



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOQUÍMICA

Maria Helena Barbosa Pontes

**Apocinina reverte fibrose e disfunção elétrica cardíaca
induzida pelo aumento sistêmico de MMP-2 em
camundongos adultos**

BELÉM-PA

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOQUÍMICA

**Apocinina reverte fibrose e disfunção elétrica cardíaca
induzida pelo aumento sistêmico de MMP-2 em
camundongos adultos**

Discente: Maria Helena Barbosa Pontes

Orientador: Prof. Dr. Alejandro Ferraz do Prado

Coorientadora: Dra. Keuri Eleutério Rodrigues

Documento de Dissertação
apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Farmacologia e
Bioquímica do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal
do Pará como requisito para a
obtenção do título de Mestre em
Farmacologia e Bioquímica.

BELÉM-PA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com
ISBDSistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará

Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos
pelo(a)autor(a)

P813a Pontes, Maria Helena Barbosa.
Apocinina reverte fibrose e disfunção elétrica cardíaca
induzida pelo aumento sistêmico de MMP-2 em camundongos
adultos / Maria Helena Barbosa Pontes. —2024.
61 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Alejandro Ferraz do Prado Coorientador(a):
Prof. Dr. Keuri Eleutério Rodrigues Dissertação (Mestrado) -
Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós- graduação
em Farmacologia e Bioquímica, Belém, 2024.

1. Metaloproteinase de matriz 2. 2. Coração. 3.
Remodelamento. 4. Estresse Oxidativo. 5. Arritmia. I.
Título.

CDD 616.1062

RESUMO

A insuficiência cardíaca (IC) se caracteriza pela inabilidade do coração de manter o fluxo sanguíneo tissular, associado ao déficit de contração e relaxamento, devido a um evento lesivo agudo ou crônico. A metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) está associada à patogênese e fisiopatologia da IC, promovendo proteólise de proteínas contráteis e estresse oxidativo. Terapias de resgate que modulem a atividade de MMP-2 de forma direta ou indireta podem contribuir na melhora do remodelamento e disfunção cardíaca. A apocinina, apresenta efeito inibitório sobre NADPH, atenuando o estresse oxidativo. Desta forma, esse estudo levanta a hipótese que a apocinina reverta o remodelamento e disfunção elétrica cardíaca induzida pela MMP-2 por impedir o desequilíbrio oxidativo. O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da apocinina sobre o desequilíbrio oxidativo e remodelamento cardíaco induzido pelo aumento sistêmico de MMP-2 em camundongos adultos. Camundongos machos adultos C57BL/6 foram submetidos a dois protocolos experimentais, primeiramente os animais foram submetidos ao protocolo *time course* e divididos em dois grupos: O grupo veículo recebeu solução salina 0,9% via ip e o grupo MMP-2 recebeu MMP-2 150 ng/g de peso do animal via ip, por um período de até 4 semanas. Posteriormente foi realizado o protocolo de tratamento com apocinina adicionando 4 semanas após o término de administração da MMP-2, nesse período os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: 1) veículo (recebeu água via gavagem); 2) apocinina (50mg/Kg via gavagem); 3) MMP-2 (recebeu água via gavagem); e 4) MMP-2 + apocinina (50mg/Kg via gavagem). Ao final dos protocolos todos os animais passaram pelo eletrocardiograma, em seguida o coração foi coletado para avaliação morfológica e bioquímica. Durante o *time course* o grupo MMP-2 apresentou maior atividade gelatinolítica, desequilíbrio oxidativo, fibrose, diminuição da frequência cardíaca, acompanhada de aumento dos intervalos RR, PQ, QT e QTc a partir da primeira semana de administração, efeitos que se mantiveram ao longo de quatro semanas, mesmo sem administração de MMP-2. O tratamento com apocinina reverteu o aumento na atividade e a expressão de MMP-2 no coração, assim como, o desequilíbrio oxidativo, peroxidação lipídica, hipertrofia, fibrose cardíaca e disfunção elétrica cardíaca. Concluímos que o aumento de MMP-2 sistêmica é capaz de promover remodelamento cardíaco pelo aumento da atividade e expressão de MMP-2 no tecido cardíaco, levando ao desequilíbrio redox e disfunção elétrica e que o tratamento com apocinina foi capaz de reverter os efeitos induzidos pela MMP-2 sugerindo que estes efeitos são dependentes do desequilíbrio oxidativo e NADPH oxidase.

Palavras-chave: Metaloproteinase de matriz 2, coração, remodelamento, estresse oxidativo e arritmia.

ABSTRACT

Heart failure (HF) is characterized by the heart's inability to maintain adequate tissue blood flow, associated with deficits in contraction and relaxation, due to either an acute or chronic injurious event. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) is linked to the pathogenesis and pathophysiology of HF, promoting proteolysis of contractile proteins and oxidative stress. Rescue therapies that directly or indirectly modulate MMP-2 activity could help improve cardiac remodeling and dysfunction. Apocynin inhibits NADPH oxidase, thereby attenuating oxidative stress. This study hypothesizes that apocynin can reverse cardiac remodeling and electrical dysfunction induced by MMP-2 by preventing oxidative imbalance. The aim of this study is to evaluate the effect of apocynin on oxidative imbalance and cardiac remodeling induced by systemic MMP-2 increase in adult mice. Adult male C57BL/6 mice were subjected to two experimental protocols. First, the animals underwent a time course protocol and were divided into two groups: the vehicle group received 0.9% saline via intraperitoneal (ip) injection, and the MMP-2 group received MMP-2 (150 ng/g body weight) via ip injection, for up to 4 weeks. Subsequently, a treatment protocol with apocynin was performed, starting 4 weeks after the cessation of MMP-2 administration. During this period, the animals were divided into four experimental groups: 1) vehicle (received water via gavage); 2) apocynin (50 mg/kg via gavage); 3) MMP-2 (received water via gavage); and 4) MMP-2 + apocynin (50 mg/kg via gavage). At the end of the protocols, all animals underwent electrocardiography, and then their hearts were collected for morphological and biochemical evaluation. During the time course, the MMP-2 group showed increased gelatinolytic activity, oxidative imbalance, fibrosis, decreased heart rate, along with increased RR, PQ, QT, and QTc intervals from the first week of administration, effects that persisted over the four weeks, even without MMP-2 administration. Treatment with apocynin reversed the increase in MMP-2 activity and expression in the heart, as well as oxidative imbalance, lipid peroxidation, hypertrophy, cardiac fibrosis, and electrical dysfunction. We conclude that systemic MMP-2 increase can promote cardiac remodeling through increased MMP-2 activity and expression in cardiac tissue, leading to redox imbalance and electrical dysfunction, and that apocynin treatment was able to reverse the effects induced by MMP-2, suggesting that these effects are dependent on oxidative imbalance and NADPH oxidase.

Keywords: Matrix metalloproteinase 2, heart, remodeling, oxidative stress, and arrhythmia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

- Figura 1** - Estrutura esquemática das isoformas da MMP-2 e modelos de ativação.p.2;
- Figura 2** - Esquema da composição dos complexos enzimáticos NOX.....p. 8;
- Figura 3** - Esquema da composição e inativação do complexo NOX2 pela ação da apocinina.....p. 10;
- Figura 4** - Esquema de tratamento dos protocolos *Time-Course* e Tratamento...p. 15;
- Figura 5** - A administração sistêmica de MMP-2 não induz alteração na razão peso coração/peso corporal.....p.20;
- Figura 6** - A administração sistêmica de MMP-2 induz a deposição de colágeno no coração, mas não induziu hipertrofia dos cardiomiócitos.....p. 21;
- Figura 7** - A administração sistêmica de MMP-2 induz desequilíbrio redox no coração.....p. 23;
- Figura 8** - Apocinina reverte aumento da atividade gelatinolítica no coração induzida por MMP-2.....p. 24;
- Figura 9** - A apocinina reverte a fibrose e a deposição de colágeno no coração induzida pela MMP-2.....p. 26;
- Figura 10** - A apocinina reverte o desequilíbrio redox no coração induzido pela MMP-2..... p. 29;
- Tabela 1** - Tabela da razão peso do coração e peso corporal dos animais durante o protocolo do *time-course*.....p.19;
- Tabela 2** - Parâmetros eletrocardiográficos de animais controle e MMP-2 durante o protocolo time-course..... p. 22;
- Tabela 3** - Tabela da razão peso do coração e peso corporal dos animais.....p. 25;
- Tabela 4** - Parâmetros eletrocardiográficos de animais controle e MMP-2 tratados com apocicina.....p. 27;

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
BPM	Batimento Por Minuto
BSA	Albumina de Soro Bovino
CaCl ₂	Cloreto de Calcio
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de Ética da UFPa
DCV	Doenças Cardiovasculares
DHE	Dihidroetidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECG	Eletrocardiograma
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR	Receptor Do Fator De Crescimento Epidérmico
EPM	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HE	Hematoxilina e Eosina
IC	Insuficiência Cardíaca
IP	Intraperitoneal
IPTG	Isopropil β-D-Tiogalactopiranosídeo
KCl	Cloreto de Potássio
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani

LPS	Lipopolissacarídeos
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinase de Matriz
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida Reduzida
NEM	N-etilmaleimida
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PHE	Fenantrolina
PKC	Proteína quinase C
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
RPM	Rotações Por Minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TIMPs	Inibidores teciduais de MMPs
TNC	Tris, NaCl e ClCa_2

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2).....	1
1.2 MMP-2 e IC	4
1.3 Apocinina.....	9
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 Obtenção da MMP-2.....	12
3.2 Expressão e purificação da MMP-2.....	13
3.3 Animais do estudo	14
3.4 Delineamento experimental	14
3.5 Eletrocardiograma (ECG)	15
3.6 Análises bioquímicas e morfológicas do coração	16
3.6.1 Avaliação da atividade e expressão de MMP-2 no coração .	16
3.6.2 Avaliação de remodelamento e fibrose cardíaca	17
3.6.3 Análises bioquímicas.....	17
3.7 Análise estatística.....	19
4. RESULTADOS	19
4.1 No time-course a administração sistêmica de MMP-2 promove fibrose, aumento da atividade gelatinolítica, desequilíbrio oxidativo e alteração de condução no coração não apresentando hipertrofia dos miócitos.....	19
4.2 Apocinina a longo prazo reverte aumento de atividade e expressão de MMP-2 no ventrículo esquerdo após administração sistêmica de MMP-2.....	23

4.3 Apocinina reverte remodelamento cardíaco induzido por MMP-2 no ventrículo esquerdo de camundongos	24
4.4 Apocinina reverte as alterações de condução elétrica induzidas pelo aumento de MMP-2	26
4.5 Apocinina reverte alterações no estado redox induzidas pelo aumento de MMP-2.....	27
5. DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÕES.....	33
7. REFERÊNCIAS	34
8. Comprovante de aceite de artigo científico	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 Metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2)

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de 28 proteases pertencentes a superfamília de zinco-peptidases Metzincin, destas 23 são encontradas em humanos. As MMPs são responsáveis pela degradação de componentes da matriz extracelular (MEC), sendo classificadas em relação à estrutura peptídica, organização tridimensional e sua afinidade com o substrato em: Colagenases (MMP-1, -8 e -13); Gelatinases (MMP-2 e -9); Estromelinas (MMP-3, -10, -11 e -27); Matrilisinas (MMP-7 e -26); MMPs de membrana (MMP-14, -15, -16, -17, -24 e -25) e MMPs não classificadas (MMP-12, -19, -20, -21, -22, -23 e -28). As MMPs possuem homologia estrutural, no geral a maioria possui uma região contendo um pró-peptídeo, sítio catalítico contendo um íon de zinco em seu sítio catalítico ligado a 3 histidinas e um domínio hemopexina. (NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006)

As gelatinases MMP-2 e MMP-9 se diferenciam das outras MMPs por possuírem três domínios de fibronectina tipo II no sítio catalítico. Essa característica garante alta afinidade à gelatina (VISSE; NAGASE, 2003). Em adição, o domínio catalítico da MMP-2 contém 2 zínco conservados, sendo um presente no motivo catalítico conservado (HEXXHXXGXXXXH) e ligado aos três resíduos de histidina (His 201, 205 e 211), acompanhado pelo resíduo conservado de glutamato (Glu202) que são essenciais para atividade catalítica da MMP-2 (ARZA *et al.*, 2001; DI PIZIO; AGAMENNONE; ASCHI, 2012).

A MMP-2 possui 660 resíduos de aminoácidos, que após expressa é transportada para o retículo endoplasmático via translocamento pelo peptídeo sinal, sendo secretada para o meio extracelular como uma enzima latente de 72 kDa (pro-MMP-2). A isoforma pro-MMP-2 é uma isoforma inativa devido a interação entre um resíduo de cisteína presente no pró-peptídeo que realiza uma ligação sulfidrílica com o zinco presente no sítio catalítico, o que mantém o sítio catalítico inacessível para ligação com os substratos. Para ocorrer ativação da MMP-2 é necessária a quebra da ligação sulfidrílica, mecanismo de ativação conhecido como "*cystein switch*". A ativação proteolítica da MMP-2 pode ocorrer devido a ação de proteases (serino proteases ou outras MMPs), ou por compostos químicos como dodecilsulfato de sódio (SDS) e tiocianato de sódio (NaSCN), pela interação com metais pesados (chumbo e mercúrio)

ou ainda por agentes oxidantes e alquilantes. Durante a ativação proteolítica a MMP-2 perde o pró-peptídeo assumindo o tamanho molecular de 64 kDa, como o representado na Figura 1. Os agentes oxidantes como as espécies reativas de oxigênio (EROs), dentre eles o superóxido, peroxinitrito e peróxido de hidrogênio são capazes de ativar a MMP-2 de forma não proteolítica. Neste caso, a ligação sulfidrila entre a cisteína e zinco é rompida e o domínio pró-peptídeo permanece na estrutura, mantendo o tamanho molecular de 72 kDa da MMP-2, sendo esta isoforma conhecida como MMP-2 kDa ativa (WANG *et al.*, 2002; VAN WART; BIRKEDAL-HANSEN, 1990).

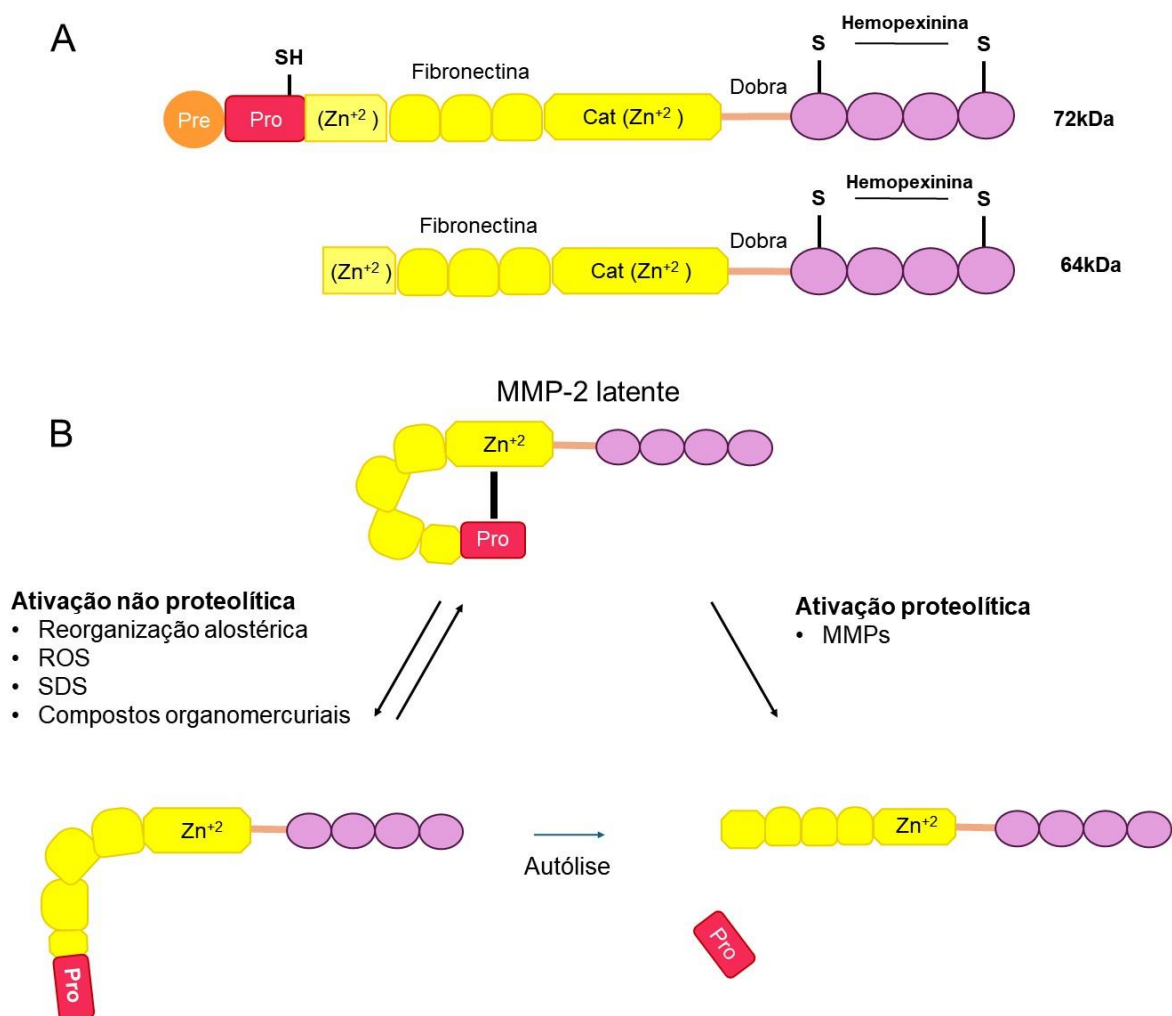


Figura 1. Estrutura esquemática das isoformas da MMP-2 e modelos de ativação. **A.** A estrutura dos domínios presentes na MMP-2 contendo as isoformas de 72kDa inativa e a 64kDa ativa. **B.** Conformações assumidas pela MMP-2 ao ser ativada, a partir da sua conformação latente e inativa. Podendo sofrer ativação não proteolítica ocasionado por reorganização da MMP-2 devido a liberação do sítio catalítico sem ocasionar a perda do pró-peptídeo ou sofrendo de ativação proteolítica ocasionado por outras MMPs

A atividade catalítica da MMP-2 é modulada endogenamente pelos inibidores teciduais de MMPs, conhecidos como TIMPs, sendo eles: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. A MMP-2 pode ser inibida pelos 4 TIMPs, porém o TIMP-2 é o seu principal modulador. Além dos TIMPs, a atividade de MMPs pode ser afetada pela alfa-2-macroglobulina. Existe uma relação estequiométrica entre a MMP-2 e TIMP-2 de 1:1, o que mantém a estrutura organizacional da matriz extracelular. A variação na razão MMP-2/TIMP-2 leva a maior ativação da MMP-2 (CUI; HU; KHALIL, 2017). Esse processo de ativação também necessita da presença da MMP-14, que através de uma ligação conjunta entre MMP-2 e MMP-14, mediada pelo TIMP-2, leva a degradação proteolítica do pró-peptídeo da MMP-2 (ITOH *et al.*, 2001; RA; PARKS, 2007; WANG; JUTTERMANN; SOLOWAY, 2000).

