AR poderia promover cardioproteção via mecanismos anti-inflamatórios sem ativação de outros subtipos de receptores (Patel *et al.*, 2009).

A expressão de A_{2A}-AR foi demonstrada em FC modulando o crescimento e a fibrose cardíaca (Epperson *et al.*, 2009). Os FC apresentam mRNA para todos os AR, com níveis de expressão mais alta para A_{2B}-AR, seguido de A_{2A}-AR com transcrição para A₁-AR e A₃-AR muito reduzida. De acordo com o tipo de AR ativado, os FC podem ser induzidos a gerar proteínas de ECM em excesso, levando ao remodelamento adverso, fibrose, disfunção contrátil e IC, via ativação de receptores A_{2B}-AR (Vecchio *et al.*, 2017), contudo a ativação de A_{2A}-AR evitaria estas respostas maladaptativas. A supressão de A_{2A}-AR em camundongos promoveu proteção contra o desenvolvimento de IC induzida por aumento da pós-carga e da fibrose e induziu a melhora da função cardíaca (Hamad *et al.*, 2012). Assim como a alta expressão deste subtipo de AR em ratos estimulou o acúmulo de cAMP, segundo mensageiro antifibrótico (Sassi *et al.*, 2014). Ações pró e anti-fibrotica tem sido atribuída à ativação de AR. O cAMP tem sido considerado de importância central na inibição da atividade de FC (Swaney *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2014). O aumento da cAMP em FC através da ativação de agonista não seletivo de AR, 50-etilcarboxamidoadenosina (NECA) (Epperson *et al.*, 2009) reduz a síntese de colágeno estimulada por AngII via fator de troca ativado diretamente por cAMP (EPCA) e

fosfoinositol-3 cinase (PI3K) (Villarreal *et al.*, 2009). Desta forma essa redução de colágeno poderia ocorrer via estimulação do A_{2A}-AR e A_{2B}-AR, uma vez que ambos estão acoplados a proteína Gs responsável pela ativação da via do cAMP, contudo o A_{2B}-AR pode atuar como pró-fibrótico através da proteína Gq via ativação da PLCβ. O bloqueio de A_{2B}-AR inibe a atividade da caspase-1 e infiltrado celular (Toldo *et al.*, 2012), e reduz a secreção de mediadores pró-fibrótico e pró-inflamatórios como TGF-β, TNF-α e IL-6 após IM (Feng *et al.*, 2009; Toldo *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). A expressão de IL-6 em FC cardíacos ocorre através da ativação de A_{2B}-AR via PKCδ/p38-MAPK, exercendo efeitos pleiotrópicos no remodelamento (Feng *et al.*, 2009). Assim como, a crônica supra expressão cardíaca de A₁-AR de camundongos tem sido associado à fibrose cardíaca e cardiomiopatia dilatada (Funakoshi *et al.*, 2006), provavelmente por sua ação inibitória de AC e consequentemente redução de cAMP.

Da Silva e colaboradores (2017) demonstraram que o tratamento oral de ratos hipertensos submetidos ao IM com um agonistas de A_{2A}-AR evitou o desenvolvimento de fibrose cardíaca, caracterizado pela redução da presença de colágeno no VE bem como a redução da expressão de TNF-α cardíaco. Corroborando com os resultados demonstrados por Kubota e colaboradores (1997). As MMPs também atuam neste remodelamento dependente da inflamação e a secreção de MMP-9 é regulada de acordo com o subtipo de AR ativado em diferentes células. Ativação de A₃-AR em macrófagos ativa a secreção de MMP-9 (Velot *et al.*, 2008), enquanto que ativação de A_{2B}-AR e A_{2A}-AR inibe a secreção de MMP-9 em monócitos (Zhao *et al.*, 2008) e neutrófilos (Ernens *et al.*, 2006), respectivamente. Acredita-se que níveis elevados de MMP-9 induz a degradação de matriz extracelular e esteja envolvida com redução de revascularização (Velot *et al.*, 2008), desta forma, a utilização de um agonista de A_{2A}-AR poderia impedir a degradação da ECM quanto melhorar a induzir a revascularização após o IM. Já foi demonstrado que a ativação de A_{2A}-AR estimula a produção de VEGR por macrófagos (Ernens *et al.*, 2010) assim como ativação destes receptores pode alterar o fenótipo de macrófagos de pró-inflamatórios para pró-angiogênico (Pinhal-Enfield *et al.*, 2003). Outro fator importante relacionado à vasculatura é que a estimulação de A_{2A}-AR pode inibir a apoptose endotelial (Delikouras *et al.*, 2003), melhorando, portanto, uma resposta vasodilatadora tanto sistêmica quanto cardíaca.

Combinado com as ações anti-inflamatórias conhecidas do A_{2A}-AR no coração (Linden, 2001; Haskó *et al.*, 2008), há certamente motivos válidos para sugerir que a sinalização A_{2A}-AR atenuaria a fibrose cardíaca. No entanto, é necessário um trabalho adicional para esclarecer o papel exato do A_{2A}-AR.

DERIVADOS N-ACILINIDRAZÔNICOS

O remodelamento ventricular é um alvo de intervenção pós o IM. De acordo com Seropian e colaboradores (2014) apesar das modernas estratégias de reperfusão e terapias de bloqueio neuro-hormonal (inibidores do sistema renina-angiotensina-aldosterona e do sistema adrenérgico), a incidência de IC após IM permanece inaceitavelmente alto, existindo assim, uma necessidade urgente de novos tratamentos para melhorar a qualidade de vida pós-IM e a sobrevivência.

O Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) vem estudando o planejamento, a síntese e as propriedades farmacológicas de novos derivados *N*-acilidrazônicos bioativos (Barreiro et al., 2002), e tem identificado inúmeros compostos com propriedades anti-inflamatórias, antitrombóticas e analgésicas (Lima et al., 2000). O emprego da estratégia de simplificação molecular sobre os derivados diidro(2H)piridazinônicos e inibidores de PDE permitiu identificar a função *N*-acilidrazona. A inclusão do anel 1,3-benzodioxola, presente no safrol ligado ao grupamento acila e substituída do anel fenila ligado a imina pelo anel bioisostérico 2-tienila resultando no planejamento da 3,4-metilenodioxibenzoil-2-tienilidrazona, LASSBio-294. Inicialmente, foi demonstrados sua atividade vasodilatadora via óxido nítrico (NO) (Silva et al. 2002), bem que esta ação é bloqueada antagonista de A_{2A}-AR, ZM 241385, (dados não mostrado do nosso laboratório) e também via estudo de *binding* identificou-se que LASSBio-294 é ligante de A_{2A}-AR. Em diversos estudos nosso grupo demonstrou que o LASSBio-294 reduz a fibrose cardíaca, o infiltrado celular e impede o desenvolvimento da IC em modelos experimentais de IM (Costa et al., 2010, Da Silva et al., 2017), com aumento no acúmulo de Ca²⁺ no retículo sarcoplasmático de fibras cardíacas (Costa, *et al.*, 2010), aumento da expressão de SERCA2a (Costa, *et al.*, 2010; Da Silva et al., 2017) e redução da expressão de TNF- α (Da silva 2017). Além disso, verificou-se que este composto impediu o desenvolvimento de intolerância ao exercício físico podendo correlacionando-se com a melhora da função cardíaca e com relação aos seus efeitos na musculatura esquelética, uma vez que foi demonstrado que as alterações induzidas pelo infarto no músculo esquelético de ratos não desenvolveram nos animais que foram tratados com a substância (da Silva, *et al.*, 2014).

Visando a potencialização da atividade sobre o sistema cardiovascular do LASSBio-294, uma série de modificações estruturais foi introduzida na estrutura deste protótipo gerando

vários derivados, dentre eles, o (E)-*N'*-(benzo [d] [1,3] dioxola -5- metileno) tiofeno-2-carbozihidrazida (LASSBio-1027). O LASSBio-1027 é um retro-isómero do LASSBio-294. Este sofreu uma inversão dos grupos funcionais ligados à subunidade *N*-acilidrazona. O anel tiofeno ligado a função imina no LASSBio-294 encontra-se ligado a carbonila da subunidade *N*-acilidrazônica no LASSBio-1027. Já o anel 1,3 benzodioxola ligado a carbonila na molécula protótipo encontra-se ligado a função imina no derivado. Após a síntese, foi realizado o binding pelo Cerep do LASSBio-1027, que deslocou 47,5% e 67,5%, respectivamente, os ligantes seletivos radiomarcados [³H]CGS21680 e [¹²⁵I]AB-MECA dos A_{2A}-AR e A₃-AR, respectivamente. (Leal et al., 2012). Outro protocolo utilizado foi o de ancoramento molecular (docking), demonstrou através da estrutura cristalográfica do subtipo A_{2A} a afinidade do LASSBio-1027 para o receptor A_{2A}-AR. A partir do LASSBio-1027 diversas substâncias foram sintetizadas e o aumento da extensão da aromaticidade do grupamento ligado a subunidade acila da função *N*-acilidrazona gerou os compostos LASSBio-1860, e LASSBio-1900, os quais apresentaram afinidade para A_{2A}-AR semelhante ao protótipo em ensaios de *binding* avaliado a capacidade de deslocarem o radioligante antagonista do A_{2A}-AR, [³H]-ZM241385, iguais a LASSBio-1860 – 45%, e LASSBio-1900 – 53%.