A MMP-2 é produzida constitutivamente na maioria das células do organismo, incluindo as que compõem o sistema cardiovascular: fibroblastos, células endoteliais, cardiomiócitos, muscular lisa, adipócitos e células inflamatórias. A MMP-2 é capaz de clivar uma gama de substratos da matriz extracelular, dentre eles o colágeno desnaturado (tipo I, IV e V), gelatina, glicoproteínas da MEC, fibronectina, laminina, agrecan, elastina e vitronectina (KIM *et al.*, 2016; XIAO; LIU; HAN, 2016). Além disso, vários substratos não pertencentes à matriz extracelular podem ser degradados pela MMP-2. No coração a MMP-2 é capaz de clivar proteínas estruturais do sarcômero como tintina (ALI *et al.*, 2010), troponina I (WANG *et al.*, 2002) e alfa-actinina (SUNG *et al.*, 2007).

A MMP-2 é responsável por modular funções fisiológicas importantes como a angiogênese, desempenhando papel essencial para a migração celular durante a formação e crescimento tecidual (NGUYEN; ARKELL; JACKSON, 2001). A MMP-2 também possui importância na resposta inflamatória pela degradação da membrana basal, o que possibilita a infiltração de células de defesa como neutrófilos e linfócitos no tecido lesionado (CEPEDA *et al.*, 2016). No entanto, a atividade exacerbada de MMP-2 é descrita em doenças cardiovasculares, em especial a insuficiência cardíaca (IC) onde o aumento sistêmico de MMP-2 é relacionado a alterações estruturais, funcionais no miocárdio (BERGMAN *et al.*, 2007; BUCKLEY *et al.*, 2023).

1.2 MMP-2 e IC

A IC é uma doença de causas multifatoriais que afeta cerca de 26 milhões de pessoas no mundo, sendo caracterizada pela perda da capacidade do coração de manter o fluxo de pressão basal sanguíneo, ocasionado por um déficit de contração e/ou relaxamento que compromete o órgão. A progressão da IC promove redução da tolerância ao exercício, ocasionando a diminuição da qualidade de vida (INAMDAR; INAMDAR, 2016; MCDONAGH *et al.*, 2021; SAVARESE; LUND, 2017; TOMASONI *et al.*, 2019; YANCY *et al.*, 2013).

O aumento de MMP-2 é descrito em estudos pré-clínicos e clínicos de insuficiência cardíaca, principalmente relacionado ao remodelamento ventricular. Este processo pode ser desencadeado por alterações genéticas ou por evento patológico agudo (exemplo infarto do miocárdio) ou crônico (exemplo hipertensão). Na hipertensão, ocorre aumento do estresse na parede ventricular levando o coração a se adaptar pelo aumento da espessura das paredes. Este processo é conhecido como remodelamento adaptativo de caráter compensatório, onde a hipertrofia do tecido preserva a função cardíaca (SELVETELLA *et al.*, 2004). No entanto, este processo pode evoluir para um remodelamento mal-adaptativo levando ao quadro de IC, onde o estresse no músculo cardíaco é capaz de alterar a microestrutura da MEC, gerando hipertrofia, enrijecimento e alterações anatômicas na parede do ventrículo esquerdo. O enrijecimento do miocárdio ocorre devido a exacerbada deposição de colágeno e a degradação de proteínas presentes no sarcômero, alterando a habilidade contrátil dos cardiomiócitos (BORLAUG; PAULUS, 2011; DECOUX *et al.*, 2014).

Estudos clínicos com pacientes com IC mostram que o nível plasmático de MMP-2 aumentado pode ser utilizado como indicativo de agravo e mau-prognóstico da doença (BIOLO *et al.*, 2010; TÄGER *et al.*, 2017). Zhao *et al.*, (2014), ao analisar amostras de tecido cardíaco de pacientes submetidos a transplante de órgão, observou o aumento 4 vezes maior na expressão e atividade da MMP-2 quando comparado com indivíduos saudáveis (ZHAO *et al.*, 2014). Em pacientes com IC aguda devido infarto do miocárdio, os níveis de MMP-2 estão associados à gravidade dos quadros de isquemia e disfunção ventricular (NILSSON *et al.*, 2012; SHIRAKABE *et al.*, 2012). Em um estudo de coorte com idosos mostrou que níveis altos de MMP-2 é associado a quadros mais graves de IC e fibrilação atrial (BUCKLEY *et al.*, 2023).

Buscando avaliar se a MMP-2 é capaz de ocasionar alterações morfológicas e funcionais sem doenças de base, Bergman *et al.*, (2007) expressaram a MMP-2 no interior de cardiomiócitos em camundongos durante 4, 8 e 12 meses. Aos 4 meses foram observados: hipertrofia do miócito, ativação e proliferação de fibroblastos, aumento da deposição de colágeno e anomalias estruturais incluindo lise de miofilamentos, hipertrofia dos túbulos T e anormalidades mitocondriais. Na marca de 8 meses os animais apresentaram aumento de fibrose perivascular e maior infiltração de células inflamatórias. A diminuição da função cardíaca, acúmulo de líquido abdominal e cianose foram identificados nos animais apenas no tempo de 12 meses de observação (BERGMAN *et al.*, 2007).

A fibrose que ocorre durante o remodelamento cardíaco na IC altera a capacidade natural de acoplamento do cardiomiócito durante a sístole e diástole e a interação célula-célula o que interfere na propagação do impulso elétrico adequado, ocasionando em uma alteração de excitabilidade cardíaca (FRANCIS STUART *et al.*, 2016).

Ao comparar alterações de estrutura, função e arritmogênese em átrios de camundongos jovens e idosos, Jansen *et al.* (2017) observaram que o envelhecimento desses animais é responsável pela maior taxa de arritmia atrial encontrada. A fibrilação atrial encontrada em animais idosos foi sustentada na maioria dos casos, acompanhada no bloqueio do nó atrioventricular. Associado a essas alterações foi identificado a ampliação das ondas P, medida de condução atrial, e do intervalo PR, medida de condução através do nó atrioventricular, em camundongos idosos. Ao avaliar as alterações morfológicas foi identificado que há maior incidência de fibrose no átrio de animais idosos, logo ao avaliar possíveis alterações nos índices de MMP-2 e 9 e dos TIMPs 1-4 encontrados no tecido foi identificado que a relação estequiométrica da MMP-2: TIMP 1 e MMP-2: TIMP 2 é encontrada aumentada em corações envelhecidos (JANSEN *et al.*, 2017).

Recentemente Wang *et al.*, (2023), buscaram avaliar como a fibrose no tecido cardíaco impacta na eletro condutância do tecido. Para isso foram utilizados camundongos transgênicos que expressam o canal fotovoltaico ChR2(H134R) exclusivamente no fibroblasto cardíaco, logo após uma lesão provocada por um episódio de isquemia e reperfusão, o perfil de excitabilidade das fibras cardíacas na

presença e ausência de tecido cicatrizado foi observado. E uma vez lesionado, a fibrose adquirida foi capaz de alterar o padrão de excitação do músculo cardíaco, ocasionando arritmogênese na região (BUCKLEY *et al.*, 2023).

Diferentes estudos realizados no modelo de isquemia e reperfusão cardíaca de infarto do miocárdio foram capazes de identificar os alvos proteolíticos intracelulares da MMP-2 que levam a diminuição da função contrátil do coração. No primeiro estudo realizado por Wang *et al.* (2002) demonstrou que a MMP-2 tem capacidade de clivar a troponina I localizada nos sarcômeros em proximidade aos miofilamentos finos do tecido. (WANG *et al.*, 2002). Em seguida Sawicki *et al.* (2005) identificaram a miosina de cadeia leve localizada no sarcômero do cardiomiócito como um novo substrato intracelular da MMP-2 (SAWICKI *et al.*, 2005). Pouco tempo depois Sung *et al.* (2007) identificaram a alfa actina como o terceiro substrato intracelular da MMP-2, desta vez em modelo de isquemia e reperfusão intensificada pela infusão direta de peroxinitrito em corações isolados que ativa a ação da MMP-2 levando a diminuição significativa dos níveis da proteína citoesquelética alfa actina e diminuição da função ventricular (SUNG *et al.*, 2007). O último alvo proteolítico intracelular da MMP-2 observado pelo grupo foi publicado por Ali *et al.* (2010), onde foi descrito que a MMP-2 é capaz de degradar a proteína de miofilamento tintina presente no sarcômero dos cardiomiócitos (ALI *et al.*, 2010).

Prado *et al.* (2018), investigaram a relação entre o aumento de EROs e o aumento de atividade da MMP-2. Onde foi demonstrado em cultura de células do músculo liso de camundongos que a MMP-2 é capaz de ativar vias que induzem a formação de EROs no tecido muscular liso vascular, sendo a MMP-2 capaz de liberar na matriz extracelular o fator de crescimento semelhante ao EGF de ligação à heparina, que uma vez liberado é capaz de se ligar ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que ativa uma cascata de sinalização intracelular que modula a ativação da fosfolipase C, levando a formação de diacilglicerol e a ativação da proteína quinase C (PKC). A PKC leva ao aumento de atividade do complexo NADPH oxidase ocasionando o aumento da produção de EROs no tecido (PRADO *et al.*, 2018).

A NADPH oxidase é um complexo enzimático presente na membrana celular, sendo especializado em gerar EROs como o superóxido e o peróxido de hidrogênio. Os membros da família NOX são constituídos de maneira generalizada por uma

subunidade catalítica acoplada a membrana citocromo b558 (p22phox, proteína G) e componentes citosólicos (rac, p47phox, p67phox, p40phox). A NOX possui diversas isoformas sendo elas as pertencentes a família NOX (NOX 1-5) e a família dupla oxidase (DUOX 1-2), portanto a subunidade catalítica da proteína G é distinta entre as isoformas sendo sua estrutura catalítica clássica conhecida como gp91phox a subunidade pertencente a NOX2, os componentes pertencentes ao complexo enzimático se encontram representados na figura 2 (KINKADE; STREETER; MILLER, 2013; YU *et al.*, 1998).

Dentre as subunidades da NOX, a subunidade p47phox desempenha um papel essencial de organizar e translocar as subunidades citosólicas no processo de ativação da NOX à membrana plasmática, através da sua associação com a p22phox (RASTOGI *et al.*, 2016). Os componentes da NOX dependentes de ativadores citosólicos permanecem em sua forma inativa desacoplada até receber um estímulo de ativação, uma vez montada a estrutura do complexo ativado este é responsável pelo transporte de elétrons transformando o O₂ solúvel em radical O₂⁻.

A presença da NADPH dentro do sistema cardíaco já foi descrita em células musculares lisas vasculares, células endoteliais vasculares, cardiomiócitos e fibroblastos adventícios. As principais NOX encontradas no miocárdio são a NOX2, localizada na membrana celular, e a NOX4, localizada em organelas intracelulares presentes principalmente nas mitocôndrias. (KAYAMA *et al.*, 2015; PANDAY *et al.*, 2015; SAVLA; LADDHA; KULKARNI, 2021).

Dependente de ativadores citosólicos

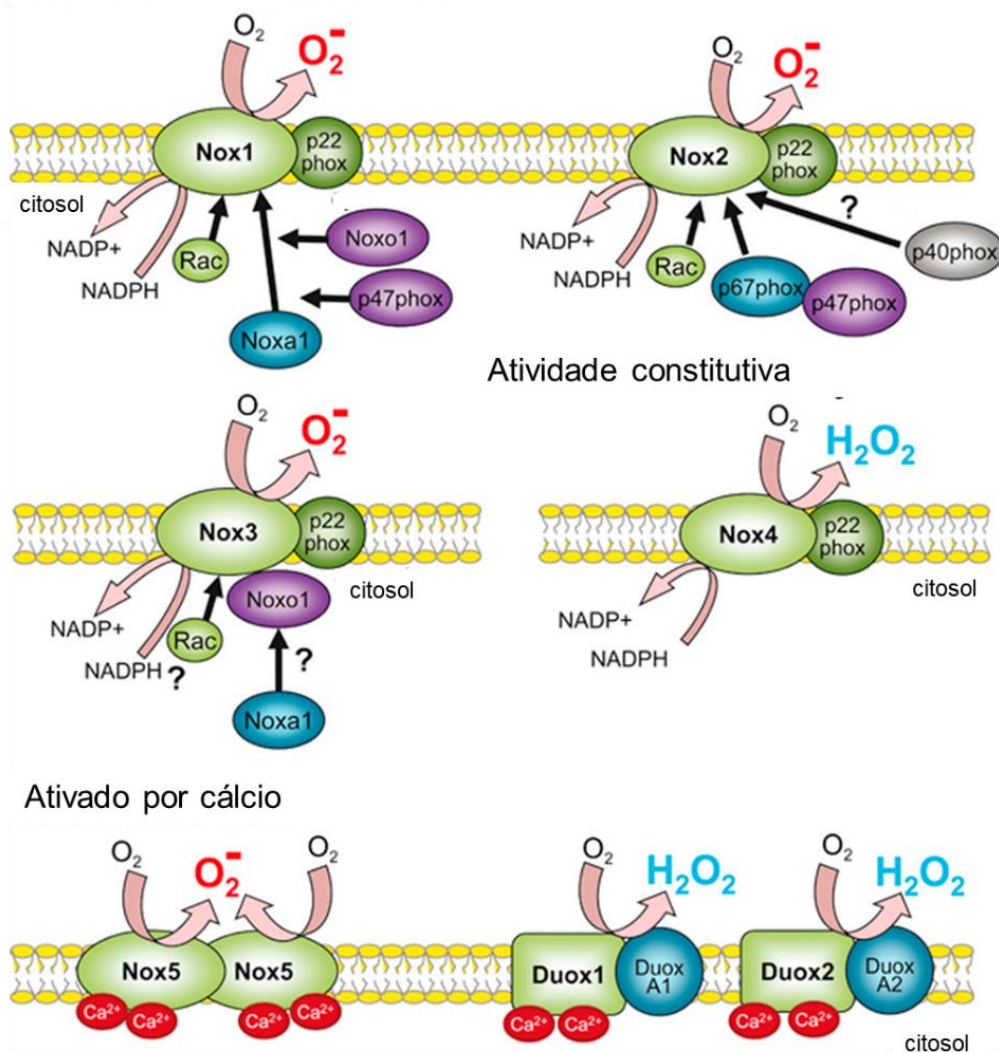


Figura 2. Esquema da composição dos complexos enzimáticos NOX. Adaptada de BRANDES; WEISSMANN; SCHRÖDER (2014).

Como demonstrado por Prado *et al.*, (2018), o aumento de MMP-2 tecidual também é acompanhado com aumento de estresse oxidativo. Em camundongos transgênicos, a superexpressão de MMP-2 no miocárdio tornou os animais mais suscetíveis ao estresse oxidativo quando submetidos a isquemia e reperfusão. (ZHOU *et al.*, 2007). Em estudo realizado por Doerries *et al.*, (2007) foi identificado uma relação entre a subunidade p47phox, presente na NADPH oxidase, e o remodelamento/disfunção observado após o infarto do miocárdio. Nesse estudo com camundongos mostrou que animais nocaute para a p47phox apresentaram maior taxa de sobrevivência, menor remodelamento ventricular, diminuição na área de fibrose no tecido cardíaco associado à redução da atividade gelatinolítica de MMP-2 no tecido cardíaco quando comparados aos animais controle. Os autores sugeriram que a

modulação da NADPH no tecido cardíaco pode ser um método terapêutico eficaz para se combater as alterações ocasionadas pelo aumento sistêmico de MMP-2 (DOERRIES *et al.*, 2007).

Métodos terapêuticos que buscam equilibrar o estado redox durante a IC podem partir do uso de drogas *scavengers*, como a N-acetilcisteína e o tempol, que são compostos miméticos de antioxidantes endógenos melhorando o desequilíbrio oxidativo (BOURRAINDELOUP *et al.*, 2004; GAO *et al.*, 2004). Outra maneira de impedir o desequilíbrio oxidativo é pela inibição da produção de compostos reativos a partir do uso de drogas sintéticas e naturais que diminuem a formação das espécies reativas, um exemplo é a apocinina (VAN DER POL *et al.*, 2019).

1.3 Apocinina

A apocinina é uma droga de origem vegetal, originalmente extraída da *Picrorhiza kurroa* Royle (*Scrophulariaceae*), que é capaz de bloquear a migração dos componentes citosólicos p47phox e p67phox para a membrana prevenindo a montagem e ativação da NOX (STOLK *et al.*, 1994). Outra atividade secundária exercida pela apocinina é a sua capacidade de auxiliar a defesa antioxidante mitocondrial no tecido cardíaco (BOSHTAM *et al.*, 2021; BRAVO-SÁNCHEZ *et al.*, 2021; ENGELS *et al.*, 1992; SAVLA; LADDHA; KULKARNI, 2021).

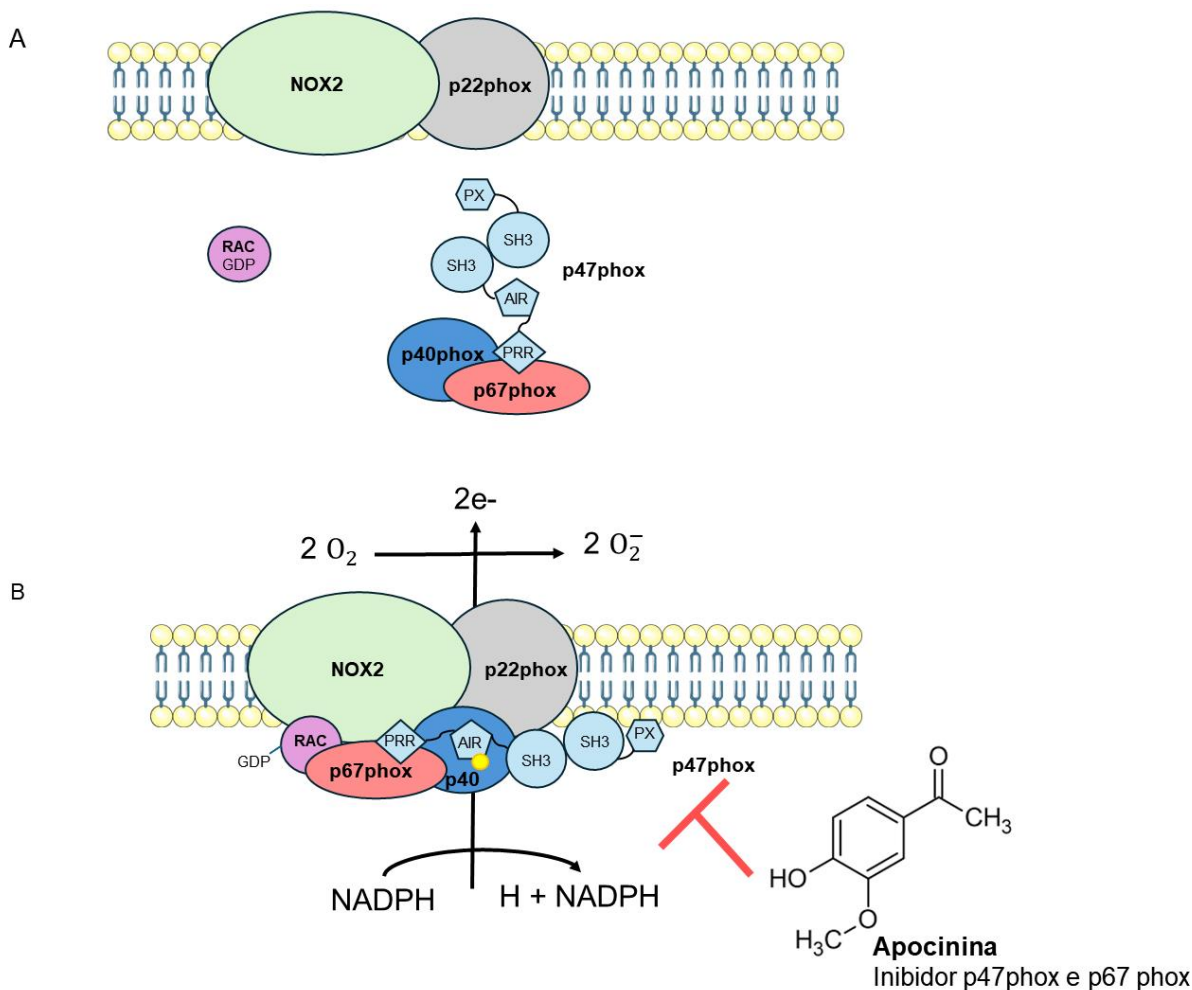


Figura 3. Esquema da composição e inativação do complexo NOX2 pela ação da apocinina.

A apocinina é descrita como um pró-fármaco, que é convertida por oxidação mediada por peroxidase em um dímero, sendo descrito que em seu processo de ativação necessita da mieloperoxidase (MPO) ou da presença de H_2O_2 , que são capazes de formar o radical ativo, que por sua vez é capaz de inativar a NADPH oxidase (SIMONS *et al.*, 1990; XIMENES *et al.*, 2007). Possuindo uma baixa taxa de toxicidade (LD50: 9g/Kg) após administração oral e com efeitos colaterais desconhecidos (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008).

A apocinina também é capaz de diminuir significativamente os níveis de expressão de mRNA das subunidades constitutivas gp91phox, p22phox, p47phox e p67phox em ratos Rato Dahl sensível ao sal. Nesse modelo de hipertensão a apocinina também se demonstrou capaz de diminuir a pressão arterial renal a longo prazo (TIAN *et al.*, 2008).

O processo de inibição da NADPH oxidase pela apocinina ainda não foi completamente elucidado, portanto não é claro se a inativação das subunidades ocorre devido a uma inibição direta da associação dos componentes do citosol ou ocasionado por um bloqueio de um dos elementos de sinalização que leva a montagem do maquinário citosólico (ALDIERI *et al.*, 2008; SELEMIDIS *et al.*, 2008).

Diversos estudos mostraram que a apocinina é capaz de modular a produção de ERO no tecido cardíaco, preservando a defesa antioxidante do tecido (BRAVO-SÁNCHEZ *et al.*, 2021; SCHLÜTER *et al.*, 2008). Liu *et al.*, (2010) mostraram que a apocinina foi capaz melhorar a disfunção cardíaca apresentada, através da sua capacidade de regular de modo positivo a expressão e atividade da proteína SERCA2a, responsável pela capacidade contrátil dos cardiomiócitos. A apocinina também se demonstrou capaz de tratar a fibrose intersticial encontrada no tecido cardíaco, sendo demonstrado no trabalho que o tratamento foi capaz de normalizar a atividade da NADPH oxidase, diminuir significativamente os níveis de peroxidação lipídica e expressão de MMP-2 no tecido. Além de impulsionar os níveis de SOD encontrado no miocárdio (LIU *et al.*, 2010).

Em ratos com disfunção diastólica induzido pela administração de angiotensina II, o uso da apocinina como agente terapêutico de resgate produziu a melhora no quadro de fibrose cardíaca com efeitos comparáveis com o uso da eplerenona, sendo responsável por inibir a hipertrofia ventricular ocasionada pelo modelo e reverter a disfunção diastólica ocasionada pela administração de angiotensina II. A apocinina se demonstrou capaz de atenuar o estresse oxidativo do miocárdio, sendo observado na diminuição dos níveis de peroxidação lipídica e na regulação nos níveis de NOX4 encontrado no tecido cardíaco (LI *et al.*, 2013).

Em outro estudo, Liu *et al.* (2017), utilizando modelo de IC por sobrecarga de pressão em ratos, observou que a apocinina é capaz de atenuar o remodelamento cardíaco ao diminuir a deposição de colágeno no tecido. A apocinina também se demonstrou capaz de modular os níveis de estresse oxidativo no modelo, sendo responsável pela menor atividade da NADPH oxidase no tecido cardíaco e pela diminuição dos níveis de EROs e peroxidação lipídica, além de aumentar a atividade da SOD no tecido. No estudo também foi observado que a apocinina foi capaz de reverter o aumento da atividade de MMP-2 ocasionado pelo modelo (LIU *et al.*, 2017).

Portanto, sabendo que o aumento da atividade da MMP-2 está associado ao remodelamento e disfunção cardíaca; e que a MMP-2 é capaz de aumentar a produção de ERO via aumento da NADPH oxidase, a hipótese deste estudo é de que o tratamento com apocinina melhore o remodelamento e condução elétrica cardíaca em camundongos que receberam administração sistêmica de MMP-2. Logo, esse trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da apocinina sobre o remodelamento e condução elétrica cardíaca induzido pelo aumento sistêmico de MMP-2 em camundongos adultos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar se o tratamento com apocinina melhora o remodelamento e disfunção elétrica cardíaca após administração sistêmica de MMP-2.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o remodelamento, desequilíbrio oxidativo e alterações de condução elétrica do coração durante o protocolo *time course* de animais que receberam administração sistêmica de MMP-2;
- Avaliar o remodelamento e a fibrose cardíaca de camundongos tratados ou não com apocinina, após administração sistêmica de MMP-2;
- Avaliar atividade e expressão de MMP-2 no coração de camundongos tratados ou não com apocinina, após administração sistêmica de MMP-2;
- Avaliar o desequilíbrio oxidativo no coração de camundongos tratados ou não com apocinina, após administração sistêmica de MMP-2;
- Avaliar a condução elétrica cardíaca de camundongos tratados ou não com apocinina, após administração sistêmica de MMP-2.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção da MMP-2

Para a realização do trabalho foi utilizado o clone pET5A, previamente caracterizado (GONÇALVES *et al.*, 2012). O clone pET5a contém toda a sequência da região codificadora da MMP-2 humana.

3.2 Expressão e purificação da MMP-2

Para expressão do clone pET5A, primeiramente foi realizado um cultivo de pré-inóculo em 30 mL de meio LB (extrato de levedura: 5 g/L, NaCl: 10 g/L; triptona 10 g/L) contendo 100 µg/mL de ampicilina, que foi incubado em estufa a 37°C, por 12 a 16 horas, sob rotação de 200 rpm. No dia seguinte, foi realizada a expansão do cultivo, utilizando-se de 10ml do pré-inóculo em 1L de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina, que ficou incubada em estufa sob agitação a 200 rpm e 37°C, por aproximadamente 4 horas. Para a indução de expressão da MMP-2, foi adicionado 50 µmol/L de isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) ao meio de cultura. Após adicionado o IPTG, a temperatura foi ajustada para 18°C e o meio ficou sob agitação a 200 rpm, overnight.

Após a expressão, o meio de cultura foi centrifugado a 4000g, por 15 minutos, para a obtenção do pellet bacteriano. O pellet foi ressuspensionado em 25 ml de tampão TNC + inibidores (Tris (50 mmol/L), NaCl (150 mmol/L), CaCl₂ (10 mmol/L), Brij 35 (0,005%) contendo 2 mM dos inibidores de protease: fenantrolina (PHE, Sigma, St Louis, MO, USA), phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF, Sigma) e N-ethylmaleimide (NEM, Sigma)]. A amostra foi submetida a 10 ciclos de 10 segundos de sonicação com intervalos de 10 segundos entre os ciclos. Em seguida, o lisado bacteriano foi submetido a centrifugação de 18.000g por 30 minutos. O sobrenadante coletado foi submetido à técnica de cromatografia utilizando a coluna de gelatina sepharose (Gelatin SepharoseTM 4B, GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

A corrida cromatográfica foi realizada utilizando uma bomba peristáltica, em temperatura de 4°C. Primeiramente a coluna foi equilibrada passando 30 mL de TNC, em seguida foi passada a amostra, depois foram realizadas de modo sequencial as seguintes lavagens: 60 ml de TNC , 60 mL de TNC + Triton X-114 (0,1 v/v, Sigma) para a remoção do LPS da amostra(REICHELT; SCHWARZ; DONZEAU, 2006), 60 mL de TNC novamente e por último 80 mL de TNC + DMSO (5% v/v, Sigma) para eluição da amostra da coluna. Para concentração da proteína eluída, foram utilizados concentradores tipo Amicon com membrana com *cut-off* de 30 a 50 kDa (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), sob rotação de 4.000g a 4°C. Durante a concentração a proteína foi lavada 2 vezes em água Milli-Q gelada para a retirada do DMSO e inibidores (AZEVEDO *et al.*, 2016). A amostra foi então aliquotada e armazenada em

-20°C. A quantificação da proteína foi realizada pelo método de coeficiente molar utilizando o valor da absorbância obtida em 280 nm utilizando aparelho nanodrop (BioDrop, UK). A pureza da proteína foi confirmada em gel SDS-PAGE 10% corado pela prata e a atividade foi avaliada por zimografia em gel (KLEINER; STETLERSTEVENSON, 1994).

3.3 Animais do estudo

Este estudo seguiu o guia NIH de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, os protocolos experimentais seguidos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal do Pará (UFPA) sob número de protocolo (nº 6897030624) e (nº 2045251018). Neste estudo foram utilizados 30 camundongos C57BL/6, machos adultos (8 semanas) para o protocolo *time-course* e 44 camundongos C57BL/6, machos adultos (8 semanas) para o protocolo de tratamento com apocinina. Os animais foram obtidos no biotério do Instituto Evandro Chagas e mantidos no Biotério do Laboratório de Estresse Oxidativo da UFPA, mantidos em sala com temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso livre a água e alimento.

3.4 Delineamento experimental

Primeiramente foi realizado um protocolo experimental *time-course* de administração sistêmica de MMP-2 (MMP-2 150ng/g de peso de animal via ip), durante o período de uma, duas e quatro semanas no qual foi avaliado o remodelamento, desequilíbrio oxidativo e condução elétrica cardíaca. Como controle experimental, animais controle veículo receberam solução salina 0,9% via intraperitoneal (ip). Em seguida, a partir dos resultados do *time-course* foi realizado o segundo protocolo que consiste no tratamento com o antioxidante apocinina após a administração de MMP-2. Neste protocolo os animais primeiramente foram divididos em dois grupos: um grupo veículo que recebeu solução salina 0,9% via ip e o segundo grupo que recebeu MMP-2 na dose de 150ng/g de peso de animal via ip, por um período de 4 semanas. Finalizada as quatro semanas, os animais foram subdivididos em quatro grupos sendo dessa vez administrado apocinina 40 mg/Kg via gavagem, por um período de quatro semanas. O Controle gerou os grupos finais 1) Veículo e 2) Apocinina, e o grupo MMP-2 gerou os grupos finais 3) MMP-2 e 4) MMP-2 + Apocinina. Durante o protocolo de *time-couse* e protocolo tratamento, os animais passaram por

um exame de eletrocardiograma nos períodos pré-estabelecidos de uma, duas, quatro e oito semanas ou até o final do período de administração e eutanásia para a coleta de órgãos, que foram utilizados para a avaliação morfológica e bioquímica. O passo-a-passo realizado durante os protocolos experimentais foi descrito na figura 4.

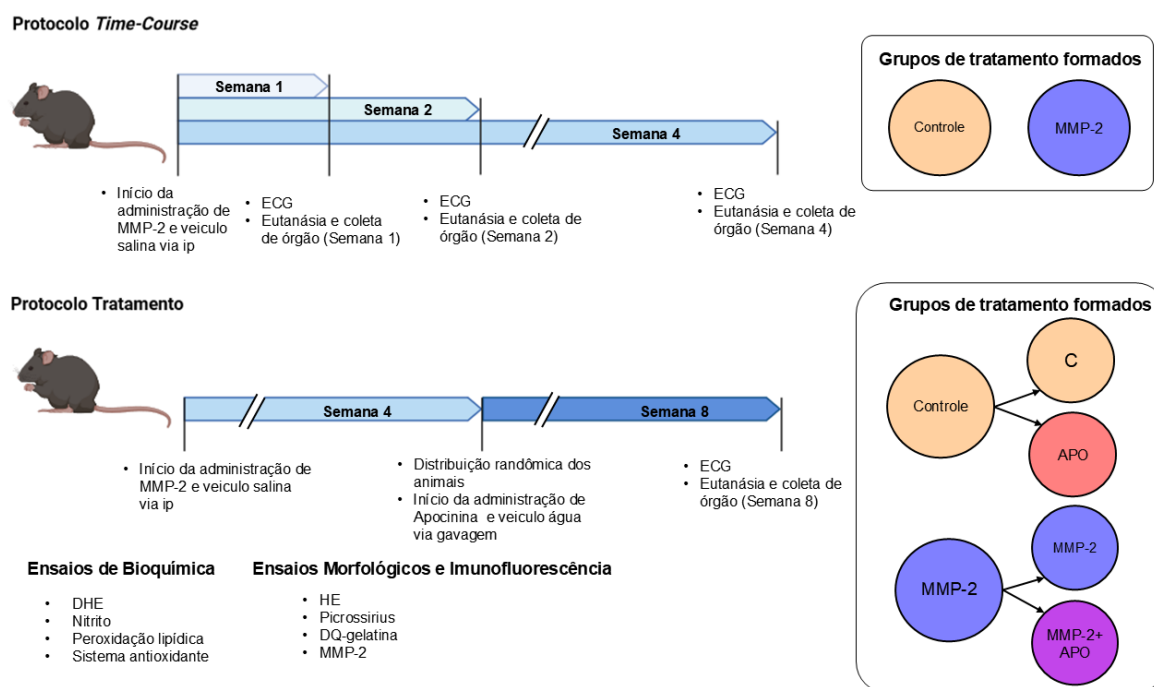


Figura 4. Esquema de tratamento dos protocolos *Time-Course* e Tratamento

3.5 Eletrocardiograma (ECG)

Todos os grupos passaram pelo eletrocardiograma (ECG). Durante o exame os animais foram levados para um ambiente calmo onde foram sedados com tribromoetanol (15mL/Kg), cuidadosamente depilados na região torácica e instalados os eletrodos. Os animais foram posicionados dentro da gaiola de Faraday durante o registro, os eletrodos foram fixados, sendo o eletrodo de aterramento na pata traseira do animal, seguido por um eletrodo de referência no ombro direito e por último um eletrodo foi fixado no ombro esquerdo obtendo a derivação DII. No total 3 eletrodos foram utilizados para a captação do sinal, conectados diretamente ao sistema de aquisição. O amplificador que realizou a aquisição dos registros com entrada AC de alta impedância (Grass Technologies, P511, West Warwick, Rhode Island, EUA), ajustado com filtro de 0,3 Hz (passa-alta) e 300Hz (passa-baixa). Os registros foram monitorados com osciloscópio (Protek, 6510) e digitalizados de modo contínuo a 10

kHz por um computador equipado com software Axioscope 9.0 (Axon Instruments, Champaign, IL, EUA), o tempo de registro de cada animal foi de 5 min e os arquivos adquiridos com as leituras foram salvos e armazenados para análise posterior. Os registros foram analisados com o software de interface “LabChart v.7.3.8” (ADInstruments, Colorado Springs, CO, EUA). Uma sessão aleatória do traçado que contém uma sequência de intervalos R-R foi selecionada para calcular a frequência cardíaca (bpm), complexos QRS e os segmentos PR e QT. O QTc foi calculado usando a fórmula de Bazett com modificações para roedores, $QTc = QT/\sqrt{(RR/150)}$.