A partir destas observações, as substâncias LASSBio-1027 e seus derivados LASSBio-1860 e LASSBio-1900 serão utilizadas neste projeto com intuito de avaliação de seus possíveis efeitos na melhora do remodelamento cardíaco utilizando em modelo de IM agudo, bem com avaliação dos possíveis mecanismos de ação destas substâncias visando ativação de receptores de adenosina A_{2A} e A₃.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais previstos em protocolos foram autorizados pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ sob o número 103/17. Os animais foram criados no biotério do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da mesma universidade.

Os experimentos serão procedidos com ratos Wistar machos, com peso entre 180g e 200g. Os animais permanecerão no biotério supracitado, mantidos em gaiola com base de polietileno e grade superior de alumínio, sendo quatro deles por caixa. As condições de são todas monitoradas, incluindo temperatura, ciclo claro/escuro de 12 horas, com fase clara de 6h às 18h. O acesso á agua e ração do tipo pellets é livre.

MODELO DO INFARTO DO MIOCÁRDIO EXPERIMENTAL

O modelo experimental de cirurgia para indução do IM o qual os animais serão submetidos se procederá em condições assépticas de maneira indolor.

A anestesia será a base de isoflurano 3%, manutenção de 1,5% com os animais mantidos em decúbito dorsal. Em seguida é realizada incisão paraesternal esquerda e dissecação dos músculos peitorais grane e pequeno, respectivamente. O coração, então, exteriorizado entre o 4º e 5º espaços intercostais, sofrerá oclusão total da artéria coronariana descendente anterior por meio de ligadura da mesma com fio de seda 6.0.

Imediatamente após o coração é recolocado na cavidade torácica e feita a sutura com fio de seda 3.0, seguido de ventilação assistida. O grupo controle com animais falso-operados (Sham), serão submetidos ao mesmo procedimento de exteriorização do aparelho cardíaco, no entanto não ocorrerá a ligadura da artéria citada acima. (Costa, *et al.*, 2010).

CONFIRMAÇÃO DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

Registro do Eletrocardiograma (ECG) após o infarto do miocárdio

A realização do ECG se procederá antes da cirurgia experimental de ligadura da artéria coronária descendente anterior e quinze minutos após o término para confirmar o IM. Os eletrodos (MLA 1204 Needle Electrodes – 2 mm Pin - ADInstruments) acoplados ao amplificador e ao digitalizador para aquisição do sinal (Powerlab, ADInstruments) serão fixados no tórax dos animais para o registro do ECG na derivação D2. A análise dos dados obtidos será realizada utilizando-se o software LabChart (Versão 7,0, ADInstruments).

O IM será constatado através do surgimento da elevação do segmento ST, que conota padrão agudo de lesão, e/ou o aparecimento de onda Q. (da Silva *et al.*, 2014).

Ecocardiografia

Quatro horas após o término da realização das cirurgias, os animais serão submetidos a anestesia com isoflurano 3% e mantidos a 1% para nova confirmação do IM. Desta vez, será utilizado ecocardiógrafo equipado com transdutor 10MHz (Vevo 770 High-Resolution In Vivo Micro-Imaging System, FUJIFILM Visual Sonic, Inc., Toronto, Ontario, Canada).

A verificação do IM se dará através de imagem no eixo curto em modo-M, na altura dos músculos papilares e os animais terão o infarto confirmado quando não apresentarem motilidade de parede anterior ventricular esquerda (da Silva *et al.*, 2017).

TRATAMENTO COM DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS

Os derivados *N*-acilidrazônicos utilizados para tratamento na realização desse trabalho, serão sintetizados pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), presente no Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ. Os mesmos serão solubilizados de dimetilsulfóxido (DMSO).

O grupo dos animais falso-operados (Sham) será tratado apenas com o DMSO, enquanto que os animais infartados serão subdivididos para o tratamento da seguinte maneira:

1. Veículo, utilizado como controle;
2. Controle positivo;
3. Derivados do *N*-acilidrazônicos, 30µmol/kg;
4. Derivados do *N*-acilidrazônicos, 70µmol/kg.

O tratamento será procedido diariamente, por uma semana a partir da cirurgia, com dose única diária e administrada por via oral. As substâncias utilizadas serão concentradas em 25 mg/ml.

HEMODINÂMICA

Ecocardiografia – Avaliação não invasiva

Para este procedimento os animais serão levemente sedados com 3% de isoflurano e, em seguida mantidos à 1,5%.

Estrutura e função cardíaca serão avaliadas, após o término do protocolo experimental de tratamento, utilizando ecocardiógrafo equipado com transdutor 10 MHz (Vevo 770 High-Resolution In Vivo Micro-Imaging System, FUJIFILM Visual Sonic, Inc., Toronto, Ontario, Canada). As imagens são obtidas nos eixos curto e longo na linha paraesternal.

Os parâmetros estruturais a serem avaliados: diâmetro interno, espessura da parede anterior e posterior nas fases do ciclo cardíaco de sístole e diástole e partindo desses dados serão calculados os valores da espessura relativa de parede, bem como a massa do ventrículo esquerdo.

No que diz respeito a função cardíaca, será analisada pelo cálculo do método de Simpson a fração de ejeção, o volume sistólico e o volume diastólico. A realização do Doppler da válvula mitral será procedida para obtenção da velocidade integrante do fluxo mitral rápido (E) e lento (A), bem como o doppler tecidual obtendo fluxos rápidos (e') e lento (a'). A partir disso, seguirá o cálculo da pressão de enchimento pela relação E/e'.

Todas as medidas mencionadas serão obtidas segundo orientações das Diretrizes da Sociedade Americana de Ecocardiografia (da Silva *et al.*, 2017).

PV loop – Avaliação invasiva

Após avaliação ecocardiográfica, os animais serão submetidos a medidas invasivas de frequência cardíaca, pressão arterial (PA) e pressão ventricular esquerda (PVE).

Os animais serão mantidos sob anestesia com cetamina e xilazina (80/15 mg/kg, i.p). Então, seguirá com dissecação da artéria carótida direita e inserção de cateter (Rat PV Catheter 2F, 4E, 9 mm, 15 cm, PI - ADInstruments) para se obter medidas dos parâmetros arteriais com o PV loop conectado ao transdutor de pressão e volume (MPVS Ultra Foundation Systems, ADInstruments) calibrado para registro da pressão arterial. Imediatamente após o cateter continuará sendo introduzido até a cavidade ventricular esquerda, para registro da pressão ventricular esquerda sistólica (PVES), pressão ventricular esquerda diastólica final (PVEDF), derivadas $+dP/dt$ e $-dP/dt$, constante de declínio da PVE (Tau), volumes sistólico e diastólico, fração de ejeção, débito cardíaco, bem como a relação da pressão volume de diastólico final (RPVDF) e a relação da pressão de volume sistólico final (RPVVF).

Os dados coletados depois de observados serão armazenados em computador para posterior análise (Powerlab, ADInstruments) através do programa Lab Chart (7.0 Version, ADInstruments).

COLETA E PREPARO DOS TECIDOS

Findada a obtenção de dados para análise de aspectos hemodinâmicos, os animais serão em seguida sacrificados tendo seus corações removidos e pesados para avaliação indireta da hipertrofia cardíaca [utilização da relação coração/tíbia]. Posteriormente, serão divididos em três fragmentos com cortes transversais ao eixo base-ápice.

O fragmento apical será envolvido em OCT Compound (Sakura Finetek, EUA) e rapidamente congelado em um banho de acetona/nitrogênio líquido para realização de cortes a 10 µm em criostato (Leica Biosystems, Alemanha). Já o fragmento medial será destinado a imediato congelamento em nitrogênio líquido para posterior análise por Western blot.

O fragmento basal, por sua vez, será fixado em formol a 10% pelo período mínimo de uma semana seguido de impregnação em parafina nos tecidos dessa forma:

- imersão em etanol 70% por 16 horas;
- 3 banhos de 40 minutos em etanol absoluto;
- 3 banhos de 20 minutos em xileno;
- 2 banhos de 60 minutos em parafina a 60°C.

Por último, os tecidos serão incluídos em blocos de parafina para corte a 5µm em micrótomo rotativo (Lupetec, Brasil)

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após produção dos cortes em parafinas ocorrerá a fixação em lâminas histológicas, incubados em estufa a 60°C por um período de 16 horas seguidos por um procedimento de desparafinização/reidratação por imersão em 3 banhos de xileno por 15 minutos. 3 banhos de etanol absoluto por 5 minutos, 2 banhos de etanol 70% por 5 minutos e 2 banhos em água destilada por 5 minutos.

Posteriormente, as lâminas serão coradas pelos métodos adequados para avaliação dos parâmetros histopatológicos e morfométricos.

Método do Picro-Sirius Red (PSR)

Este método servirá tanto para mensurar a extensão do infarto, quanto a quantificação da área de fibrose no miocárdio viável. Isso é possível, uma vez que a coloração picro-sirius red evidencia as fibras colágenas em vermelho, enquanto mantém o tecido ao fundo na cor amarela (Dolber e Spach, 1993).

Os cortes após reidratação serão imersos em ácido fosfomolibdico a 0,2% por 1 minuto, rinsados em água destilada e corados por 90 minutos em solução de picro-sirius red. Seguirá com lavagem em ácido clorídrico 0,01 N por 2 minutos e rapidamente em água destilada, as lâminas serão desidratadas em banhos de etanol absoluto (3 de 5 minutos) e xileno (3 de 5 minutos) para montagem com resina Entellan (Merck, Alemanha).

A extensão do infarto será realizada com auxílio do programa Fiji/ImageJ2 (Schindelin *et al.*, 2012), bem como expressa em percentil da circunferência interna do ventrículo esquerdo correspondente ao segmento de infarto transmural (REF).

Para a área de fibrose, 5 a 10 fotos de cada lâmina serão obtidas com uma câmera digital A620 (Canon, EUA) em microscópio ótico Axiostar plus (Zeiss, Alemanha) com magnificação de 400x e a área de deposição de colágeno será medida, em cada foto, também com a utilização do programa Fiji/ImageJ2. No final, a fibrose intersticial será determinada como a média das áreas de colágeno obtidas, normalizadas pela área de tecido em cada foto (da Silva *et al.*, 2017).

Método Hematoxilina e Eosina (H&E)

O método da hematoxilina e eosina será utilizado para avaliar integridade tecidual (arranjo e morfologia das fibras cardíacas) e a presença de infiltrados inflamatórios. Essa técnica de coloração permitirá distinguir os núcleos das células intersticiais, corados em roxo, do citoplasma e matriz extracelular, corados em diferentes tons de rosa (Suvarna *et al.*, 2013).

Após reidratação, os cortes serão imersos em Hematoxilina de Harris por 15 min e lavados em água corrente por 5 minutos. As lâminas serão colocadas em água destilada por duas vezes de 5 minutos. Por fim, os cortes serão corados com mistura de Eosina-Floxina por 2 minutos e submetidos a um banho em ácido acético a 1% para fixação do corante antes de prosseguir para a desidratação e montagem como descrito anteriormente.

ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a avaliação da mudança de expressão proteica na região do miocárdio localizada na borda da área de infarto será realizada técnica imunohistoquímica com anticorpos determinados para os seguintes alvos: NF κ B p65, HIF-1 α , HMGB1, Nrf2, TGF- β , óxido nítrico sintases (iNOS, eNOS), VEGF, RAGE e α -SMA.

Ao serem reidratados, os cortes parafinados utilizados para essa técnica serão submetidos a uma etapa de recuperação antigênica em tampão citrato de sódio (0,1 M, pH= 6,0) aquecido a 96°C em banho-maria por 40 minutos, seguido por duas lavagens em tampão TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH= 7,4) por 5 minutos e bloqueio de ligações inespecíficas com albumina sérica bovina (BSA) a 5% em TBS por 30 minutos em câmara úmida. Posteriormente, incuba-se os cortes por 16 horas em geladeira com as soluções dos anticorpos em TBS contendo 1% de BSA. Após nova lavagem em tampão TBS, a atividade endógena de peroxidase será inibida usando-se solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 15 minutos seguida mais uma vez por duas lavagens de 5 minutos em TBS com Tween-20 a 0,5%.

A imunodeteção será realizada pela incubação com anticorpo secundário de cabra (Rat Max PO MULTI, Nichirei, Japão) por 60 minutos a temperatura ambiente e revelação com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB, Spring, EUA), gerando uma marcação de cor marrom. Por fim, os tecidos serão corados com Hematoxilina de Harris por 5 minutos para contraste e encaminhados para desidratação e montagem como descrito anteriormente.

Em seguida, 5 a 10 fotos de cada lâmina serão obtidas com uma câmera digital A620 (Canon, EUA) em microscópio ótico Axiostar plus (Zeiss, Alemanha) com magnificação de 400x e a área correspondente à imunomarcação em cada foto será medida com o programa Fiji/ImageJ2. A densidade superficial será determinada como a média das áreas de obtidas, normalizadas pela área de tecido em cada foto.

Anticorpos direcionados contra α -actinina sarcomérica, desmina, colágeno do tipo IV e pan-caderina serão usados para evidenciar mudanças estruturais nos cardiomiócitos em cortes frescos produzidos em criostato e imediatamente fixados em acetona a -20°C por 15 minutos. Os tecidos assim preparados serão incubados com solução de BSA a 3% em PBS (10 mM de Na₂HPO₄, 130 mM NaCl, pH= 7,4) e incubados por 16 horas com as soluções dos anticorpos em PBS contendo 1% de BSA. Após lavagem com PBS com Tween-20 a 0,5%, será realizada a imunodeteção pela incubação com anticorpos de cabra fluorescentes (Invitrogen, EUA). Após lavagem em PBS e coloração dos núcleos com DAPI, os cortes serão analisados sob magnificação de 400x com microscópio de fluorescência modelo (Zeiss, Alemanha) e 10 fotografias serão obtidas com uma câmera modelo (Zeiss, Alemanha) acoplada. Em cada fotografia, cerca de 15 cardiomiócitos serão selecionados para medida de comprimento e espessura, assim como da estrutura sarcomérica.

A quantificação da coloração TUNEL será feita para estudar a extensão da morte celular apoptótica em VE por kit de detecção de morte celular in loco (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) como descrito anteriormente (Wei *et al.*, 2012).

Zimografia

As lâminas serão incubadas com DQ-gelatina e coquetel de inibidores de proteínase e montadas com DAPI/DABCO. As lâminas serão analisadas sob microscópio de fluorescência e será quantificado um sinal verde emitido pela clivagem da DQ-gelatina revelando a atividade gelatinogênica.

Espécies reativas de oxigênio

A produção de ERO será medida em cortes congelados de VE carregados com 50 mM de 5-(6-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H2DCF DA, Invitrogen/Molecular Probes) por 30 min a 37°C, no escuro, e será excitado a 488 nm e emitida será registrada a > 510 nm. A quantificação será realizada em função da fluorescência emitida do grupo controle (Sham) (Dedkova e Blatter, 2009).

EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS - WESTERN BLOTTING

Como mencionado anteriormente, os fragmentos oriundos das porções mediais dos ventrículos esquerdos dos grupos experimentais em estudo ficarão mantido em solução a 4°C contendo (em mM): sacarose, 250, HEPES-Tris (pH 7,6), 10, EDTA, 2 e PMSF, 1. Ao serem submetidos para análise, os tecidos deverão ser cortados em pedaços pequenos e homogeneizados com pistilo de teflon na mesma solução com homogeneizador (Potter). O homogenato será centrifugado a 1600 g por 10 minutos a 4°C, em centrífuga SCR20B, usando o rotor RPR12-2 (Hitachi) e será utilizado o sobrenadante. Este homogenato foi estocado a -80°C para futura dosagem de proteína pelo método de Bradford.

A imunodeteção de SERCA2a, fosfolambam, TNF- α , Bcl2, Bax, IL-1 β , IL-10, TGF- β e GAPDH em homogenato será determinada por eletroforese seguida de imunodeteção. A quantidade de proteína utilizada será de 50 μ g. A imunodeteção de proteínas será observada pela reação quimioluminescente do sistema ECL (western blotting system detection) para western blotting. A membrana será exposta imediatamente ao filme de raio-X (Kodak X-Omat K). western blotting.

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CARDIOMIÓCITOS ISOLADOS

Para avaliação do estresse oxidativo celular, os cardiomiócitos isolados (suspensão a 10^4 células/mL) serão carregados com dihidro-dicloro-fluoresceína (H_2DCF) a $10 \mu M$ por 30 minutos ao abrigo da luz. Terminado o carregamento, a suspensão será centrifugada, separada do sobrenadante e lavada com tampão PBS (10 mM de Na_2HPO_4 , 130 mM NaCl, pH= 7,4) por 1 minuto. A lavagem será repetida mais duas vezes antes de se incubar as células com iodeto de propídeo (PI) a $1 \mu M$ por mais 5 minutos. As células serão novamente lavadas por 3 vezes em PBS e analisadas em citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences, EUA). Após a seleção dos eventos correspondentes aos cardiomiócitos viáveis (pelos sinais de espalhamento FSC-H e SSC-H e negativos para o PI), a intensidade média de fluorescência (F) captada no filtro de 500-560 nm (verde) será proporcional à quantidade de espécies reativas de oxigênio presentes no meio intracelular e esta será expressa pela fórmula:

$$[ROS] (\%) = \frac{F - F_{branco}}{F_{H_2O_2} - F_{branco}}$$

em que F_{branco} corresponde à fluorescência média de uma alíquota da mesma amostra não carregada com H_2DCF , e $F_{H_2O_2}$ corresponde à fluorescência gerada pela incubação posterior de outra alíquota da mesma amostra com 10 mM de H_2O_2 por 10 min.