3.6 Análises bioquímicas e morfológicas do coração

Ao final do tratamento os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de cetamina (90 mg/Kg) + cloridrato de xilazina (10mg/Kg) via ip. Após eutanásia por exsanguinação, o coração foi coletado, limpo de tecidos aderentes em solução de PBS e imerso em solução de KCl (50 mM) para permanecer em fase de diástole. Depois foi pesado e cortado transversalmente ao meio. Em diferentes protocolos ocorreu a fixação da parte inferior em líquido de crioproteção (Tissue Tek, Sakura Finetek) e a fixação em solução de formalina 10% (Formol 37% 100 ml/L, Fosfato de Sódio Monobásico 4 g/L, Fosfato de Sódio Dibásico 12,2 g/L) por 24 horas, o tecido em formalina foi em seguida desidratado com soluções crescentes de álcool e xilol posteriormente emblocados em parafina.

3.6.1 Avaliação da atividade e expressão de MMP-2 no coração

Para avaliar a atividade e expressão da MMP-2 no coração, utilizamos a metodologia de zimografia *in situ* e imunofluorescência. Para tanto, o tecido congelado em líquido crioprotetor foi cortado em fatias de 5 µm em criostato (CM 1900, Leica DMR, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany). Em seguida, os cortes foram incubados com substrato DQ gelatin (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA) em tampão Tris (50mM) contendo $CaCl_2$ (10 mM) por 60 minutos em câmara escura e úmida a 37°C. Depois, as lâminas foram lavadas 5x por 5 minutos em PBS para então serem fixadas com formalina 10 % por 15 minutos. Após lavagem em PBS e PBS-Glicina, os cortes foram incubados no anticorpo primário anti-MMP-2 (Abcam, 1:300, Cambridge, UK), em solução de PBS contendo BSA e Tween 20 a 4°C overnight. No dia seguinte, os cortes foram lavados 5x por 5 minutos em PBS e incubados com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com

Alexafluor-594 (1:1500, Abcam, Cambridge, UK), por 1h em temperatura ambiente em câmara úmida e escura. Em seguida, as lâminas foram lavadas 10x por 5 minutos em PBS e montadas com solução de Fluoroshield (DAPI, F6057, Sigma). As imagens foram obtidas por microscópio de fluorescência Zeiss, sendo utilizado como base de ajuste de captura imagens dos grupos controle em cada ensaio. A atividade gelatinolítica e expressão de MMP-2 foi quantificada *mensurando* a fluorescência verde e vermelha utilizando o software Image J conforme descrito em estudo prévio (RODRIGUES *et al.*, 2022).

3.6.2 Avaliação de remodelamento e fibrose cardíaca

Com o coração emblocado em parafina foram realizados cortes transversais no coração na espessura de 5 µm que foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e picrosirius. Os cortes de HE foram utilizados para mensurar o diâmetro do miócito e os cortes de picrosirius foram utilizados para avaliar o conteúdo de colágeno intersticial, conforme descrito por Estrada *et al.*, 2022 (ESTRADA *et al.*, 2022).

3.6.3 Análises bioquímicas

3.6.3.1 Quantificação dos níveis de espécies reativas de oxigênio *in situ*

Para investigar elevação de espécies reativas de oxigênio no coração utilizamos a sonda dihidroetidina (DHE) em cortes congelados obtidos no criostato (CM 1900; Leica, Imaging Systems Ltd. Cambridge, Reino Unido). Para tanto, as fatias de coração de 5 µm de espessura foram incubadas com a sonda DHE (10 µM) por 30 minutos a temperatura ambiente em câmara escura e úmida. Em seguida, as lâminas foram lavadas 5 vezes por 5 minutos em solução de PBS e montadas em solução de PBS-Glicina 70% para serem fotografadas em microscópio de fluorescência Zeiss. As imagens foram obtidas utilizando objetiva de 40x e o conteúdo de EROs *in situ* foi quantificado mensurando a fluorescência vermelha pelo programa Image J conforme descrito por Rodrigues *et al.*, 2022 (RODRIGUES *et al.*, 2022).

3.6.3.2 Avaliação da peroxidação lipídica

O coração foi homogeneizado em PBS e o extrato foi utilizado para avaliar as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme a metodologia descrita por Ohkawa *et al.*, 1978 (OHKAWA; OHISHI; YAGI', 1978). Resumidamente, as

amostras foram homogeneizadas com ácido tiobarbitúrico de 10 mM a 95°C por 60 minutos. Depois, o produto resultante do ensaio de coloração rosa foi lido em microplaca por espectrofotômetro a 535 nm (BIO-RAD Modelo 450 Leitor de Microplacas). Os resultados foram expressos em nmol MDA/mg de proteína utilizando uma curva padrão de malonaldeído.

3.6.3.3 Níveis de Nitrito

O coração foi homogeneizado em PBS e o extrato obtido foi utilizado para quantificar a presença de nitrito nas amostras ao serem incubadas com o reagente de Griess, aplicadas em microplacas de 96 poços e realizado a leitura em espectrofotômetro a 550 nm (BIO-RAD Modelo 450 Microplate Reader). A quantificação de nitrito foi expressa em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína com base na curva padrão de nitrito de sódio (LEONE *et al.*, 1992).

3.6.3.4 Avaliação do sistema antioxidante

O coração foi homogeneizado em PBS e o extrato foi utilizado para mensuração da atividade da SOD e catalase. A atividade da SOD foi avaliada a partir da reação do extrato da amostra de coração com os reagentes hipoxantina e NBT (MAIER; CHAN, 2002). A reação promove uma reação colorimétrica formando um extrato de coloração roxa na presença da enzima SOD, essa alteração foi medida utilizando um leitor de microplaca no comprimento de onda 470 nm (BIO-RAD Modelo 450 Leitor de Microplacas). O resultado foi comparado com a curva padrão da enzima SOD e expressos em unidades de SOD/mg de proteína.

A atividade da CAT foi medida após a reação da amostra de extrato de coração com H_2O_2 , que produz como da reação o formaldeído que é evidenciado pelo tratamento com Purpald® 34,2 mM (4-amino-3-hidrazino-5-mercaptop-1, 2,4-triazol). O produto da reação de cor púrpura é medido em leitor de microplaca a 540 nm (BIO-RAD Modelo 450 Leitor de Microplacas) utilizando-se de uma curva padrão para formaldeído 4,25 μM . Os resultados obtidos foram expressos por μM formaldeído/min/mg de proteína determinada pela comparação com uma curva padrão de formaldeído (JOHANSSON; HÅKAN BORG, 1988; WHEELER *et al.*, 1990).

3.7 Análise estatística

Os resultados foram avaliados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® 8.0 softwares (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Para o *time course* foi realizado teste t de student. Para o tratamento com apocinina, primeiramente, foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk, em seguida foi realizado o teste de ANOVA de duas vias e pós-teste Tukey, sendo os resultados expressos pela média $\pm$ EPM, sendo considerados valores estatisticamente significativos $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 No time-course a administração sistêmica de MMP-2 promove fibrose, aumento da atividade gelatinolítica, desequilíbrio oxidativo e alteração de condução no coração não apresentando hipertrofia dos miócitos.

Para avaliar a presença de hipertrofia no tecido cardíaco a razão entre peso corporal e peso do coração durante o período do *time-course* de 1, 2 e 4 semanas foram analisados e dispostos na Tabela 1 ($p < 0,5$) e um gráfico representativo presente na Figura 5-B foi gerado, sendo possível observar que não houve alterações significativas entre os grupos controle e os grupos MMP-2 durante todos os períodos avaliados ($p < 0,5$, Figura 5).

Tabela 1. Tabela da razão peso do coração e peso corporal dos animais durante o protocolo do *time-course*.

	Semana 1		Semana 2		Semana 4	
	Controle	MMP-2	Controle	MMP-2	Controle	MMP-2
Peso corporal (g)	25.4 $\pm$ 0,4	25.3 $\pm$ 0,4	26 $\pm$ 0,7	25.7 $\pm$ 0,7	26 $\pm$ 0.8	25.7 $\pm$ 0.5
Razão peso coração / corporal (mg)	5.4 $\pm$ 0.2	4.8 $\pm$ 0.4	4.3 $\pm$ 0.2	4.5 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 0.3	4 $\pm$ 0.3

Os dados estão representados pela média $\pm$ EPM; * $p < 0,05$ vs controle, # $p < 0,05$ vs MMP-2, teste t (n=5 /grupo).

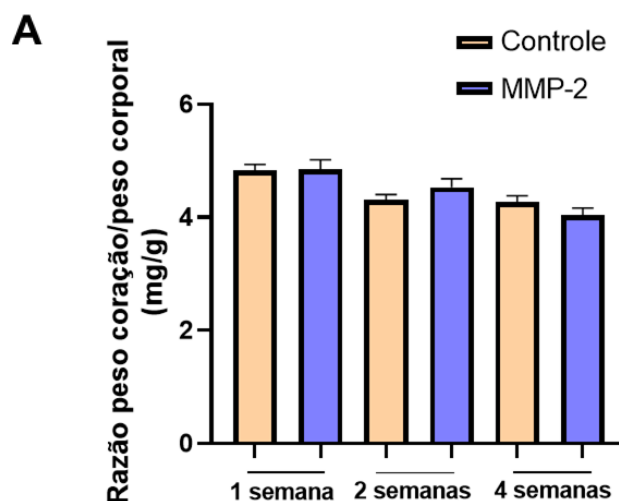


Figura 5. A administração sistêmica de MMP-2 não induz alteração na razão peso coração/peso corporal. B. Representação gráfica da medida do diâmetro dos miócitos. Os dados são representados em unidades arbitrárias e porcentagem (P%); * $p < 0,05$ vs controle, teste t ($n=5$ /grupo).

Quando avaliada a atividade gelatinolítica no coração, foi observado que os animais que receberam a administração diária de MMP-2 tiveram maior atividade gelatinolítica no tecido cardíaco durante todos os períodos observados ($p > 0,05$, Figura 6, A). Ao avaliar os parâmetros morfológicos, utilizando métodos histológicos com cortes corados com HE, foi contabilizado o diâmetro da secção dos miócitos, sendo observado que durante todos os períodos avaliados não houve alteração de diâmetro observado entre os grupos experimentais ($p > 0,05$, Figura 6, A-D). Para a avaliação da deposição de colágeno na matriz extracelular cardíaca foi realizada a coloração de picrosirius. Os animais que receberam administração de MMP-2 apresentaram aumento de deposição de colágeno na matriz a partir da primeira semana de administração, sendo persistente durante todo o período avaliado ($p < 0,5$, Figura 6,

A-E).

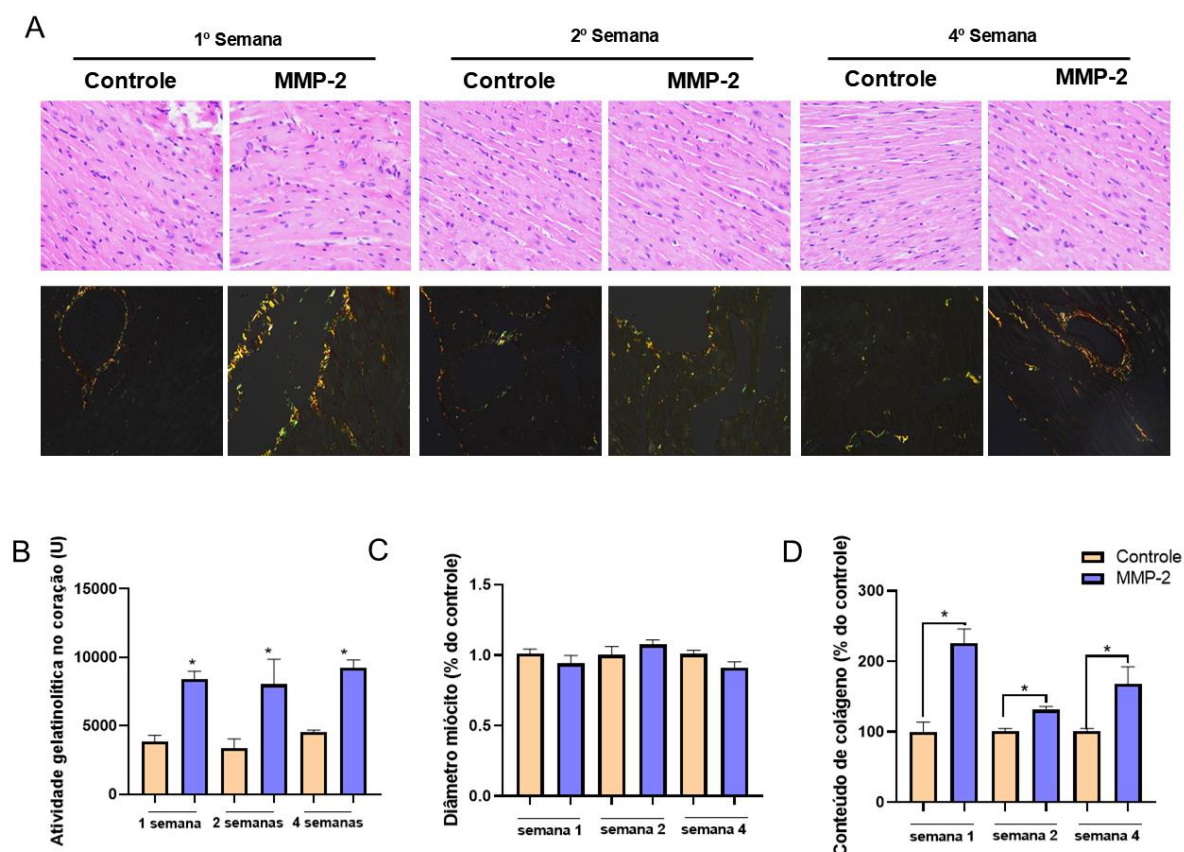


Figura 6. A administração sistêmica de MMP-2 induz a deposição de colágeno no coração, mas não induziu hipertrofia dos cardiomiócitos. A. Paineis representativos do diâmetro dos miócitos corados com hematoxilina e eosina e representativos do colágeno da matriz corado com picrosirius. **B.** Representação gráfica da atividade gelatinolítica no coração. **C.** Representação gráfica da medida do diâmetro dos miócitos. **D.** Representação gráfica do conteúdo de colágeno. Os dados são representados em unidades arbitrárias e porcentagem (P%); * $p < 0,05$ vs controle, teste t ($n=5$ /grupo).

Quando avaliados os parâmetros de eletrocardiograma durante o protocolo *time-course*, foi identificado que os animais que receberam a administração da MMP-2 apresentaram alterações elétricas a partir da primeira semana de administração. Nossos resultados indicam diminuição da frequência cardíaca, sendo acompanhada do aumento dos intervalos RR, PQ, QT e QTc a partir da semana 1 de administração de MMP-2 ($p < 0,05$, tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros eletrocardiográficos de animais controle e MMP-2 durante o protocolo *time-course*.

Semana 1	Semana 2	Semana 4
----------	----------	----------

	Controle	MMP-2	Controle	MMP-2	Controle	MMP-2
Frequência						
cardíaca	454 ± 3	353 ± 5*	450 ± 8	360 ± 11*	450 ± 7	358 ± 14*
(BPM)						
RR (mS)	120 ± 4	175 ± 2*	122 ± 4	160 ± 2*	122 ± 6	178 ± 6*
PQ (mS)	38 ± 1	49 ± 1*	40 ± 1	48 ± 1*	41 ± 1	50 ± 1*
QRS (mS)	8.1 ± 0.2	8.3 ± 0.2	8.2 ± 0.2	8.2 ± 0.3	8.4 ± 0.2	8.7 ± 0.3
QT (mS)	42 ± 1	51 ± 1*	43 ± 1	49 ± 1*	43 ± 2	53 ± 1*
QTc	38 ± 1	55 ± 1*	38 ± 1	50 ± 1*	38 ± 1	57 ± 1*

bpm (batimentos por minuto), mS (milissegundos). Os dados estão representados pela média ± EPM; * p < 0,05 vs controle, teste t (n=5/grupo).

Para avaliação bioquímica observada no período do *time-course*, foi possível observar que os níveis de MDA aumentaram nos grupos que receberam administração sistêmica de MMP-2 durante todos os períodos avaliados (p < 0,5, Figura 7, A). Quando avaliado os níveis de nitrito, também foi possível observar um aumento significativo nos níveis de nitrito nos animais que receberam administração de MMP-2 em todos os períodos avaliados comparado aos respectivos controles (p > 0,5, Figura 7, B).

Ao avaliar a atividade da enzima catalase é possível observar que não houve alteração significativa entre os grupos que receberam administração sistêmica de MMP-2 e os grupos controle em todos os períodos avaliados (p > 0,05, Figura 7, C). No entanto, a atividade da SOD diminuiu significativamente nos grupos que receberam administração sistêmica de MMP-2 quando comparados aos dos grupos controles (p < 0,05, Figura 7, D).