Isolamento de cardiomiócitos

Após as avaliações de hemodinâmica os corações dos animais serão retirados e a artéria aorta será canulizada em um sistema de perfusão retrógrada tipo Langendorff, o qual permite a circulação coronariana com fluxo constante de $8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, à temperatura de $37^\circ C$. Inicialmente o coração será perfundido com solução Tyrode modificada (NaCl, 110, KCl 2,6, KH_2PO_4 1,2 MgCl 1,2 NaHCO 25,0, glicose 5,0 $CaCl_2$ 2,0 mM) por 5 min, permitindo assim a avaliação da funcionalidade dos corações, bem como a retirada de todo o sangue presente no coração. Em seguida será feita a perfusão com Tyrode desprovida de $CaCl_2$, 5 min, para que os ventrículos parassem de contrair. Após parada, o coração será perfundido com mesma solução contendo 100 U/ml de colagenase (tipo II, Worthington) 10 a 20 min, para separação das células ventriculares. O coração será retirado do sistema e será separado os átrios e o ventrículo direito permanecendo apenas o VE. O VE será então fragmento em pequenos e colocados em 20 ml de solução com colagenase e BSA 0,4% e mantido a $37^\circ C$ sob borbulhamento de carbogênio, 10 min. Após este passo a solução contendo os fragmentos de VE será gentilmente homogeneizado com auxílio de pipeta Pasteur, filtrado em filtro de $200 \mu m$. O homogenato obtido será então centrifugado, 400 rpm, $4^\circ C$, 2 min, o sobrenadante será desprezado e o pellet será ressuspenso em solução de gradiente de $CaCl_2$ (100 mM a 1 M) contendo BSA 2%. Em seguida será as células serão contadas com auxílio da câmara de Neubauer e os experimentos subsequentes serão realizados apenas com a obtenção de no mínimo 10^5 células/ml (Wang *et al.*, 2017).

Deixar as células decantarem por 10-15 min e retirar o sobrenadante e voltar a suspender em meio de plaqueamento (MEM, soro fetal bovino 5%, 2,3-butanediona monoxima 10 mM, penicilina 100 u/ml, L-glutamina 2 mM), em seguida plaquear em placa previamente revestida com laminina, manter por 2 h em estufa a 2% CO₂ e 37°C. O meio de plaqueamento será trocado para o meio de cultura (MEM, albumina de soro bovino 0,1 mg/ml, penicilina 100 u/ml, L-glutamina 2 mM, ,3-Butanedione monoxime 10 mM, insulina-transferrina-sódio1/1000) e manter em estufa por 24 h. Serão separadas alíquotas dessas células para utilização em diferentes experimentos.

Detecção de células apoptóticas

A citometria de fluxo será utilizada para detectar a apoptose celular usando um kit de coloração dupla de anexina V-FITC e iodeto de propídio (PI) (Shanghai BestBio Biotech. Co. Ltd., Xangai, China) de acordo com as instruções do fabricante. As células serão coletadas após o isolamento, como indicado anteriormente, lavadas com PBS gelado, ressuspensas em 400 µl de tampão, depois incubadas com 5 µl de Annexin V-FITC e 5 µl de PI à temperatura ambiente no escuro para 15 min. As amostras serão analisadas pelo citômetro de fluxo Accuri C6 dentro de 1 h (BD Biosciences, EUA). Todas as células coradas positivamente para Annexin V-FITC serão consideradas células apoptóticas (Wang *et al.*, 2016).

Medida da atividade iNOS/eNOS

A atividade de NOS em cardiomiócitos será indiretamente avaliada por meio de medida de nitratos e nitrito (formas oxidadas de óxido nítrico) a partir dos cardiomiócitos isolados dos animais IM tratados ou não em comparação ao Sham. Para isso será utilizado o kit de ensaio de óxido nítrico quantitativo (Abcam, EUA). A reação corre em dois passos, os nitratos são convertidos em nitritos por nitrato redutase e então os nitritos são acoplados em um composto azo colorido com máxima absorbância a 540 nm. O teor de óxido nítrico nos cardiomiócitos será expresso como nM/mg de proteína total (Bil-Lula *et al.*, 2016).

ANALISE ESTATÍSTICA

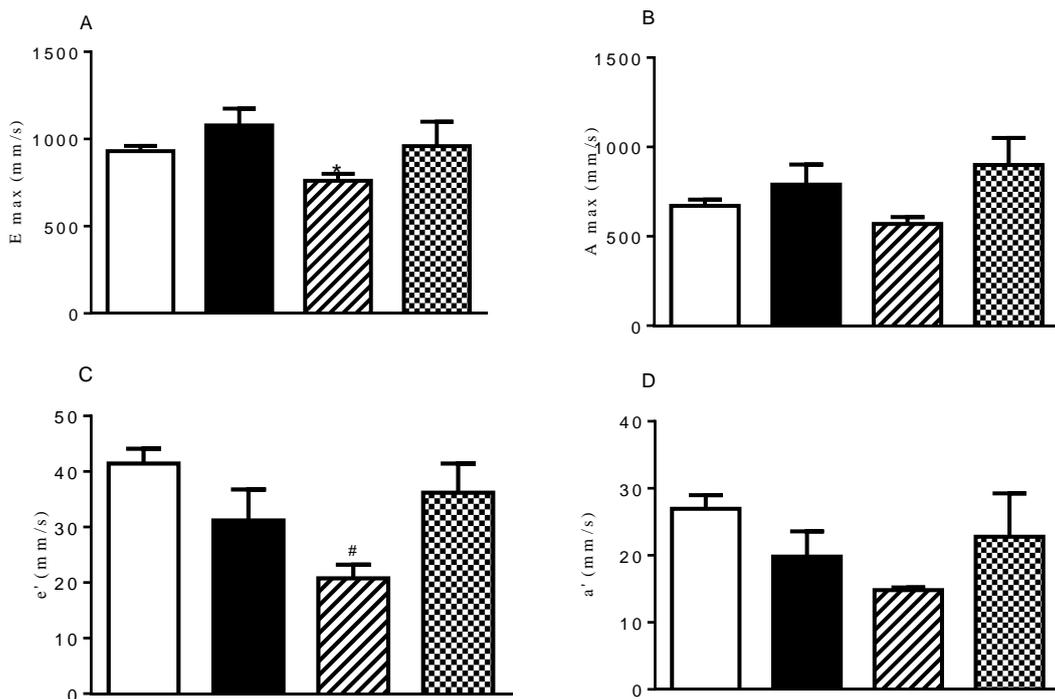
Os dados estarão expressos como média ± EPM. O teste (One-way) ANOVA foi utilizado, para as comparações entre Sham e os demais grupos, considerando significância estatística $p < 0,05$. Os gráficos serão obtidos utilizando-se o programa PRISMA 6.0 para representar os dados obtidos.

RESULTADOS PARCIAS

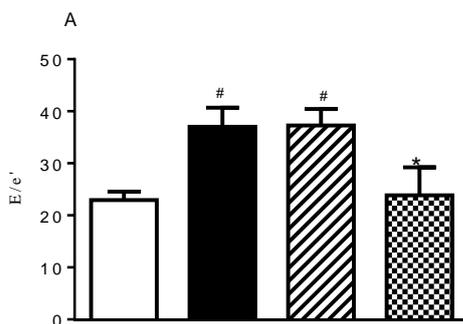
Função cardíaca - análise ecocardiográfica

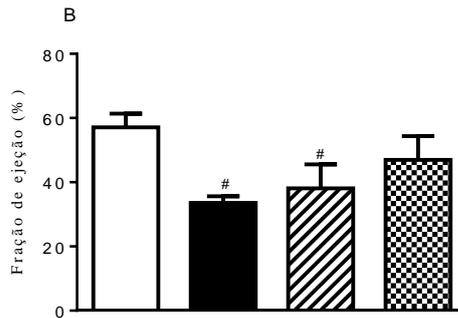
Na avaliação pelo Doppler da válvula mitral, através da velocidade integrante do fluxo mitral rápido (E), houve aumento de $931,2 \pm 28,8$ mm/s nos animais não infartados para $1078 \pm 96,2$ mm/s no grupo de infartados. No tratamento realizado com LASSBio-1027, na dose de 30 $\mu\text{mol/kg}$, o valor de E registrado foi de $760,4 \pm 39,8$ mm/s e de $959,0 \pm 140$ mm/s nos tratados com LASSBio-1027, 70 $\mu\text{mol/kg}$ (Figura 1A). Para a velocidade integrante do fluxo mitral lenta (A), os valores obtidos foram $670,9 \pm 34,5$ mm/s nos animais normais, $789,6 \pm 112,8$ mm/s nos infartados, $569,3 \pm 38,6$ mm/s no grupo tratado com a menor dose e, finalmente, $899,9 \pm 150,4$ mm/s, na maior dose (Figura 1B). Sem alterações significativas nessas avaliações.

Por sua vez, no Doppler tecidual rápido (e') verificamos uma diminuição de $41,44 \pm 2,6$ mm/s nos animais não infartados, para $31,19 \pm 5,6$ mm/s nos infartados, enquanto os tratados com LASSBio-1027 30 $\mu\text{mol/kg}$ registraram $20,78 \pm 2,5$ mm/s ($p < 0,05$) e com LASSBio 70 $\mu\text{mol/kg}$ $36,19 \pm 5,3$ mm/s (Figura 1C). Enquanto o componente lento (a') mostrou $26,95 \pm 2,0$ mm/s nos normais, $19,8 \pm 3,8$ mm/s nos infartados, $14,8 \pm 0,4$ mm/s na menor dose e $22,80 \pm 6,5$ mm/s na maior dose de LASSBio-1027 (Figura 1D).



Nós observamos que houve elevação da pressão de enchimento (relação E/e') dos animais com IAM em relação aos falsos operados de $22,9 \pm 1,6\%$ para $37,0 \pm 3,7\%$ E/e' ($p < 0,01$). O tratamento realizado com LASSBio-1027 ($70\mu\text{mol/kg}$) foi capaz de prevenir essa alteração, mantendo os valores em $23,8 \pm 5,3$ E/e' ($p < 0,05$) (Figura 2A). Os valores da fração de ejeção obtidos no grupo IAM ($FE = 36,60 \pm 2,03\%$), apresentaram elevação em relação nos grupos tratados com as duas doses, sendo registrado $46,99 \pm 7,40\%$ ($p < 0,05$) quando submetidos a maior delas (Figura 2B).





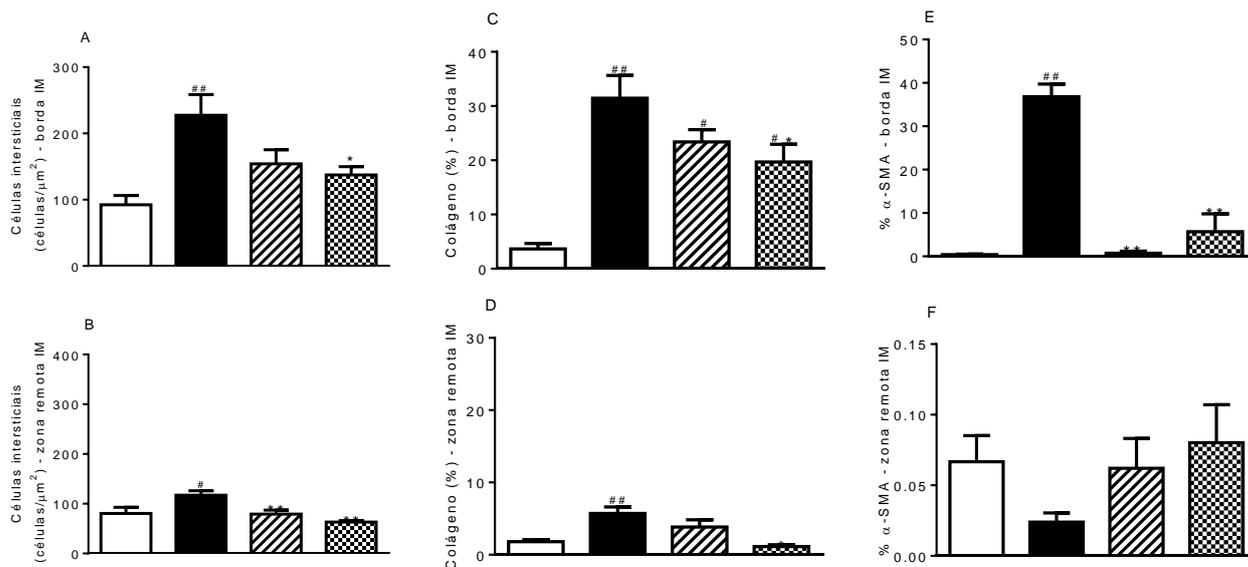
Infiltrado celular, fibrose cardíaca e expressão de α -SMA

Após realização das etapas anteriores, seguiu-se com a eutanásia dos animais para obtenção dos órgãos e proceder com análise histopatológica e de expressão de algumas proteínas.

A avaliação das células intersticiais realizada através da contagem de seus núcleos corados em roxo, o que os distingue do citoplasma e da matriz extracelular que são corados em diferentes tons de rosa. Assim sendo, o aumento de células presentes no interstício no grupo IAM na borda do infarto reduziu de $275,3 \pm 49,13$ para $110,1 \pm 17,09$ no tratamento realizado com LASSBio-1027 $30\mu\text{mol/kg}$ e para $141,1 \pm 14,51$ células/ μm^2 , com LASSBio-1027 $70\mu\text{mol/kg}$ (Figura 3A). A mesma redução na celularidade foi observada na zona remota ao IM passando de $99,31 \pm$ no grupo IAM para $57,67 \pm 2,79$ e $64,20 \pm 4,85$ células/ μm^2 na menor e na maior dose, respectivamente (Figura 3B).

No percentual da área de deposição de colágeno quantificado através da coloração de picro-sirius red também houve redução com o tratamento realizado nas duas doses. Na borda do IAM, no grupo não tratado foi constatada uma média na área de deposição de colágeno de $33,35 \pm 5,75\%$, com redução para $19,12 \pm 2,00$ na dose de LASSBio-1027 $30\mu\text{mol/kg}$ e $14,50 \pm 0,32$, LASSBio-1027 $70\mu\text{mol/kg}$ (Figura 3C). O mesmo foi verificado na zona remota onde o grupo IAM teve $5,71 \pm 0,1$, sendo reduzido esse percentual para $1,00 \pm 0,05$ (LASSBio-1027 $30\mu\text{mol/kg}$) e $1,13 \pm 0,26$ (LASSBio-1027 $70\mu\text{mol/kg}$) (Figura 3D).

Na avaliação da expressão proteica por imuno-histoquímica de α -SMA os tratamentos realizados apresentaram redução significativa da área de imunomarcação. Em região de borda do infarto, no grupo IAM obteve-se uma média de $36,83 \pm 2,9\%$, enquanto que nos tratados LASSBio-1027 $30\mu\text{mol/kg}$ foi de $6,29 \pm 4,1\%$ e no grupo LASSBio-1027 $70\mu\text{mol/kg}$, $14,01 \pm 4,31\%$ (Figura 3E). Na zona remota, não se verificou alterações significativas. (Figura 3F)

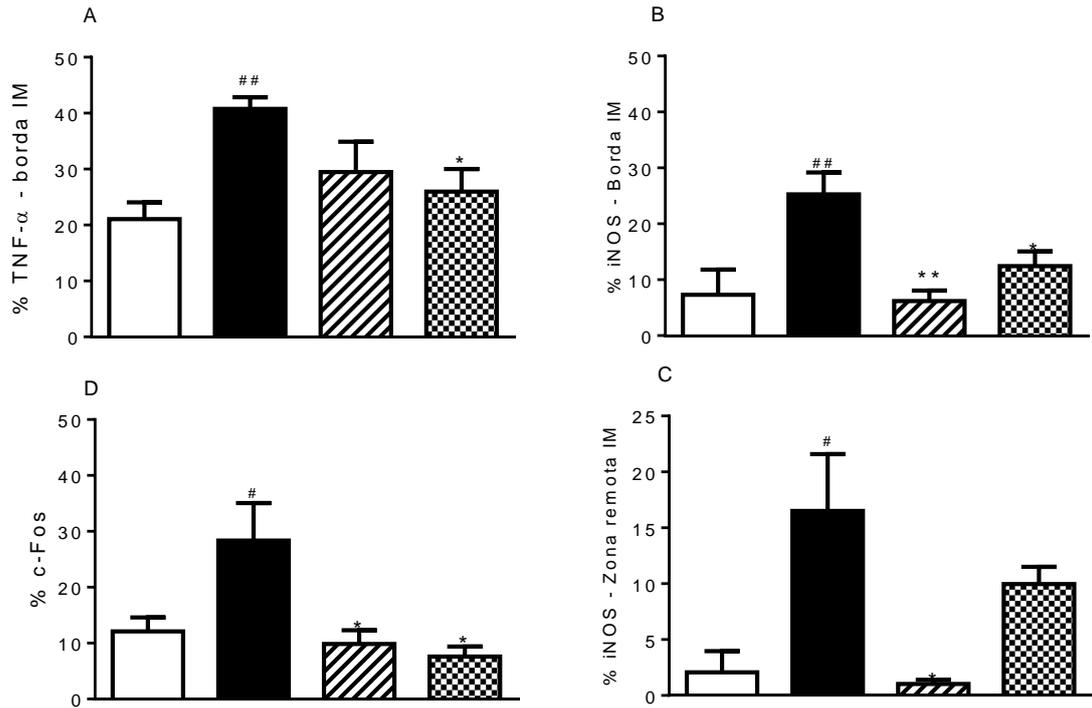


TNF-α e sinalização

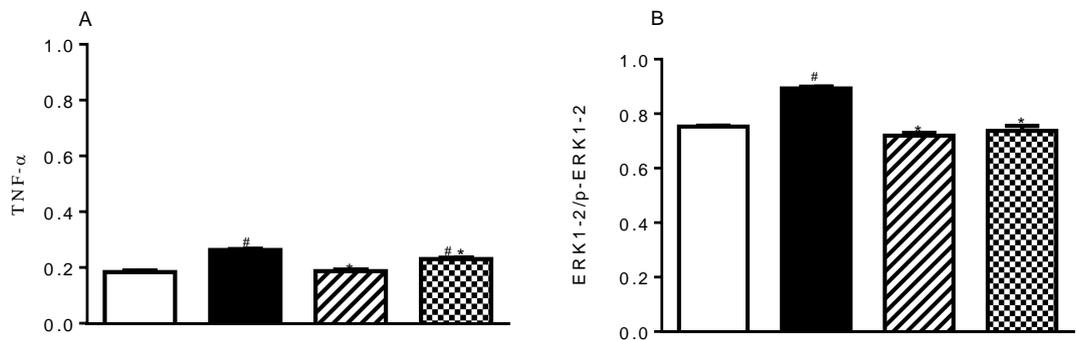
Após marcação de área média em região de borda do IAM para TNF-α de $21,0 \pm 3,0\%$ nos animais normais e $40,76 \pm 2,1\%$ nos animais infartados, os tratados na dose de $30\mu\text{mol/kg}$ apresentaram registro de $29,5 \pm 5,5\%$ e na dose de $70\mu\text{mol/kg}$, $25,99 \pm 4,0\%$, sendo este último resultado significativo (Figura 4A).