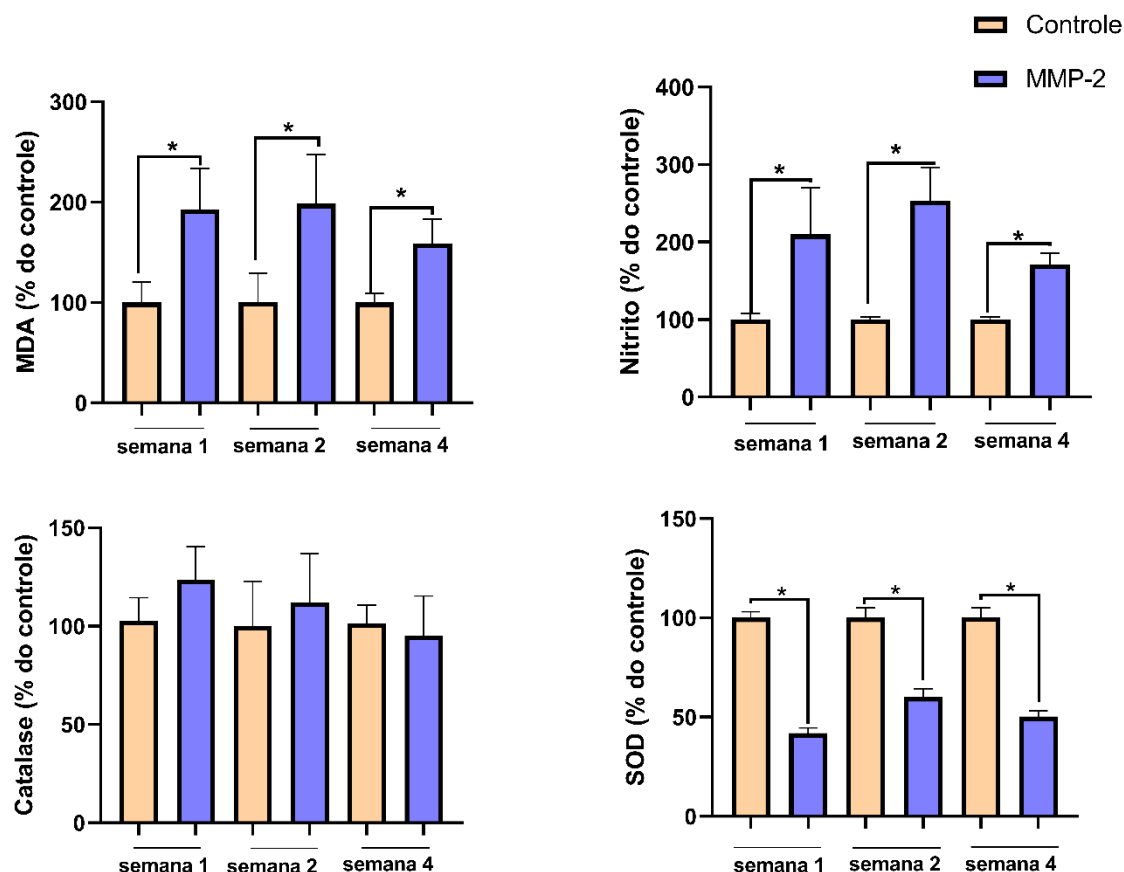


Figura 7. A administração sistêmica de MMP-2 induz desequilíbrio redox no coração. A. Quantificação dos níveis de TBARS no coração. B. Quantificação dos níveis de nitrito no coração. C. Quantificação da atividade da catalase no coração. D. Quantificação da atividade da SOD no coração. Os dados são representados em porcentagem (P%); * $p < 0,05$ vs controle, teste t ($n=5$ /grupo).

4.2 Apocinina a longo prazo reverte aumento de atividade e expressão de MMP-2 no ventrículo esquerdo após administração sistêmica de MMP-2

Buscando avaliar se as alterações de atividade induzidas pelo aumento sistêmico de MMP-2 persistem a longo prazo e se podem ser revertidas com o tratamento com o antioxidante apocinina, foi realizado o ensaio de atividade gelatinolítica. O grupo MMP-2 apresentou aumento significativo da atividade gelatinolítica comparado ao grupo controle. O tratamento com a Apocinina diminuiu a atividade gelatinolítica induzida pelo aumento de MMP-2 ($p < 0,05$; Figura 8, A-B). Não foi observado diferença na atividade gelatinolítica entre o grupo controle e apocinina ($p > 0,05$, Figura 8, A-B). Para confirmar se o aumento da atividade gelatinolítica foi devido ao aumento de MMP-2 no tecido cardíaco, realizamos a imunofluorescência para MMP-2. O grupo MMP-2 apresentou maior expressão de MMP-2 no miocárdio

comparado ao grupo controle ($p < 0,05$, Figura 8, C-D). O tratamento com apocinina diminuiu a expressão de MMP-2 em relação ao grupo controle e MMP-2 ($p < 0,05$, Figura 8, C-D).

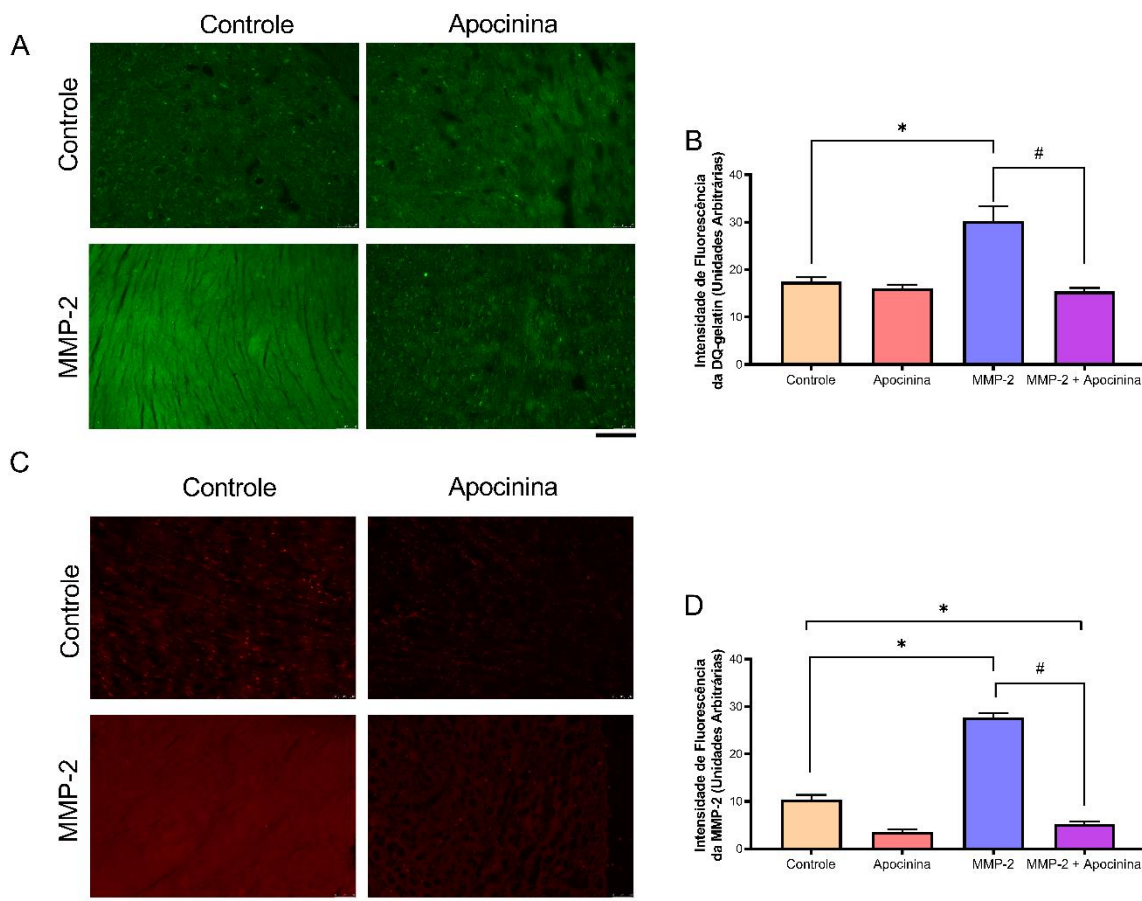


Figura 8. Apocinina reverte aumento da atividade gelatinolítica no coração induzida por MMP-2. **A.** A figura representativa dos dados avaliados *in situ* da ação gelatinolítica nos ventrículos (DQ-gelatin). **B.** Quantificação da intensidade fluorométrica da DQ-gelatin, unidades arbitrárias nos ventrículos. **C.** Figura representativa dos dados avaliados *in situ* da MMP-2 dos ventrículos. **D.** Quantificação dos níveis de expressão de MMP-2 com base na intensidade fluorométrica, unidades arbitrárias, dos ventrículos. A barra corresponde a escala de 100 μ m. Os dados são representados em unidades arbitrárias: * $p < 0,05$ para o grupo controle, # $p \leq 0,05$ para o grupo MMP-2 e ANOVA unidirecional ($n=5$ /grupo).

4.3 Apocinina reverte remodelamento cardíaco induzido por MMP-2 no ventrículo esquerdo de camundongos

Para avaliar as alterações morfológicas induzidas pelo aumento de MMP-2 no miocárdio, foram avaliados diferentes parâmetros morfológicos. O peso do coração, peso corporal e a razão dessas medidas foram analisados e dispostos na Tabela 3 ($p < 0,05$). Ao comparar esses parâmetros é possível observar que não houve diferença

significativa em relação ao peso corporal entre os grupos. Porém é possível observar que o grupo MMP-2 apresentou aumento da razão peso coração/peso corporal e os grupos tratados com apocinina apresentaram diminuição da razão peso do coração/peso corporal quando comparados aos grupos controle e MMP-2.

Tabela 3. Tabela da razão peso do coração e peso corporal dos animais.

	Controle	Apocinina	MMP-2	MMP-2 + Apocinina
Peso corporal (g)	30 ± 0,5	31 ± 0,4	28 ± 0,4	28 ± 0,4
Razão peso coração / corporal (mg)	4,6 ± 0,1	4,3 ± 0,1 ^{*#}	5,0 ± 0,1 [*]	4,5 ± 0,1 [#]

Os dados estão representados pela média ± EPM; * p < 0,05 vs controle, # p < 0,05 vs MMP-2, Two-Way ANOVA (n=8 /grupo).

Para confirmar que o aumento do peso do coração ocorreu por alterações morfológicas nos cardiomiócitos e na matriz extracelular realizamos cortes transversais do coração que foram corados com HE e picrosirius. Nos cortes histológicos corados em HE foi encontrado que aumento da área da secção transversal dos miócitos, sendo possível observar o aumento da área nos grupos tratados com MMP-2 quando comparamos ao grupo controle (P<0,05, Figura 9). O tratamento com apocinina foi capaz de reverter a hipertrofia dos cardiomiócitos ocasionados pela administração sistêmica de MMP-2 (p<0,05; Figura 9, A-B). Não houve diferença entre na área de secção transversal do cardiomiócito entre o grupo controle e apocinina (p>0,05; Figura 9, A-B). O colágeno é o principal componente da matriz extracelular cardíaca, desta forma utilizamos cortes corados com picrosirius para quantificar o conteúdo de colágeno no coração. Os animais que receberam administração sistêmica de MMP-2 apresentaram acúmulo significativo na deposição de colágeno no miocárdio quando comparado com o grupo controle, aumento que foi totalmente revertido pelo tratamento com apocinina (p < 0,05; Figura 9, C - D). Não houve diferença no conteúdo de colágeno entre o grupo controle e apocinina (p>0,05; Figura 9, C-D).

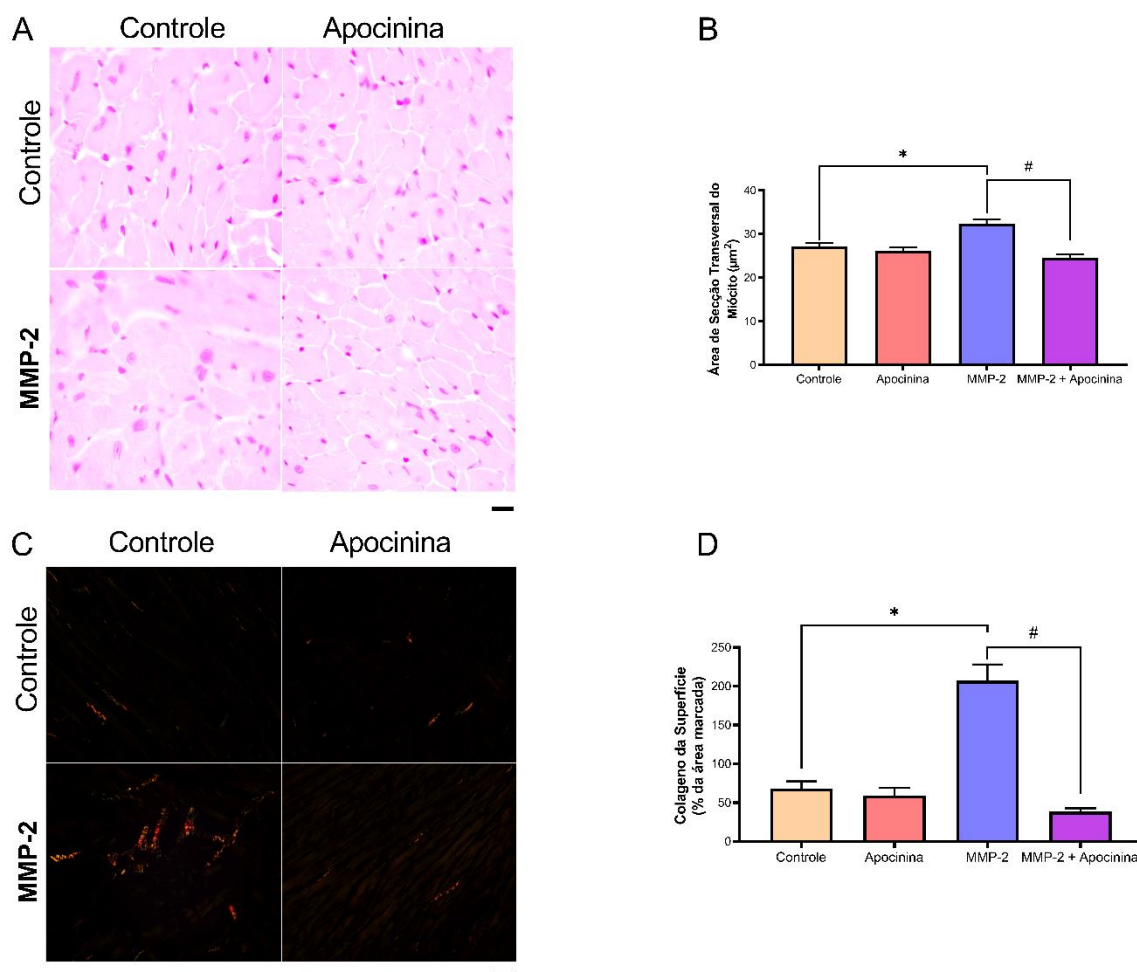


Figura 9. A apocinina reverte a fibrose e a deposição de colágeno no coração induzida pela MMP-2. **A.** Figura representativa do aumento da área de miócitos corados com hematoxilina e eosina no ventrículo esquerdo. **B.** Quantificação da área transversal dos miócitos em μm^2 . **C.** Figura representativa do aumento da deposição de colágeno na superfície intersticial do ventrículo esquerdo. **D.** Quantificação da porcentagem de colágeno observada na superfície intersticial em % de área. A barra corresponde a uma escala de $50\mu\text{m}$. Os dados são representados como média $\pm$ SEM; * $p < 0,05$ para grupo controle, # $p \leq 0,05$ para grupo MMP-2 e ANOVA One-Way ($n=5/\text{grupo}$).

4.4 Apocinina reverte as alterações de condução elétrica induzidas pelo aumento de MMP-2

O aumento de MMP-2 no coração é associado com alterações estruturais e funcionais que resultam em insuficiência cardíaca. O ECG é uma ferramenta clínica utilizada para diagnosticar alterações na condução elétrica cardíaca em animais e humanos com insuficiência cardíaca. Desta forma, decidimos avaliar se a apocinina é capaz de reverter estas alterações elétricas cardíacas induzidas pelo aumento de MMP-2. Em nossos resultados, encontramos que os animais que receberam MMP-2 apresentaram diminuição da frequência cardíaca, aumento do intervalo PR e QTc

comparado aos animais controle ($p < 0,05$, tabela 4). O tratamento com apocinina reverteu todas as alterações no ECG comparado ao grupo MMP-2 ($p < 0,05$, Tabela 4). Não houve diferença nos parâmetros de ECG analisados entre o grupo controle e apocinina ($p < 0,05$).

Tabela 4. Parâmetros eletrocardiográficos de animais controle e MMP-2 tratados com apocinina

	Controle	Apocinina	MMP-2	MMP-2 + Apocinina
Batimento cardíaco (bpm)	454 $\pm$ 1	449 $\pm$ 5	371 $\pm$ 9*	450 $\pm$ 3
PR (ms)	39 $\pm$ 2	37 $\pm$ 3	50 $\pm$ 1*	38 $\pm$ 1
QRS (ms)	8.2 $\pm$ 0.5	8.0 $\pm$ 0.4	8.6 $\pm$ 0.8	8.2 $\pm$ 0.3
QT (ms)	43 $\pm$ 2	41 $\pm$ 3	61 $\pm$ 3*	44 $\pm$ 2
QTc (ms)	38 $\pm$ 2	36 $\pm$ 3	67 $\pm$ 3*	38 $\pm$ 2

bpm (batimentos por minuto), ms (milissegundos). Os dados estão representados pela média $\pm$ EPM; * $p < 0,05$ vs controle, Two-Way ANOVA ($n=5$ /grupo).

4.5 Apocinina reverte alterações no estado redox induzidas pelo aumento de MMP-2

Para avaliar os níveis de ERO no coração foi utilizada a sonda do dihidroetídio (DHE) associado a microscopia de fluorescência como marcador para níveis de EROs em tecidos de ventrículo esquerdo cardíaco. Com essa marcação foi possível visualizar o aumento dos níveis de ERO nos animais que receberam administração sistêmica de MMP-2, quando comparado aos animais do grupo controle ($p < 0,05$; Figura 9, A-B). É possível observar a diminuição de níveis de ERO no grupo tratado com apocinina, quando comparado ao grupo MMP-2, porém é possível observar que ainda há diferença estatística entre o grupo MMP-2+apocinina e o grupo controle ($p < 0,05$; Figura 9, A-B).

A peroxidação lipídica foi mensurada avaliando os níveis de MDA, no qual foi possível observar o aumento nos níveis dos grupos que receberam administração sistêmica de MMP-2 quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$, Figura 9, C). A

administração de apocinina foi capaz de reverter significativamente o aumento ocasionado pela MMP-2 após o período de tratamento ($p < 0,05$, Figura 9, C).

A produção de EROs também foi avaliada a partir das medidas de nitrito. Sendo possível observar que os níveis de nitrito no grupo que recebeu administração sistêmica de MMP-2 estavam aumentados quando comparado aos animais do grupo controle ($p < 0,05$; Figura 9, D). Quando administrada, a apocinina é capaz de reverter o aumento ocasionado dos níveis de nitrito pela MMP-2 ($p < 0,05$; Figura 9, D).

Quando avaliado o sistema redox dos animais é possível observar que a atividade da SOD no grupo que recebeu administração sistêmica de MMP-2 diminuiu significativamente quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$, Figura 9, F). O tratamento com apocinina foi capaz de reverter a diminuição da SOD induzida pela MMP-2 aos níveis de atividade do controle ($p < 0,05$, Figura 9, F). Por outro lado, a atividade da catalase não sofreu alteração após o período de aumento sistêmico de MMP-2 quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$, Figura 9, E). Entretanto, a administração de apocinina foi responsável por aumentar significativamente a atividade da catalase dos animais quando comparado ao grupo controle e ao grupo MMP-2 ($p < 0,05$, Figura 9, E).

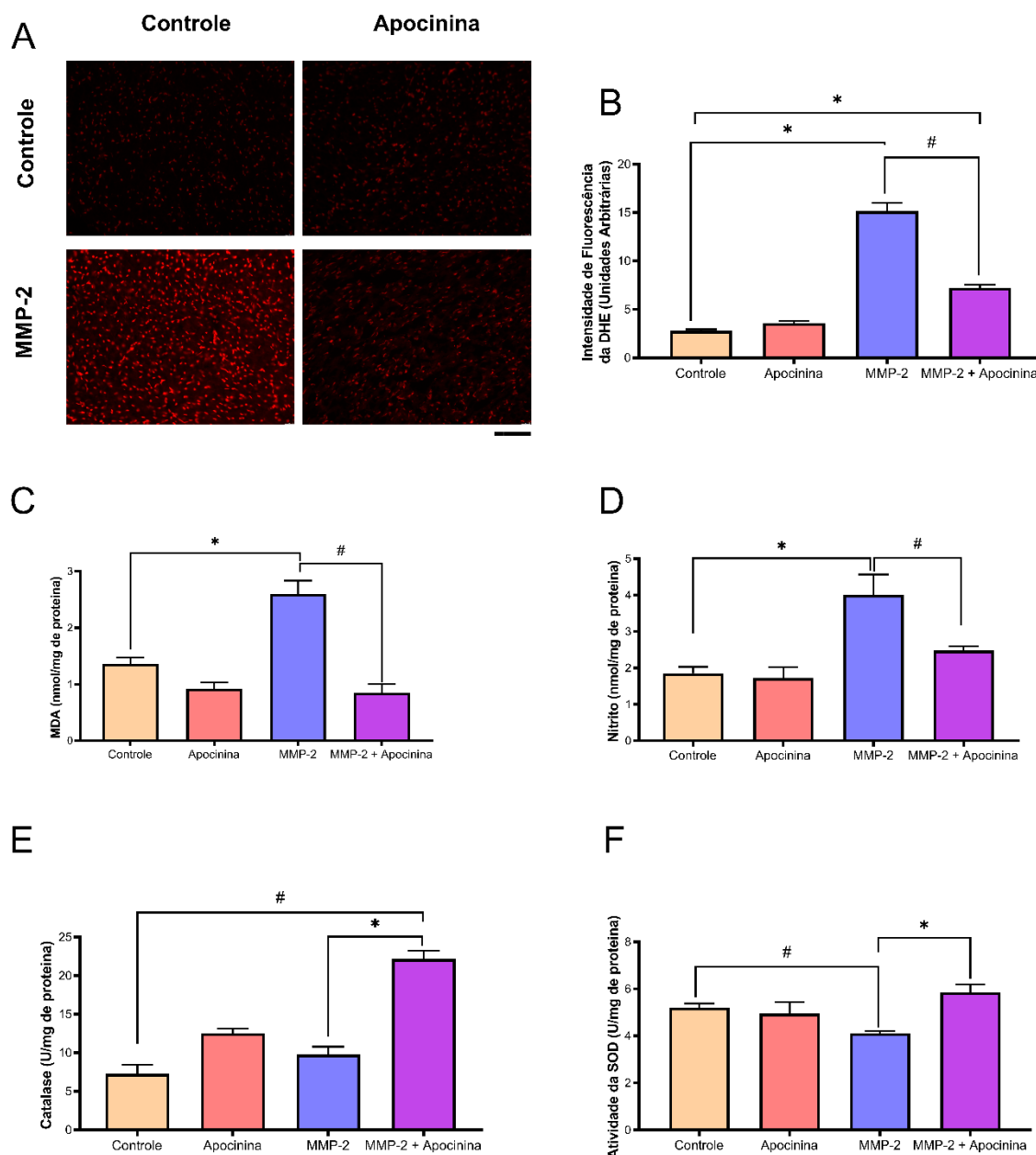


Figura 10. A apocinina reverte o desequilíbrio redox no coração induzido pela MMP-2. **A.** Figura representativa dos dados de desequilíbrio redox avaliados por DHE *in situ*. **B.** Quantificação da intensidade fluorométrica de DHE no coração. **C.** Quantificação da peroxidação lipídica no coração. **D.** Quantificação dos níveis de nitrito no coração. **E.** Quantificação da atividade da catalase no coração. **F.** Quantificação da atividade da SOD no coração. Unidades de fluorescência arbitrárias representam dados. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM; * $p < 0,05$ para grupo controle, # $p \leq 0,05$ para grupo MMP-2 e ANOVA One-Way ($n=5$ /grupo).

5. DISCUSSÃO

Em nossa pesquisa buscamos avaliar quando os efeitos deletérios relacionados ao aumento sistêmico de MMP-2 se instalam no coração, se esses efeitos persistem a longo prazo e quais os possíveis benefícios de um tratamento com o antioxidante

apocinina. Nosso estudo demonstrou que a administração sistêmica de MMP-2 gera efeitos a partir da primeira semana, com aumento de atividade gelatinolítica, deposição de colágeno e alterações de eletro condutância no coração, sem alterações no diâmetro dos cardiomiócitos e hipertrofia ventricular. Estas alterações foram acompanhadas pela elevação dos níveis de nitrito e peroxidação lipídica assim como pela redução da atividade da SOD, durante todo o período avaliado. As alterações induzidas pela MMP-2 no miocárdio permanecem após quatro semanas sem a administração sistêmica de MMP-2, sugerindo que as alterações permanecem a longo prazo. Somado a esses achados, verificamos a presença de hipertrofia no tecido cardíaco. Nossa pesquisa mostrou que a administração de apocinina levou a reversão de fibrose, hipertrofia de cardiomiócitos e disfunção elétrica cardíaca pela diminuição dos níveis e atividade de MMP-2 e estresse oxidativo, sugerindo que as alterações induzidas pela MMP-2 no miocárdio são devidas ao desequilíbrio oxidativo.

Em nosso estudo observamos que o aumento sistêmico de MMP-2 resultou no aumento da atividade de MMP-2 e maior deposição de colágeno no ventrículo esquerdo a partir da primeira semana de administração e que persistiram ao longo das oito semanas. Resultados similares foram encontrados por Bergman *et al.*, (2007) que mostraram que camundongos transgênicos que superexpressam MMP-2 ativa no coração apresentaram remodelamento, com hipertrofia de miócitos, lise de miofilamentos, com extensa desorganização de miócitos, fibrose intersticial e perivascular (BERGMAN *et al.*, 2007). Outros estudos também correlacionaram o aumento de atividade de MMP-2 com o remodelamento da matriz cardíaca e o desenvolvimento de cardiomiopatias (KOHNS *et al.*, 1994; MARTIN *et al.*, 1998; MCCLOSKEY *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2006).

Dentre os principais fatores que afetam a função cardíaca estão a deposição exacerbada de colágeno e hipertrofia ventricular (TANAKA *et al.*, 2004; ZANNAD; DOUSSET; ALLA, 2001; VERHEULE; SCHOTTEN, 2021). Wang *et al.*, (2023) mostraram de forma direta que a formação de cicatriz formada após lesão no miocárdio é diretamente associada a alterações de excitação e arritmogênese. Em estudos clínicos com pacientes com IC a fibrose também foi associada a alterações no eletrocardiograma (AHMAD *et al.*, 2014; BRIASOULIS *et al.*, 2015; GULATI *et al.*, 2013; ZORZI *et al.*, 2016). Massare *et al.*, (2010) também constatou que a ausência de fibrose no modelo de IC remove significativamente a taquicardia ventricular (MASSARE *et al.*, 2010). Esses resultados corroboram com os achados encontrados

em nosso trabalho, em que encontramos fibrose, diminuição da frequência cardíaca e o prolongamento dos intervalos RR, PQ, QT e QTc a partir da primeira semana de administração de MMP-2 quando comparado a animais controle indicando alteração de passagem de impulso elétrico na despolarização e repolarização ocasionado pela administração de MMP-2.

Ao extrapolarmos o período de avaliação das alterações induzidas pela MMP-2 no coração, observamos que mesmo ao interromper a administração de MMP-2 os animais permanecem apresentando maior expressão de MMP-2 e atividade gelatinolítica com persistência de fibrose e alterações na eletro condução cardíaca. Além disso, os animais começaram a apresentar hipertrofia dos miócitos, demonstrando que a alteração adquirida é persistente e se agrava a longo prazo. O tratamento com apocinina reduziu a atividade e expressão de MMP-2 no coração, assim como, a hipertrofia dos miócitos, fibrose e disfunção elétrica cardíaca sugerindo que a NADPH oxidase está envolvida nas alterações morfológicas e funcionais induzidas pelo aumento de MMP-2 no coração.

A capacidade antioxidante da apocinina e consequentemente de atenuar quadros de remodelamento cardíaco foi observada em diferentes estudos. Li *et al.*, (2010), demonstraram que a apocinina foi capaz de inibir a fibrose e hipertrofia cardíaca em animais com diabetes tipo 1 (LI *et al.*, 2010). A diminuição da fibrose também foi observada em animais nocaute para NOX-2 que receberam infusão de angiotensina II (BENDALL *et al.*, 2002; JOHAR *et al.*, 2006).

Dentre as alterações de elétricas cardíacas encontradas nos animais MMP-2 observamos diminuição da frequência cardíaca e prolongamento do intervalo PR, Qt e QTc, indicando alteração na passagem do impulso elétrico da despolarização e repolarização. A melhora na condução elétrica cardíaca com o tratamento com apocinina sugere participação das EROs neste processo. Estudo de GRIEVE *et al.*, (2006), também demonstrou que a apocinina melhora a condução elétrica cardíaca em animais submetidos a bandagem aórtica.

O aumento da atividade de MMP-2 no coração também promoveu desequilíbrio oxidativo, peroxidação lipídica e diminuição da atividade da SOD. Estes resultados estão em conformidade com estudo anterior que mostrou que em pacientes com IC o aumento sistêmico de MMP-2 promoveu a elevação de EROs (MORGUNOVA *et al.*, 1999). Sabe-se que as EROs também podem modular a atividade de MMPs, por exemplo, o peroxinitrito ativa MMP-2 em corações e cardiomiócitos isolados reduzindo

a recuperação contrátil (LI *et al.*, 2013; MOHAMMAD; BABIKER; AL-BADER, 2023). A presença de altas doses de peroxinitrito pode ser citotóxica ao miocárdio, sendo capaz de ocasionar o aumento de produção e atividade de MMP-2 em corações isolados, o aumento de peroxinitrito também é associado a alterações mecânicas, que levam a perda da capacidade contrátil e diminuição do ritmo cardíaco (WANG; SAWICKI; SCHULZ, 2002). Desta forma, o aumento de EROs pela MMP-2 contribui para os efeitos deletérios encontrados no coração a longo prazo induzidos pelo aumento de MMP-2.

No nosso trabalho a apocinina também reverteu a peroxidação lipídica, reduzindo os níveis de EROs e elevando a atividade da CAT e SOD. O que está em conformidade com o apresentado na literatura, uma vez que, a apocinina age na inibição da NADPH-oxidase reduzindo a produção de EROs, sendo portanto, capaz de reverter as alterações induzidas pelo aumento de MMP-2 no coração (MURDOCH *et al.*, 2006; OHTA *et al.*, 2011; SALEEM; PRASAD; GOSWAMI, 2018b).

As DCV são responsáveis por milhares de mortes anualmente (TSAO *et al.*, 2023), portanto estudar fatores que agravam a doença a longo prazo serve para compreendermos melhor essas doenças e traçar um possível tratamento. Definimos como alvo do estudo a MMP-2, que em estudo prévio realizado por Azevedo *et al.* (2016), utilizando uma construção quimera de MMP-2/GFP constitutivamente ativa administrada via intraperitoneal, verificou-se que após alguns minutos de administração a MMP-2 circulante havia saído do plasma e se acumulado no tecido cardíaco (AZEVEDO *et al.*, 2016). Semelhantemente, Ferraz *et al.* (2013), também observaram que a administração intravenosa de MMP-2 recombinante em carneiros levou ao aumento da atividade gelatinolítica no coração e diminuição da contratilidade cardíaca pela induzida pela dobutamina (FERRAZ *et al.*, 2013). Os estudos acima e o nosso mostraram claramente que o aumento de MMP-2 na circulação leva ao aumento da atividade de MMP-2 no coração levando ao prejuízo da função cardíaca e que o uso de antioxidante como a apocinina pode ser uma terapia eficaz para reversão das alterações morfológicas e funcionais induzidas pela MMP-2.

Dentre as limitações de nossa pesquisa não foi possível investigar os mecanismos que promovem a cardioproteção pela apocinina e não foi possível avaliar a função cardíaca, para caracterizar o fenótipo de insuficiência cardíaca. Outra limitação deste estudo é que avaliamos apenas os efeitos da MMP-2 e apocinina em camundongos

machos. Desta forma, estudos posteriores em camundongos fêmeas devem ser conduzidos para avaliação de diferenças nos efeitos e tratamentos entre sexos.

6. CONCLUSÕES

Concluimos que o aumento sistêmico de MMP-2 induz alterações morfológicas e na condução elétrica cardíaca, que são exacerbadas a longo prazo no coração. No entanto, o tratamento com apocinina é capaz de reverter essas alterações sugerindo que estes processos ocorrem pela produção de EROs via NADPH oxidase.

7. REFERÊNCIAS

AHMAD, T.; FIUZAT, M.; NEELY, B.; NEELY, M. L.; PENCINA, M. J.; KRAUS, W. E.; ZANNAD, F.; WHELLAN, D. J.; DONAHUE, M. P.; PIÑA, I. L.; ADAMS, K. F.; KITZMAN, D. W.; O'CONNOR, C. M.; FELKER, G. M. Biomarkers of Myocardial Stress and Fibrosis as Predictors of Mode of Death in Patients with Chronic Heart Failure. **JACC. Heart failure**, v. 2, n. 3, p. 260, 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC4224312/>. Acesso em: 3 maio. 2024.

ALDIERI, E.; RIGANTI, C.; POLIMENI, M.; GAZZANO, E.; LUSSIANA, C.; CAMPIA, I.; GHIGO, D. Classical inhibitors of NOX NAD(P)H oxidases are not specific. **Current drug metabolism**, v. 9, n. 8, p. 686–696, 14 out. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18855607/>. Acesso em: 16 jul. 2024.

ALI, M. A. M.; CHO, W. J.; HUDSON, B.; KASSIRI, Z.; GRANZIER, H.; SCHULZ, R. Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. **Circulation**, v. 122, n. 20, p. 2039–2047, 16 nov. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21041693/>. Acesso em: 16 jun. 2024.

ARZA, B.; DE MAEYER, M.; FÉLEZ, J.; COLLEN, D.; ROGER LIJNEN, H. Critical role of glutamic acid 202 in the enzymatic activity of stromelysin-1 (MMP-3). **European journal of biochemistry**, v. 268, n. 3, p. 826–831, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11168424/>. Acesso em: 10 jul. 2024.

AZEVEDO, A.; PRADO, A. F.; ISSA, J. P. M.; GERLACH, R. F. Matrix metalloproteinase 2 fused to GFP, expressed in E. coli, successfully tracked MMP-2 distribution in vivo. **International journal of biological macromolecules**, v. 89, p. 737–745, 1 ago. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27156693/>. Acesso em: 11 abr. 2024.

BENDALL, J. K.; CAVE, A. C.; HEYMES, C.; GALL, N.; SHAH, A. M. Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. **Circulation**, v. 105, n. 3, p. 293–296, 22 jan. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11804982/>. Acesso em: 29 jul. 2024.

BERGMAN, M. R.; TEERLINK, J. R.; MAHIMKAR, R.; LI, L.; ZHU, B. Q.; NGUYEN, A.; DAHI, S.; KARLINER, J. S.; LOVETT, D. H. Cardiac matrix

metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic dysfunction. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 292, n. 4, abr. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17158653/>>. Acesso em: 6 maio. 2024.

BIOLO, A.; FISCH, M.; BALOG, J.; CHAO, T.; SCHULZE, P. C.; OOI, H.; SIWIK, D.; COLUCCI, W. S. Episodes of acute heart failure syndrome are associated with increased levels of troponin and extracellular matrix markers. **Circulation. Heart failure**, v. 3, n. 1, p. 44–50, jan. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19850700/>>. Acesso em: 19 jun. 2024.

BORLAUG, B. A.; PAULUS, W. J. Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. **European heart journal**, v. 32, n. 6, p. 670–679, mar. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21138935/>>. Acesso em: 23 jun. 2024.

BOSHTAM, M.; KOUHPAYEH, S.; AMINI, F.; AZIZI, Y.; NAJAFLU, M.; SHARIATI, L.; KHANAHMAD, H. Anti-inflammatory effects of apocynin: a narrative review of the evidence. **All Life**, v. 14, n. 1, p. 997–1010, 1 jan. 2021. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/26895293.2021.1990136>>. Acesso em: 6 nov. 2023.