Importante diminuição por esse método de marcação também foi observado na quantificação da proteína iNOS, onde no grupo não tratado foi observado uma média de área marcada na borda do infarto, o grupo IAM registrou área média $25,26 \pm 4,0\%$, os tratados, por sua vez, mostraram área média de $6,2 \pm 2,0\%$ com LASSBio-1027 $30\mu\text{mol/kg}$ e $12,5 \pm 2,6\%$ com LASSBio-1027 $70\mu\text{mol/kg}$ (Figura 4B). Já em zona remota de $2,0 \pm 2,0\%$, nos infartados de $16,51 \pm 5,0\%$ enquanto que nos grupos tratados a mensuração foi de $1,0 \pm 0,4\%$ e de $9,97 \pm 1,6\%$ para as doses de $30\mu\text{mol/kg}$ e $70\mu\text{mol/kg}$, respectivamente (Figura 4C).

Também foi verificada a presença de c-fos tendo um percentual de $12,0 \pm 2,5$ do grupo normal para $28,35 \pm 6,75$ no IAM não tratado, seguido de redução com os grupos tratados para $9,83 \pm 2,45$ no grupo de LASSBio-1027 de $30\mu\text{mol/kg}$ e $7,60 \pm 1,80$, no LASSBio-1027 $70\mu\text{mol/kg}$ (Figura 4D).



Quanto a expressão proteica, foi observado um aumento TNF- α e na relação p-ERK1-2/ERK1-2 no grupo IAM em relação aos animais falsos operados. Após a realização do tratamento proposto, verificou-se uma redução dessa expressão nos dois parâmetros mencionados. Para o TNF- α , de $0,26 \pm 0,006$ no grupo IAM, para $0,18 \pm 0,003$ no LASSBio-1027 30 μ mol/kg e para $0,23 \pm 0,005$ no LASSBio-1027 70 μ mol/kg (Figura 5A). Enquanto a p-ERK1-2/ERK1-2 nos animais infartados foi de $0,89 \pm 0,006$ indo para $0,72 \pm 0,010$ e $0,73 \pm 0,018$ na menor e maior dose, respectivamente (Figura 5B).



REFERÊNCIAS

Abbate A, Biondi-Zoccai GG, Baldi A. Pathophysiologic role of myocardial apoptosis in post-infarction left ventricular remodeling. *J Cell Physiol* 2002;193:145–53.

Abbate A, Salloum FN, Vecile E, Das A, Hoke NN, Straino S, Biondi-Zoccai GG, Houser JE, Qureshi IZ, Ownby ED, Gustini E, Biasucci LM, Severino A, Capogrossi MC, Vetrovec GW, Crea F, Baldi A, Kukreja RC, Dobrina A. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction. *Circulation* 2008;117:2670–83.

Alencar AK, Pereira SL, da Silva FE, Mendes LV, Cunha Vdo M, Lima LM, Montagnoli TL, Caruso-Neves C, Ferraz EB, Tesch R, Nascimento JH, Sant'anna CM, Fraga CA, Barreiro EJ, Sudo

RT, Zapata-Sudo G. N-acylhydrazone derivative ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension through the modulation of adenosine A₂R activity. *Int J Cardiol.* 2014;173(2):154-62.

Alencar AK, Pereira SL, Montagnoli TL, Maia RC, Kümmerle AE, Landgraf SS, Caruso-Neves C, Ferraz EB, Tesch R, Nascimento JH, de Sant'Anna CM, Fraga CA, Barreiro EJ, Sudo RT, Zapata-Sudo G. Beneficial effects of a novel agonist of the adenosine A₂A receptor on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Br J Pharmacol.* 2013;169(5):953-62.

Barreiro, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioprotetor. *Química Nova.* 2002;25: 1172-1180.

Bil-Lula I, Lin HB, Biały D, Wawrzyńska M, Diebel L, Sawicka J, Woźniak M, Sawicki G., Subthreshold nitric oxide synthase inhibition improves synergistic effects of subthreshold MMP-2/MLCK-mediated cardiomyocyte protection from hypoxic injury. *J Cell Mol Med.* 2016;20(6):1086-94

Blackburn MR, Vance CO, Morschl E, Wilson CN. Adenosine receptors and inflammation. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(193):215-69.

Chan TO, Funakoshi H, Song J, Zhang XQ, Wang J, Chung PH, DeGeorge BR Jr, Li X, Zhang J, Herrmann DE, Diamond M, Hamad E, Houser SR, Koch WJ, Cheung JY, Feldman AM. Cardiac-restricted overexpression of the A₂A-adenosine receptor in FVB mice transiently increases contractile performance and rescues the heart failure phenotype in mice overexpressing the A₁-adenosine receptor. *Clin Transl Sci.* 2008;1(2):126-33.

Chandrasekera PC, McIntosh VJ, Cao FX, Lasley RD. Differential effects of adenosine A_{2a} and A_{2b} receptors on cardiac contractility. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299(6):H2082-9.

Costa DG, da Silva JS, Kümmerle AE, Sudo RT, Landgraf SS, Caruso-Neves C, Fraga CA, de Lacerda Barreiro EJ, Zapata-Sudo G. LASSBio-294, A compound with inotropic and lusitropic activity, decreases cardiac remodeling and improves Ca²⁺(+) influx into sarcoplasmic reticulum after myocardial infarction. *Am J Hypertens.* 2010;23(11):1220-7.

da Silva JS, Gabriel-Costa D, Sudo RT, Wang H, Groban L, Ferraz EB, Nascimento JH, Fraga CA, Barreiro EJ, Zapata-Sudo G. Adenosine A₂A receptor agonist prevents cardiac remodeling and dysfunction in spontaneously hypertensive male rats after myocardial infarction. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:553-562.

da Silva JS, Pereira SL, Maia Rdo C, Landgraf SS, Caruso-Neves C, Kümmerle AE, Fraga CA, Barreiro EJ, Sudo RT, Zapata-Sudo G. N-acylhydrazone improves exercise intolerance in rats submitted to myocardial infarction by the recovery of calcium homeostasis in skeletal muscle. *Life Sci.* 2014;94(1):30-6.

Dedkova EN1, Blatter LA. Blatter Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase *J Physiol.* 2009;587(Pt 4):851-72.

Delikouras A, Fairbanks LD, Simmonds AH, Lechler RI, Dorling A. Endothelial cell cytoprotection induced in vitro by allo- or xenoreactive antibodies is mediated by signaling through adenosine A2 receptors. *Eur J Immunol.* 2003;33(11):3127-35.

Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, Michael LH, Rollins BJ, Entman ML, Frangogiannis NG. CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res.* 2005 Apr 29;96(8):881-9.

Dobson JG Jr, Fenton RA. Adenosine A2 receptor function in rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 1997;34(2):337-47.

Dobson JG Jr, Shea LG, Fenton RA Adenosine A2A and beta-adrenergic calcium transient and contractile responses in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295(6):H2364-72.

Duncker DJ, van Zon NS, Pavek TJ, Herrlinger SK, Bache RJ. Endogenous adenosine mediates coronary vasodilation during exercise after K⁺ATPchannel blockade. *J Clin Invest.* 1995;95(1):285-95.

Epperson SA, Brunton LL, Ramirez-Sanchez I, Villarreal F. Adenosine receptors and second messenger signaling pathways in rat cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296, C1171–C1177.

Ernens I, Léonard F, Vausort M, Rolland-Turner M, Devaux Y, Wagner DR. Adenosine up-regulates vascular endothelial growth factor in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;392, 351–356.

Ernens I, Rouy D, Velot E, Devaux Y, Wagner DR. Adenosine inhibits matrix metalloproteinase-9 secretion by neutrophils: implication of A2A receptor and cAMP/PKA/Ca²⁺ pathway. *Circ Res* 2006;99, 590–597.

Fattah C, Nather K, McCarroll CS, Hortigon-Vinagre MP, Zamora V, Flores-Munoz M, McArthur L, Zentilin L, Giacca M, Touyz RM, Smith GL, Loughrey CM, Nicklin SA. Gene Therapy With Angiotensin-(1-9) Preserves Left Ventricular Systolic Function After Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2016;68(24):2652-2666.

Feldman AM, Cheksis-Feiner E, Hamad E, Chan T. Adenosine receptor subtypes and the heart failure phenotype: translating lessons from mice to man. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2011; 122: 198–214.

Feng W, Song Y, Chen C, Lu ZZ, Zhang Y. Stimulation of adenosine A2B receptors induces interleukin-6 secretion in cardiac fibroblasts via the PKC-delta-P38 signalling pathway. *Br J Pharmacol* 2010;159, 1598–1607.