BOURRAINDELOUP, M.; ADAMY, C.; CANDIANI, G.; CAILLERET, M.; BOURIN, M. C.; BADOUAL, T.; SU, J. B.; ADUBEIRO, S.; ROUDOT-THORAVALL, F.; DUBOIS-RANDE, J. L.; HITTINGER, L.; PECKER, F. N-acetylcysteine treatment normalizes serum tumor necrosis factor-alpha level and hinders the progression of cardiac injury in hypertensive rats. **Circulation**, v. 110, n. 14, p. 2003–2009, 5 out. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15451797/>>. Acesso em: 5 set. 2024.

BRANDES, R. P.; WEISSMANN, N.; SCHRÖDER, K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 76, p. 208–226, 1 nov. 2014. . Acesso em: 24 jul. 2024.

BRAVO-SÁNCHEZ, E.; PEÑA-MONTES, D.; SÁNCHEZ-DUARTE, S.; SAAVEDRA-MOLINA, A.; SÁNCHEZ-DUARTE, E.; MONTOYA-PÉREZ, R. Effects of

apocynin on heart muscle oxidative stress of rats with experimental diabetes: Implications for mitochondria. **Antioxidants**, v. 10, n. 3, p. 1–15, 1 mar. 2021.

BRIASOULIS, A.; MALLIKETHI-REDDY, S.; PALLA, M.; ALESH, I.; AFONSO, L. Myocardial fibrosis on cardiac magnetic resonance and cardiac outcomes in hypertrophic cardiomyopathy: a meta-analysis. **Heart**, v. 101, n. 17, p. 1406–1411, 1 set. 2015. Disponível em: <<https://heart.bmj.com/content/101/17/1406>>. Acesso em: 3 maio. 2024.

BUCKLEY, L. F.; AGHA, A. M.; DORBALA, P.; CLAGGETT, B. L.; YU, B.; HUSSAIN, A.; NAMBI, V.; CHEN, L. Y.; MATSUSHITA, K.; HOOGEVEEN, R. C.; BALLANTYNE, C. M.; SHAH, A. M. MMP-2 Associates With Incident Heart Failure and Atrial Fibrillation: The ARIC Study. **Circulation. Heart failure**, v. 16, n. 11, p. E010849, 1 nov. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37753653/>>. Acesso em: 1 set. 2024.

CEPEDA, M. A.; PELLING, J. J. H.; EVERED, C. L.; WILLIAMS, K. C.; FREEDMAN, Z.; STAN, I.; WILLSON, J. A.; LEONG, H. S.; DAMJANOVSKI, S. Less is more: low expression of MT1-MMP is optimal to promote migration and tumourigenesis of breast cancer cells. **Molecular Cancer**, v. 15, n. 1, 18 out. 2016. Disponível em: <pmc/articles/PMC5070195/>. Acesso em: 16 jun. 2024.

COSTA, C. A.; AMARAL, T. A. S.; CARVALHO, L. C. R. M.; OGNIBENE, D. T.; DA SILVA, A. F. E.; MOSS, M. B.; VALENÇA, S. S.; DE MOURA, R. S.; RESENDE, Â. C. Antioxidant treatment with tempol and apocynin prevents endothelial dysfunction and development of renovascular hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 22, n. 12, p. 1242–1249, dez. 2009.

CUI, N.; HU, M.; KHALIL, R. A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 147, p. 1–73, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28413025/>>. Acesso em: 11 jun. 2024.

DECOUX, A.; LINDSEY, M. L.; VILLARREAL, F.; GARCIA, R. A.; SCHULZ, R. Myocardial matrix metalloproteinase-2: inside out and upside down. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 0, p. 64, 1 dez. 2014. Disponível em: <pmc/articles/PMC4312173/>. Acesso em: 19 jun. 2024.

DI PIZIO, A.; AGAMENNONE, M.; ASCHI, M. An integrated computational approach to rationalize the activity of non-zinc-binding MMP-2 inhibitors. **PloS one**, v. 7, n. 11, 8 nov. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23144829/>>. Acesso em: 10 jul. 2024.

DOERRIES, C.; GROTE, K.; HILFIKER-KLEINER, D.; LUCHTEFELD, M.; SCHAEFER, A.; HOLLAND, S. M.; SORRENTINO, S.; MANES, C.; SCHIEFFER, B.; DREXLER, H.; LANDMESSER, U. Critical role of the NAD(P)H oxidase subunit p47phox for left ventricular remodeling/dysfunction and survival after myocardial infarction. **Circulation research**, v. 100, n. 6, p. 894–903, mar. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17332431/>>. Acesso em: 22 jun. 2024.

ENGELS, F.; RENIRIE, B. F.; 'T HART, B. A.; LABADIE, R. P.; NIJKAMP, F. P. Effects of apocynin, a drug isolated from the roots of *Picrorhiza kurroa*, on arachidonic acid metabolism. **FEBS Letters**, v. 305, n. 3, p. 254–256, 6 jul. 1992. . Acesso em: 6 nov. 2023.

ESTRADA, J. E. C.; RODRIGUES, K. E.; MACIEL, A.; BANNWART, C. M.; DIAS, W. F.; HAMOY, M.; ZINGALI, R. B.; SOARES, A. M.; RIBEIRO, C. H. M. A.; GERLACH, R. F.; MONTEIRO, M. C.; PRADO, A. F. BmooMP α -I, a Metalloproteinase Isolated from *Bothrops moojeni* Venom, Reduces Blood Pressure, Reverses Left Ventricular Remodeling and Improves Cardiac Electrical Conduction in Rats with Renovascular Hypertension. **Toxins**, v. 14, n. 11, 1 nov. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36356016/>>. Acesso em: 21 abr. 2024.

FERRAZ, K. C.; SOUSA-SANTOS, O.; NETO-NEVES, E. M.; RIZZI, E.; MUNIZ, J. J.; GERLACH, R. F.; TANUS-SANTOS, J. E. Recombinant human matrix metalloproteinase-2 impairs cardiovascular β -adrenergic responses. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 112, n. 2, p. 103–109, fev. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22913757/>>. Acesso em: 6 maio. 2024.

FRANCIS STUART, S. D.; DE JESUS, N. M.; LINDSEY, M. L.; RIPPLINGER, C. M. The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 91, p. 114–122, 1 fev. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26739214/>>. Acesso em: 29 jun. 2024.

GAO, L.; WANG, W.; LI, Y. L.; SCHULTZ, H. D.; LIU, D.; CORNISH, K. G.; ZUCKER, I. H. Superoxide mediates sympathoexcitation in heart failure: Roles of angiotensin II and NAD(P)H oxidase. **Circulation Research**, v. 95, n. 9, p. 937–944, 29 out. 2004. Disponível em: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.RES.0000146676.04359.64>>. Acesso em: 5 set. 2024.

GONÇALVES, A. N.; MESCHIARI, C. A.; STETLER-STEVENSON, W. G.; NONATO, M. C.; ALVES, C. P.; ESPREAFICO, E. M.; GERLACH, R. F. Expression of soluble and functional full-length human matrix metalloproteinase-2 in Escherichia coli. **Journal of biotechnology**, v. 157, n. 1, p. 20–24, jan. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22001844/>>. Acesso em: 10 jun. 2024.

GRIEVE, D. J.; BYRNE, J. A.; SIVA, A.; LAYLAND, J.; JOHAR, S.; CAVE, A. C.; SHAH, A. M. Involvement of the nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate oxidase isoform Nox2 in cardiac contractile dysfunction occurring in response to pressure overload. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 47, n. 4, p. 817–826, 21 fev. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16487851/>>. Acesso em: 29 jul. 2024.

GROTE, K.; FLACH, I.; LUCHTEFELD, M.; AKIN, E.; HOLLAND, S. M.; DREXLER, H.; SCHIEFFER, B. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. **Circulation research**, v. 92, n. 11, 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12750313/>>. Acesso em: 23 jun. 2024.

GULATI, A.; JABBOUR, A.; ISMAIL, T. F.; GUHA, K.; KHWAJA, J.; RAZA, S.; MORARJI, K.; BROWN, T. D. H.; ISMAIL, N. A.; DWECK, M. R.; DI PIETRO, E.; ROUGHTON, M.; WAGE, R.; DARYANI, Y.; O'HANLON, R.; SHEPPARD, M. N.; ALPENDURADA, F.; LYON, A. R.; COOK, S. A.; COWIE, M. R.; ASSOMULL, R. G.; PENNELL, D. J.; PRASAD, S. K. Association of fibrosis with mortality and sudden cardiac death in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. **JAMA**, v. 309, n. 9, p. 896–908, 6 mar. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23462786/>>. Acesso em: 3 maio. 2024.

HEUSCH, P.; AKER, S.; BOENGLER, K.; DEINDL, E.; VAN DE SAND, A.; KLEIN, K.; RASSAF, T.; KONIETZKA, I.; SEWELL, A.; MENAZZA, S.; CANTON, M.;

HEUSCH, G.; DI LISA, F.; SCHULZ, R. Increased inducible nitric oxide synthase and arginase II expression in heart failure: no net nitrite/nitrate production and protein S-nitrosylation. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 299, n. 2, ago. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20511413/>>. Acesso em: 29 jul. 2024.

INAMDAR, A. A.; INAMDAR, A. C. Heart failure: Diagnosis, management and utilization. **Journal of Clinical Medicine**, v. 5, n. 7, 1 jul. 2016.

ITOH, Y.; TAKAMURA, A.; ITO, N.; MARU, Y.; SATO, H.; SUENAGA, N.; AOKI, T.; SEIKI, M. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. **The EMBO journal**, v. 20, n. 17, p. 4782–4793, 3 set. 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11532942/>>. Acesso em: 16 jun. 2024.

JANSEN, H. J.; MOGHATAE, M.; MACKASEY, M.; RAFFERTY, S. A.; BOGACHEV, O.; SAPP, J. L.; HOWLETT, S. E.; ROSE, R. A. Atrial structure, function and arrhythmogenesis in aged and frail mice. **Scientific Reports** 2017 7:1, v. 7, n. 1, p. 1–17, 14 mar. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep44336>>. Acesso em: 1 set. 2024.

JOHANSSON, L. H.; HÅKAN BORG, L. A. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. **Analytical biochemistry**, v. 174, n. 1, p. 331–336, 1988. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3064653/>>. Acesso em: 11 abr. 2024.

JOHAR, S.; CAVE, A. C.; NARAYANAPANICKER, A.; GRIEVE, D. J.; SHAH, A. M.; JOHAR, S.; CAVE, A. C.; NARAYANAPANICKER, A.; GRIEVE, D. J.; SHAH, A. M. Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, n. 9, p. 1546–1548, jul. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16720735/>>. Acesso em: 29 jul. 2024.

KAYAMA, Y.; RAAZ, U.; JAGGER, A.; ADAM, M.; SCHELLINGER, I. N.; SAKAMOTO, M.; SUZUKI, H.; TOYAMA, K.; SPIN, J. M.; TSAO, P. S. Diabetic Cardiovascular Disease Induced by Oxidative Stress. **International Journal of**

Molecular Sciences 2015, Vol. 16, Pages 25234-25263, v. 16, n. 10, p. 25234–25263, 23 out. 2015. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/16/10/25234/htm>>. Acesso em: 10 jul. 2024.

KIM, B. J.; HUR, J. W.; PARK, J. S.; KIM, J. H.; KWON, T. H.; PARK, Y. K.; MOON, H. J. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human ligamentum flavum cells treated with tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β . **Journal of neurosurgery. Spine**, v. 24, n. 3, p. 428–435, 1 mar. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26565765/>>. Acesso em: 16 jun. 2024.

KINKADE, K.; STREETER, J.; MILLER, F. J. Inhibition of NADPH Oxidase by Apocynin Attenuates Progression of Atherosclerosis. **International Journal of Molecular Sciences 2013, Vol. 14, Pages 17017-17028**, v. 14, n. 8, p. 17017–17028, 19 ago. 2013. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/14/8/17017/htm>>. Acesso em: 2 ago. 2024.

KLEINER, D. E.; STETLERSTEVENSON, W. G. Quantitative Zymography: Detection of Picogram Quantities of Gelatinases. **Analytical Biochemistry**, v. 218, n. 2, p. 325–329, 1 maio 1994. . Acesso em: 16 fev. 2024.

KOHNS, E. C.; JACOBS, W.; KIM, Y. S.; ALESSANDRO, R.; STETLER-STEVENSON, W. G.; LIOTTA, L. A. Calcium Influx Modulates Expression of Matrix Metalloproteinase-2 (72-kDa Type IV Collagenase, Gelatinase A)*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 34, p. 21505–21511, 1994. . Acesso em: 13 ago. 2024.

LEONE, A.; MONCADA, S.; VALLANCE, P.; CALVER, A.; COLLIER, J. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. **Lancet (London, England)**, v. 339, n. 8793, p. 572–575, 7 mar. 1992. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1347093/>>. Acesso em: 11 abr. 2024.

LI, J.; ZHU, H.; SHEN, E.; WAN, L.; ARNOLD, J. M. O.; PENG, T. Deficiency of rac1 blocks NADPH oxidase activation, inhibits endoplasmic reticulum stress, and reduces myocardial remodeling in a mouse model of type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 59, n. 8, p. 2033–2042, ago. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20522592/>>. Acesso em: 29 jul. 2024.

LI, Y. Q.; LI, X. B.; GUO, S. J.; CHU, S. L.; GAO, P. J.; ZHU, D. L.; NIU, W. Q.; JIA, N. Apocynin attenuates oxidative stress and cardiac fibrosis in angiotensin II-induced cardiac diastolic dysfunction in mice. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 3, p. 352–359, mar. 2013.

LIU, J. J.; LU, Y.; PING, N. N.; LI, X.; LIN, Y. X.; LI, C. F. Apocynin ameliorates pressure overload-induced cardiac remodeling by inhibiting oxidative stress and apoptosis. **Physiological research**, v. 66, n. 5, p. 741–752, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27782741/>>. Acesso em: 4 nov. 2023.

LIU, Y.; HUANG, H.; XIA, W.; TANG, Y.; LI, H.; HUANG, C. NADPH oxidase inhibition ameliorates cardiac dysfunction in rabbits with heart failure. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 343, n. 1–2, p. 143–153, out. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20567884/>>. Acesso em: 5 nov. 2023.

MAIER, C. M.; CHAN, P. H. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. **The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 8, n. 4, p. 323–334, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12194501/>>. Acesso em: 11 abr. 2024.

MARTIN, J.; STEADMAN, R.; KNOWLDEN, J.; WILLIAMS, J.; DAVIES, M. Differential regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human glomerular epithelial cells in vitro. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 9, n. 9, p. 1629–1637, 1998. . Acesso em: 12 ago. 2024.

MASSARE, J.; BERRY, J. M.; LUO, X.; ROB, F.; JOHNSTONE, J. L.; SHELTON, J. M.; BASSEL-DUBY, R.; HILL, J. A.; NASEEM, R. H. Diminished Cardiac Fibrosis in Heart Failure is Associated with Altered Ventricular Arrhythmia Phenotype. **Journal of cardiovascular electrophysiology**, v. 21, n. 9, p. 1031, set. 2010. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3703442/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20567884/)>. Acesso em: 13 ago. 2024.

MCCLOSKEY, D. T.; TURCATO, S.; WANG, G. Y.; TURNBULL, L.; ZHU, B. Q.; BAMBINO, T.; NGUYEN, A. P.; LOVETT, D. H.; NISSENSON, R. A.; KARLINER, J. S.; BAKER, A. J. Expression of a Gi-coupled receptor in the heart causes impaired Ca²⁺ handling, myofilament injury, and dilated cardiomyopathy. **American Journal of**

Physiology - Heart and Circulatory Physiology, v. 294, n. 1, p. H205, jan. 2008.
Disponível em: </pmc/articles/PMC3372085/>. Acesso em: 12 ago. 2024.