Feoktistov I, Biaggioni I. Role of adenosine A(2B) receptors in inflammation. *Adv Pharmacol* 2011; 61: 115–144.

Feoktistov, I., and Biaggioni, I. Adenosine A2B receptors. *Pharmacol. Rev.* 1997;49, 381–402.

Ferrari D, Gambari R, Idzko M, Müller T, Albanesi C, Pastore S, La Manna G, Robson SC, Cronstein B. Purinergic signaling in scarring. *FASEB J*. 2016;30(1):3-12.

Frangogiannis NG. The immune system and the remodeling infarcted heart: cell biological insights and therapeutic opportunities. *J Cardiovasc Pharmacol* 2014;63:185–95.

Funakoshi H, Chan TO, Good JC, Libonati JR, Piuholo J, Chen X, MacDonnell SM, Lee LL, Herrmann DE, Zhang J, Martini J, Palmer TM, Sanbe A, Robbins J, Houser SR, Koch WJ, Feldman AM. Regulated overexpression of the A1-adenosine receptor in mice results in adverse but reversible changes in cardiac morphology and function. *Circulation*. 2006;114(21):2240-50.

Glover DK, Riou LM, Ruiz M, Sullivan GW, Linden J, Rieger JM, Macdonald TL, Watson DD, Beller GA. Reduction of infarct size and postischemic inflammation from ATL-146e, a highly selective adenosine A2A receptor agonist, in reperfused canine myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(4):H1851-8.

Hamad EA, Zhu W, Chan TO, Myers V, Gao E, Li X, Zhang J, Song J, Zhang XQ, Cheung JY, Koch W, Feldman AM. Cardioprotection of controlled and cardiac-specific over-expression of A2A adenosine receptor in the pressure overload. *PLoS One*. 2012;7(7):e39919.

Haskó G, Kuhel DG, Chen JF, Schwarzschild MA, Deitch EA, Mabley JG, Marton A, Szabó C. Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A2A receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J*. 2000;14, 2065–2074, 2000.

Haskó G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(9):759-70.

Headrick JP, Ashton KJ, Rosemeyer RB, Peart JN. Cardiovascular adenosine receptors: expression, actions and interactions. *Pharmacol. Ther.* 2013;140, 92–111.

Hein TW, Belardinelli L, Kuo L. Adenosine A2A receptors mediate coronary microvascular dilation to adenosine: role of nitric oxide and ATP-sensitive potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291, 655–664.

Kilpatrick EL, Narayan P, Mentzer RM Jr, Lasley RD. Cardiac myocyte adenosine A2a receptor activation fails to alter cAMP or contractility: role of receptor localization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282, H1035–H1040.

Kramer DG, Trikalinos TA, Kent DM, Antonopoulos GV, Konstam MA, Udelson JE. Quantitative evaluation of drug or device effects on ventricular remodeling as predictors of therapeutic effects on mortality in patients with heart failure and reduced ejection fraction: a meta-analytic approach. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:392–406.

Kreckler LM, Wan TC, Ge ZD, Auchampach JA. Adenosine inhibits tumor necrosis factor α release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A3 adenosine receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;317(1):172-80.

Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP, Demetris AJ, Feldman AM. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α . *Circ Res* 1997;81, 627–635.

Kümmerle AE, Raimundo JM, Leal CM, da Silva GS, Balliano TL, Pereira MA, de Simone CA, Sudo RT, Zapata-Sudo G, Fraga CA, Barreiro EJ. Studies towards the identification of putative bioactive conformation of potent vasodilator arylidene N-acylhydrazone derivatives. *Eur J Med Chem*. 2009;44(10):4004-9

KÜMMERLE, A. E. Uma Quimioteca de N-acilidrazonas (NAH): A Influência da Metila na Modulação das Propriedades Analgésicas e Antiinflamatórias de Novos Candidatos a Fármacos. Tese de Doutorado, IQ – UFRJ – Rio de Janeiro, 2009.

Lasley RD, Jahania MS, Mentzer RM Jr. Beneficial effects of adenosine A2A agonist CGS-21680 in infarcted and stunned porcine myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(4):H1660-6.

Lasley RD, Mentzer RM. Adenosine improves recovery of postischemic myocardial function via an adenosine A1 receptor mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1992;292, H426–H431.

Latet SC, Hoymans VY, Van Herck PL, Vrints CJ. The cellular immune system in the post-myocardial infarction repair process. *Int J Cardiol*. 2015;179:240–7.

Liang BT, Morley JF. A new cyclic AMP-independent, Gs-mediated stimulatory mechanism via the adenosine A2a receptor in the intact cardiac cell. *J Biol Chem* 1996; 271: 18678–18685, 1996.

Liao Y-H, Cheng X. Autoimmunity in myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2006;112:21–6.

Lima PC, Lima LM, da Silva KC, Léda PH, de Miranda AL, Fraga CA, Barreiro EJ. Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole. *Eur J Med Chem*. 2000;35(2):187-203..

Linden J, Thai T, Figler H, Jin X, Robeva AS. Characterization of human A2B adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to Gq in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells. *Mol. Pharmacol*. 1999;56, 705–713.

Linden, J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 2001;41, 775–787.

Lipps C, Nguyen JH, Pyttel L, Lynch TL, Liebetrau C, Aleshcheva G, Voss S, Dörr O, Nef HM, Möllmann H, Hamm CW, Sadayappan S, Troidl C. N-terminal fragment of cardiac myosin binding protein-C triggers pro-inflammatory responses in vitro. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;99:47–56.

Liu Q, Anderson C, Broyde A, Polizzi C, Fernandez R, Baron A, Parkes DG. Glucagon-like peptide-1 and the exenatide analogue AC3174 improve cardiac function, cardiac remodeling, and survival in rats with chronic heart failure. *Cardiovasc Diabetol*. 2010;9:76.

Lu D, Insel PA. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 6. Purinergic signaling and response in fibroblasts and tissue fibrosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2014;306, C779–C788. doi: 10.1152/ajpcell.00381.2013

Maekawa Y, Anzai T, Yoshikawa T, Sugano Y, Mahara K, Kohno T, Takahashi T, Ogawa S. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inducer on left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(7):1510-20.

Mann DL. Innate Immunity and the Failing Heart The Cytokine Hypothesis Revisited. *Circ Res*. 2015;116:1254–68.

Mengyue Yu,¹ Hatsue Ishibashi-Ueda,¹ Keiko Ohta-Ogo,¹ Giulio Gabbiani,⁴ Masakazu Yamagishi,²

Mezzaroma E, Toldo S, Farkas D, Seropian IM, Van Tassell BW, Salloum FN, Kannan HR, Menna AC, Voelkel NF, Abbate A. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:19725–30.

Monahan TS¹, Sawmiller DR, Fenton RA, Dobson JG Jr. Adenosine A2A-receptor activation increases contractility in isolated perfused hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279, H1472–H1481.

Morrison RR¹, Talukder MA, Ledent C, Mustafa SJ. Cardiac effects of adenosine in A2A receptor knockout hearts: uncovering A2B receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282, H437–H444.

Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M., et al. Heart disease and stroke statistics-2016 update: A report from the American Heart Association. *Circulation*. 2016 Jan 26;133(4):e38-360.

Mubagwa K, Flameng W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovasc Res* 2001; 52: 25–39.

Nahrendorf M, Swirski FK. Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circ Res* 2013;112:1624–33.

National Heart Lung and Blood Institute. Morbidity and Mortality: 2012 Chart Book on Cardiovascular and Lung Diseases. Bethesda, MD: NIH; 2012.

Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 2004;94:1543–53.

Norton ED, Jackson EK, Turner MB, Virmani R, Forman MB. The effects of intravenous infusions of selective adenosine A1-receptor and A2-receptor agonists on myocardial reperfusion injury. *Am Heart J*. 1992;123(2):332-8.

Olanrewaju HA, Qin W, Feoktistov I, Scemama JL, Mustafa SJ. Adenosine A2A and A2B receptors in cultured human and porcine artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279, H650–H656.

Olsson RA, Pearson JD. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev* 1990;70,761–845.

Patel RA, Glover DK, Broisat A, Kabul HK, Ruiz M, Goodman NC, Kramer CM, Meerdink DJ, Linden J, Beller GA. Reduction in myocardial infarct size at 48 hours after brief intravenous

infusion of ATL-146e, a highly selective adenosine A_{2A} receptor agonist. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297(2):H637-42

Pinhal-Enfield G, Ramanathan M, Hasko G, Vogel SN, Salzman AL, Boons GJ, Leibovich SJ. An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A_{2A} receptors. *Am J Pathol.* 2003;163(2):711-21.

Prabhu SD, Frangogiannis NG. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction from inflammation to fibrosis. *Circ Res.* 2016;119:91–112.

Sanjani MS, Teng B, Krahn T, Tilley S, Ledent C, Mustafa SJ. Contributions of A_{2A} and A_{2B} adenosine receptors in coronary flow responses in relation to the K_{ATP} channel using A_{2B} and A_{2A/2B} double knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301, H2322–H2333.

Saparov A, Chen CW, Beckman SA, Wang Y, Huard J. The role of antioxidation and immunomodulation in postnatal multipotent stem cell-mediated cardiac repair. *Int J Mol Sci.* 2013;14:16258–79.

Saparov A, Ogay V, Nurgozhin T, Chen WCW, Mansurov N, Issabekova A, Zhakupova J. Role of the immune system in cardiac tissue damage and repair following myocardial infarction. *Inflamm Res.* 2017;66(9):739-751.

Sassi Y, Ahles A, Truong DJ, Baqi Y, Lee SY, Husse B, Hulot JS, Foinquinos A, Thum T, Müller CE, Dendorfer A, Lagerbauer B, Engelhardt S. Cardiac myocyte-secreted cAMP exerts paracrine action via adenosine receptor activation. *J Clin Invest.* 2014;124(12):5385-97

Schmidt MI, Duncan BB, Azevedo e Silva G, Menezes AM, Monteiro CA, Barreto SM, Chor D, Menezes PR. Health in Brazil 4. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *Lancet.* 2011;377(9781):1949-61

See F, Kompa A, Martin J, Lewis DA, Krum H. Fibrosis as a therapeutic target post-myocardial infarction. *Curr. Pharm. Des.* 2005;11, 477–487.

Segura AM, Frazier OH, Buja LM. Fibrosis and heart failure. *Heart Fail. Rev.* 2014;19, 173–185. doi: 10.1007/s10741-012-9365-4

Seropian IM, Toldo S, Van Tassell BW, Abbate A. Anti-Inflammatory Strategies for Ventricular Remodeling Following ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(16):1593-603

Shih H, Lee B, Lee RJ, Boyle AJ. The Aging Heart and Post-Infarction Left Ventricular Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(1):9-17.

Shryock JC1, Belardinelli L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol* 1997;79, 2–10.

Silva AG1, Zapata-Sudo G, Kummerle AE, Fraga CA, Barreiro EJ, Sudo RT. Synthesis and vasodilatory activity of new N-acylhydrazone derivatives, designed as LASSBio-294 analogues. *Bioorg Med Chem.* 2005;13(10):3431-7.

Silva CL1, Noël F, Barreiro EJ. Cyclic GMP-dependent vasodilatory properties of LASSBio-294 in rat aorta. *Br J Pharmacol.* 2002;135(1):293-8.

Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:427–39.

Swaney JS, Roth DM, Olson ER, Naugle JE, Meszaros JG, Insel PA. Inhibition of cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis by activation and overexpression of adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(2):437-42

Teng B, Ledent C, Mustafa SJ. Up-regulation of A2B adenosine receptor in A2A adenosine receptor knockout mouse coronary artery. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44, 905–914.

Teng B, Qin W, Ansari HR, Mustafa SJ. Involvement of p38-mitogen activated protein kinase in adenosine receptor-mediated relaxation of coronary artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288, H2574–H2580.

Van Tassell BW, Toldo S, Mezzaroma E, Abbate A. Targeting interleukin-1 in heart disease. *Circulation* 2013;128:1910–23.

Vecchio EA, White PJ, May LT. Targeting Adenosine Receptors for the Treatment of Cardiac Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology* 2017;234(8); 2017

Velot E, Haas B, Léonard F, Ernens I, Rolland-Turner M, Schwartz C, Longrois D, Devaux Y, Wagner DR. Activation of the adenosine-A3 receptor stimulates matrix metalloproteinase-9 secretion by macrophages. *Cardiovasc Res* 2008;80, 246–254.

Villarreal F, Epperson SA, Ramirez-Sanchez I, Yamazaki KG, Brunton LL. Regulation of cardiac fibroblast collagen synthesis by adenosine: roles for Epac and PI3K. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2009;296, C1178–C1184.

Wagner DR, Kubota T, Sanders VJ, McTiernan CF, Feldman AM. Differential regulation of cardiac expression of IL-6 and TNF-alpha by A2- and A3-adenosine receptors. *Am J Physiol.* 1999;276(6 Pt 2):H2141-7.

Wang H, Sun X, Chou J, Lin M, Ferrario CM, Zapata-Sudo G, Groban L. Inflammatory and mitochondrial gene expression data in GPER-deficient cardiomyocytes from male and female mice. *Data Brief.* 2016;10:465-473.

Wang X, Sun Y, Yang H, Lu Y, Li L. Oxidized Low-Density Lipoprotein Induces Apoptosis in Cultured Neonatal Rat Cardiomyocytes by Modulating the TLR4/NF-κB Pathway. *Flow cytometry assay.* *Sci Rep.* 2016;6:27866.

Wei C, Kumar S, Kim I-K, Gupta S. Thymosin Beta 4 Protects Cardiomyocytes from Oxidative Stress by Targeting Anti-Oxidative Enzymes and Anti-Apoptotic Genes. *PLoS ONE* 2012;7(8): e42586.

Willems L, Headrick JP. Contractile effects of adenosine, coronary flow and perfusion pressure in murine myocardium. *Pflugers Arch* 2007;453, 433–441.

Xu X, Fassett J, Hu X, Zhu G, Lu Z, Li Y, Schnermann J, Bache RJ, Chen Y. Ecto-5'-nucleotidase deficiency exacerbates pressure-overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction. *Hypertension* 2008;51, 1557–1564.

Yan X, Anzai A, Katsumata Y, Matsuhashi T, Ito K, Endo J, Yamamoto T, Takeshima A, Shinmura K, Shen W, Fukuda K, Sano M. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2013;62:24–35.

Yang JN, Tiselius C, Daré E, Johansson B, Valen G, Fredholm BB. Sex differences in mouse heart rate and body temperature and in their regulation by adenosine A1 receptors. *Acta Physiol (Oxf)* 2007;190, 63–75

Yang Z, Day YJ, Toufektsian MC, Ramos SI, Marshall M, Wang XQ, French BA, Linden J. Infarct-sparing effect of A2A-adenosine receptor activation is due primarily to its action on lymphocytes. *Circulation*. 2005;111, 2190–2197.

Yu M, Ishibashi-Ueda H, Ohta-Ogo K, Gabbiani G, Yamagishi M, Hayashi K, Hirota S, Bochaton-Piallat ML, Hao H. Transient expression of cellular retinol-binding protein-1 during cardiac repair after myocardial infarction. *Pathol Int*. 2012;62(4):246-53.

Zapata-Sudo G, Pereira SL, Beiral HJ, Kummerle AE, Raimundo JM, Antunes F, Sudo RT, Barreiro EJ, Fraga CA. Pharmacological characterization of (3-thienylidene)-3,4-methylenedioxybenzoylhydrazide: a novel muscarinic agonist with antihypertensive profile. *Am J Hypertens*. 2010;23(2):135-41

Zhang H, Zhong H, Everett TH, Wilson E, Chang R, Zeng D, Belardinelli L, Olgin JE. Blockade of A2B adenosine receptor reduces left ventricular dysfunction and ventricular arrhythmias 1 week after myocardial infarction in the rat model. *Heart Rhythm* 2014;11, 101–109.

Zhao P, Li XG, Yang M, Shao Q, Wang D, Liu S, Song H, Song B, Zhang Y, Qu X. Hypoxia suppresses the production of MMP-9 by human monocyte-derived dendritic cells and requires activation of adenosine receptor A2B via cAMP/PKA signaling pathway. *Mol Immunol* 2008;45, 2187–2195.

https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=839

Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circulation research*. 2012; 110:159–73. [PubMed: 22223212]

4. Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation*. 2010; 121:2437–45. [PubMed: 20530020]

Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011; 17:1391–401. [PubMed: 22064429]

Arslan F, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nat Rev Cardiol*. 2011; 8:292–300. [PubMed: 21448140]

de Haan JJ, Smeets MB, Pasterkamp G, Arslan F. Danger signals in the initiation of the inflammatory response after myocardial infarction. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013:206039. [PubMed: 24363498]

Ghigo A, Franco I, Morello F, Hirsch E. Myocyte signalling in leucocyte recruitment to the heart. *Cardiovasc Res.* 2014; 102:270–80. [PubMed: 24501328]

Mann DL. The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls. *Circulation research.* 2011; 108:1133–45. [PubMed: 21527743]

Turner, N.A., Das, A., Warburton, P., O'Regan, D.J., Ball, S.G., Porter, K.E., 2009. Interleukin-1 α stimulates pro-inflammatory cytokine expression in human cardiac myofibroblasts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H1117–H1127.

Turner, N.A., Warburton, P., O'Regan, D.J., Ball, S.G., Porter, K.E., 2010. Modulatory effect of interleukin-1 α on expression of structural matrix proteins, MMPs and TIMPs in human cardiac myofibroblasts: role of p38 MAP kinase. *Matrix Biol.* 29, 613–620.

Turner, N.A., Das, A., O'Regan, D.J., Ball, S.G., Porter, K.E., 2011. Human cardiac fibroblasts express ICAM-1, E-selectin and CXC chemokines in response to proinflammatory cytokine stimulation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1450–1458.

Dewald, O., Ren, G., Duerr, G.D., Zoerlein, M., Klemm, C., Gersch, C., Tincey, S., Michael, L.H., Entman, M.L., Frangogiannis, N.G., 2004. Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am. J. Pathol.* 164, 665–677.

van den Borne, S.W., Diez, J., Blankesteyn, W.M., Verjans, J., Hofstra, L., Narula, J., 2010. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat. Rev. Cardiol.* 7, 30–37.