MCDONAGH, T. A.; METRA, M.; ADAMO, M.; BAUMBACH, A.; BÖHM, M.; BURRI, H.; ČELUTKIENE, J.; CHIONCEL, O.; CLELAND, J. G. F.; COATS, A. J. S.; CRESPO-LEIRO, M. G.; FARMAKIS, D.; GARDNER, R. S.; GILARD, M.; HEYMANS, S.; HOES, A. W.; JAARSMA, T.; JANKOWSKA, E. A.; LAINSCAK, M.; LAM, C. S. P.; LYON, A. R.; MCMURRAY, J. J. V.; MEBAZAA, A.; MINDHAM, R.; MUNERETTO, C.; PIEPOLI, M. F.; PRICE, S.; ROSANO, G. M. C.; RUSCHITZKA, F.; SKIBELUND, A. K.; DE BOER, R. A.; SCHULZE, P. C.; ABDELHAMID, M.; ABOYANS, V.; ADAMOPOULOS, S.; ANKER, S. D.; ARBELO, E.; ASTEGGIANO, R.; BAUERSACHS, J.; BAYES-GENIS, A.; BORGER, M. A.; BUDTS, W.; CIKES, M.; DAMMAN, K.; DELGADO, V.; DENDALE, P.; DILAVERIS, P.; DREXEL, H.; EZEKOWITZ, J.; FALK, V.; FAUCHIER, L.; FILIPPATOS, G.; FRASER, A.; FREY, N.; GALE, C. P.; GUSTAFSSON, F.; HARRIS, J.; IUNG, B.; JANSSENS, S.; JESSUP, M.; KONRADI, A.; KOTECHEA, D.; LAMBRINOU, E.; LANCELOTI, P.; LANDMESSER, U.; LECLERCQ, C.; LEWIS, B. S.; LEYVA, F.; LINHART, A.; LØCHEN, M. L.; LUND, L. H.; MANCINI, D.; MASIP, J.; MILICIC, D.; MUELLER, C.; NEF, H.; NIELSEN, J. C.; NEUBECK, L.; NOUTSIAS, M.; PETERSEN, S. E.; PETRONIO, A. S.; PONIKOWSKI, P.; PRESCOTT, E.; RAKISHEVA, A.; RICHTER, D.; SCHLYAKHTO, E.; SEFEROVIC, P.; SENNI, M.; SITGES, M.; SOUSA-UVA, M.; TOCCHETTI, C. G.; TOUYZ, R.; TSCHOEPE, C.; WALTENBERGER, J.; KRIM, M.; HAYRAPETYAN, H.; MOERTL, D.; MUSTAFAYEV, I.; KURLIANSKAYA, A.; DEPAUW, M.; KUŠLJUGIĆ, Z.; GATZOV, P.; AGATHANGELOU, P.; MELENOVSKÝ, V.; LØGSTRUP, B. B.; MOSTAFA, A. M.; UUETO, T.; LASSUS, J.; LOGEART, D.; KIPIANI, Z.; CHRYSOHOOU, C.; SEPP, R.; INGIMARSDÓTTIR, I. J.; O'NEILL, J.; GOTSMAN, I.; IACOVIELLO, M.; BAJRAKTARI, G.; LUNEGOVA, O.; KAMZOLA, G.; MASSIH, T. A.; BENLAMIN, H.; ŽALIADUONYTE, D.; NOPPE, S.; MOORE, A.; VATAMAN, E.; BOSKOVIC, A.; BENNIS, A.; MANINTVELD, O. C.; KOSTOVSKA, E. S.; GULATI, G.; STRABURZYŃSKA-MIGAJ, E.; SILVA-CARDOSO, J.; RIMBAŞ, R. C.; LOPATIN, Y.; FOSCOLI, M.; STOJKOVIC, S.; GONCALVESOVA, E.; FRAS, Z.; SEGOVIA, J.; LINDMARK, K.; MAEDER, M. T.; BSATA, W.; ABID, L.; ALTAY, H.; VORONKOV, L.; DAVIES, C.; ABDULLAEV, T.; BAIGENT, C. N.; ANTONIOU, S.; COLLET, J. P.; HALVORSEN, S.; KOSKINAS, K. C. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and

treatment of acute and chronic heart failure. **European heart journal**, v. 42, n. 36, p. 3599–3726, 21 set. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34447992/>>. Acesso em: 4 nov. 2023.

MOHAMMAD, A.; BABIKER, F.; AL-BADER, M. Effects of Apocynin, a NADPH Oxidase Inhibitor, in the Protection of the Heart from Ischemia/Reperfusion Injury. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 4, 1 abr. 2023.

MORGUNOVA, E.; TUUTILA, A.; BERGMANN, U.; ISUPOV, M.; LINDQVIST, Y.; SCHNEIDER, G.; TRYGGVASON, K. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. **Science (New York, N.Y.)**, v. 284, n. 5420, p. 1667–1670, 4 jun. 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10356396/>>. Acesso em: 5 nov. 2023.

MURDOCH, C. E.; ZHANG, M.; CAVE, A. C.; SHAH, A. M. NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. **Cardiovascular research**, v. 71, n. 2, p. 208–215, 15 jul. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16631149/>>. Acesso em: 5 set. 2024.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, v. 69, n. 3, p. 562–573, 15 fev. 2006. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.002>>. Acesso em: 1 nov. 2023.

NGUYEN, M.; ARKELL, J.; JACKSON, C. J. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 33, n. 10, p. 960–970, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11470230/>>. Acesso em: 1 set. 2024.

NILSSON, L.; HALLÉN, J.; ATAR, D.; JONASSON, L.; SWAHN, E. Early measurements of plasma matrix metalloproteinase-2 predict infarct size and ventricular dysfunction in ST-elevation myocardial infarction. **Heart (British Cardiac Society)**, v. 98, n. 1, p. 31–36, jan. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21727201/>>. Acesso em: 19 jun. 2024.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbituric acid. 1978. . Acesso em: 11 abr. 2024.

OHTA, Y.; KINUGAWA, S.; MATSUSHIMA, S.; ONO, T.; SOBIRIN, M. A.; INOUE, N.; YOKOTA, T.; HIRABAYASHI, K.; TSUTSUI, H. Oxidative stress impairs insulin signal in skeletal muscle and causes insulin resistance in postinfarct heart failure. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 300, n. 5, maio 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21335475/>>. Acesso em: 29 jul. 2024.

PANDAY, A.; SAHOO, M. K.; OSORIO, D.; BATRA, S. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 12, n. 1, p. 5, 8 jan. 2015. Disponível em: <[pmc/articles/PMC4654378/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25444448/)>. Acesso em: 29 jun. 2024.

PRADO, A. F.; PERNOMIAN, L.; AZEVEDO, A.; COSTA, R. A. P.; RIZZI, E.; RAMOS, J.; PAES LEME, A. F.; BENDHACK, L. M.; TANUS-SANTOS, J. E.; GERLACH, R. F. Matrix metalloproteinase-2-induced epidermal growth factor receptor transactivation impairs redox balance in vascular smooth muscle cells and facilitates vascular contraction. **Redox Biology**, v. 18, p. 181–190, 1 set. 2018a. . Acesso em: 11 abr. 2024.

PRADO, A. F.; PERNOMIAN, L.; AZEVEDO, A.; COSTA, R. A. P.; RIZZI, E.; RAMOS, J.; PAES LEME, A. F.; BENDHACK, L. M.; TANUS-SANTOS, J. E.; GERLACH, R. F. Matrix metalloproteinase-2-induced epidermal growth factor receptor transactivation impairs redox balance in vascular smooth muscle cells and facilitates vascular contraction. **Redox biology**, v. 18, p. 181–190, 1 set. 2018b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30029165/>>. Acesso em: 11 abr. 2024.

RA, H. J.; PARKS, W. C. Control of Matrix Metalloproteinase Catalytic Activity. **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 26, n. 8, p. 587, out. 2007. Disponível em: <[pmc/articles/PMC2246078/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17884448/)>. Acesso em: 16 jun. 2024.

RASTOGI, R.; GENG, X.; LI, F.; DING, Y. NOX Activation by Subunit Interaction and Underlying Mechanisms in Disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, 10 jan. 2016. Disponível em: <[pmc/articles/PMC5222855/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26522855/)>. Acesso em: 16 jul. 2024.

REICHELT, P.; SCHWARZ, C.; DONZEAU, M. Single step protocol to purify recombinant proteins with low endotoxin contents. **Protein expression and purification**, v. 46, n. 2, p. 483–488, abr. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16290005/>>. Acesso em: 10 jun. 2024.

RODRIGUES, K. E.; AZEVEDO, A.; GONÇALVES, P. R.; PONTES, M. H. B.; ALVES, G. M.; OLIVEIRA, R. R.; AMARANTE, C. B.; ISSA, J. P. M.; GERLACH, R. F.; PRADO, A. F. Doxycycline Decreases Atherosclerotic Lesions in the Aorta of ApoE^{-/-} and Ovariectomized Mice with Correlation to Reduced MMP-2 Activity. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 5, 1 mar. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35269673/>>. Acesso em: 11 abr. 2024.

ROSA, C. M.; GIMENES, R.; CAMPOS, D. H. S.; GUIRADO, G. N.; GIMENES, C.; FERNANDES, A. A. H.; CICOGNA, A. C.; QUEIROZ, R. M.; FALCÃO-PIRES, I.; MIRANDA-SILVA, D.; RODRIGUES, P.; LAURINDO, F. R.; FERNANDES, D. C.; CORREA, C. R.; OKOSHI, M. P.; OKOSHI, K. Apocynin influence on oxidative stress and cardiac remodeling of spontaneously hypertensive rats with diabetes mellitus. **Cardiovascular Diabetology**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 1 set. 2016. Disponível em: <<https://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12933-016-0442-1>>. Acesso em: 29 jul. 2024.

SALEEM, N.; PRASAD, A.; GOSWAMI, S. K. Apocynin prevents isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in rat. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 445, n. 1–2, p. 79–88, 1 ago. 2018a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29256115/>>. Acesso em: 29 jul. 2024.

SALEEM, N.; PRASAD, A.; GOSWAMI, S. K. Apocynin prevents isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in rat. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 445, n. 1–2, p. 79–88, 1 ago. 2018b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29256115/>>. Acesso em: 29 jul. 2024.

SAVARESE, G.; LUND, L. H. Global Public Health Burden of Heart Failure. **Cardiac failure review**, v. 3, n. 1, p. 7, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28785469/>>. Acesso em: 4 nov. 2023.

SAVLA, S. R.; LADDHA, A. P.; KULKARNI, Y. A. **Pharmacology of apocynin: a natural acetophenone Drug Metabolism Reviews** Taylor and Francis Ltd., 2021.

SAWICKI, G.; LEON, H.; SAWICKA, J.; SARIAHMETOGLU, M.; SCHULZE, C. J.; SCOTT, P. G.; SZCZESNA-CORDARY, D.; SCHULZ, R. Degradation of myosin light chain in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion injury: a new intracellular target for matrix metalloproteinase-2. **Circulation**, v. 112, n. 4, p. 544–552, 26 jul. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16027249/>>. Acesso em: 17 jul. 2024.

SCHLÜTER, T.; STEINBACH, A. C.; STEFFEN, A.; RETTIG, R.; GRISK, O. Apocynin-induced vasodilation involves Rho kinase inhibition but not NADPH oxidase inhibition. **Cardiovascular Research**, v. 80, n. 2, p. 271–279, nov. 2008.

SELEMIDIS, S.; SOBEY, C. G.; WINGLER, K.; SCHMIDT, H. H. H. W.; DRUMMOND, G. R. NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. **Pharmacology & therapeutics**, v. 120, n. 3, p. 254–291, dez. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18804121/>>. Acesso em: 16 jul. 2024.

SELVETELLA, G.; HIRSCH, E.; NOTTE, A.; TARONE, G.; LEMBO, G. Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: Points of convergence and divergence. **Cardiovascular Research**, v. 63, n. 3, p. 373–380, 15 ago. 2004. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.04.031>>. Acesso em: 8 jul. 2024.

SHAPIRO, S.; KHODALEV, O.; BITTERMAN, H.; AUSLENDER, R.; LAHAT, N. Different activation forms of MMP-2 oppositely affect the fate of endothelial cells. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 298, n. 4, abr. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20071690/>>. Acesso em: 1 set. 2024.

SHIRAKABE, A.; ASAI, K.; HATA, N.; YOKOYAMA, S.; SHINADA, T.; KOBAYASHI, N.; TOMITA, K.; TSURUMI, M.; MATSUSHITA, M.; MIZUNO, K. Immediate administration of atorvastatin decreased the serum MMP-2 level and improved the prognosis for acute heart failure. **Journal of cardiology**, v. 59, n. 3, p. 374–382, maio 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22402418/>>. Acesso em: 19 jun. 2024.

SIMONS, J. M.; 'T HART, B. A.; IP VAI CHING, T. R. A. M.; VAN DIJK, H.; LABADIE, R. P. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst

agonists by activated human neutrophils. **Free radical biology & medicine**, v. 8, n. 3, p. 251–258, 1990. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2160411/>>. Acesso em: 12 ago. 2024.

STEFANSKA, J.; PAWLICZAK, R. Apocynin: molecular aptitudes. **Mediators of inflammation**, v. 2008, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19096513/>>. Acesso em: 12 ago. 2024.

STOLK, J.; HILTERMANN, T. J.; DIJKMAN, J. H.; VERHOEVEN, A. J. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 11, n. 1, p. 95–102, 1994. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8018341/>>. Acesso em: 16 jul. 2024.

SUNG, M. M.; SCHULZ, C. G.; WANG, W.; SAWICKI, G.; BAUTISTA-LÓPEZ, N. L.; SCHULZ, R. Matrix metalloproteinase-2 degrades the cytoskeletal protein alpha-actinin in peroxynitrite mediated myocardial injury. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 43, n. 4, p. 429–436, out. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17854826/>>. Acesso em: 16 jun. 2024.

TÄGER, T.; WIEBALCK, C.; FRÖHLICH, H.; CORLETTTO, A.; KATUS, H. A.; FRANKENSTEIN, L. Biological variation of extracellular matrix biomarkers in patients with stable chronic heart failure. **Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society**, v. 106, n. 12, p. 974–985, 1 dez. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28779229/>>. Acesso em: 19 jun. 2024.

TALLANT, C.; MARRERO, A.; GOMIS-RÜTH, F. X. Matrix metalloproteinases: Fold and function of their catalytic domains. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 1, p. 20–28, jan. 2010. . Acesso em: 16 jun. 2024.

TANAKA, Y.; NAGAI, M.; DATE, T.; OKADA, T.; ABE, Y.; SEKI, S.; TANIGUCHI, M.; TANIGUCHI, I.; MOCHIZUKI, S. Effects of Bradykinin on Cardiovascular Remodeling in Renovascular Hypertensive Rats. **Hypertension Research**, v. 27, n. 11, p. 865–875, nov. 2004. . Acesso em: 3 maio. 2024.

TIAN, N.; MOORE, R. S.; PHILLIPS, W. E.; LIN, L.; BRADDY, S.; PRYOR, J. S.; STOCKSTILL, R. L.; HUGHSON, M. D.; MANNING, R. D. NADPH oxidase

contributes to renal damage and dysfunction in Dahl salt-sensitive hypertension. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 295, n. 6, dez. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18922960/>>. Acesso em: 28 ago. 2024.

TOMASONI, D.; ADAMO, M.; LOMBARDI, C. M.; METRA, M. Highlights in heart failure. **ESC heart failure**, v. 6, n. 6, p. 1105–1127, 1 dez. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31997538/>>. Acesso em: 4 nov. 2023.

TSAO, C. W.; ADAY, A. W.; ALMARZOOQ, Z. I.; ANDERSON, C. A. M.; ARORA, P.; AVERY, C. L.; BAKER-SMITH, C. M.; BEATON, A. Z.; BOEHME, A. K.; BUXTON, A. E.; COMMODORE-MENSAH, Y.; ELKIND, M. S. V.; EVENSON, K. R.; EZE-NLIAM, C.; FUGAR, S.; GENEROSO, G.; HEARD, D. G.; HIREMATH, S.; HO, J. E.; KALANI, R.; KAZI, D. S.; KO, D.; LEVINE, D. A.; LIU, J.; MA, J.; MAGNANI, J. W.; MICHOS, E. D.; MUSSOLINO, M. E.; NAVANEETHAN, S. D.; PARIKH, N. I.; POUDEL, R.; REZK-HANNA, M.; ROTH, G. A.; SHAH, N. S.; ST-ONGE, M. P.; THACKER, E. L.; VIRANI, S. S.; VOEKS, J. H.; WANG, N. Y.; WONG, N. D.; WONG, S. S.; YAFFE, K.; MARTIN, S. S. Heart Disease and Stroke Statistics-2023 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 147, n. 8, p. E93–E621, 21 fev. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36695182/>>. Acesso em: 4 nov. 2023.

VAN DER POL, A.; VAN GILST, W. H.; VOORS, A. A.; VAN DER MEER, P. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. **European Journal of Heart Failure**, v. 21, p. 425–435, 2019. . Acesso em: 5 set. 2024.

VAN WART, H. E.; BIRKEDAL-HANSEN, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 14, p. 5578–5582, 1990. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2164689/>>. Acesso em: 16 jun. 2024.

VERHEULE, S.; SCHOTTEN, U. Electrophysiological Consequences of Cardiac Fibrosis. **Cells**, v. 10, n. 11, 1 nov. 2021. Disponível em: <pmc/articles/PMC8625398/>. Acesso em: 12 ago. 2024.

VISSE, R.; NAGASE, H. **Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry** *Circulation Research* 2 maio 2003.

WANG, G. Y.; BERGMAN, M. R.; NGUYEN, A. P.; TURCATO, S.; SWIGART, P. M.; RODRIGO, M. C.; SIMPSON, P. C.; KARLINER, J. S.; LOVETT, D. H.; BAKER, A. J. Cardiac transgenic matrix metalloproteinase-2 expression directly induces impaired contractility. **Cardiovascular Research**, v. 69, n. 3, p. 688–696, 15 fev. 2006. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.08.023>>. Acesso em: 6 maio. 2024.

WANG, W.; SAWICKI, G.; SCHULZ, R. Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2. **Cardiovascular research**, v. 53, n. 1, p. 165–174, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11744025/>>. Acesso em: 5 set. 2024.

WANG, W.; SCHULZE, C. J.; SUAREZ-PINZON, W. L.; DYCK, J. R. B.; SAWICKI, G.; SCHULZ, R. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. **Circulation**, v. 106, n. 12, p. 1543–1549, 17 set. 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12234962/>>. Acesso em: 16 jun. 2024.

WANG, Z.; JUTTERMANN, R.; SOLOWAY, P. D. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 34, p. 26411–26415, 25 ago. 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10827175/>>. Acesso em: 16 jun. 2024.

WHEELER, C. R.; SALZMAN, J. A.; ELSAYED, N. M.; OMAJE, S. T.; KORTE, D. W. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. **Analytical biochemistry**, v. 184, n. 2, p. 193–199, 1 fev. 1990. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2327564/>>. Acesso em: 11 abr. 2024.

XIAO, Y.; LIU, Q.; HAN, H. C. Buckling Reduces eNOS Production and Stimulates Extracellular Matrix Remodeling in Arteries in Organ Culture. **Annals of biomedical engineering**, v. 44, n. 9, p. 2840–2850, 1 set. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26913855/>>. Acesso em: 16 jun. 2024.

XIMENES, V. F.; KANEGAE, M. P. P.; RISSATO, S. R.; GALHIANE, M. S. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 457, n. 2, p. 134–141, 15 jan. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17166480/>>. Acesso em: 28 ago. 2024.

YANCY, C. W.; JESSUP, M.; BOZKURT, B.; BUTLER, J.; CASEY, D. E.; DRAZNER, M. H.; FONAROW, G. C.; GERACI, S. A.; HORWICH, T.; JANUZZI, J. L.; JOHNSON, M. R.; KASPER, E. K.; LEVY, W. C.; MASOUDI, F. A.; MCBRIDE, P. E.; MCMURRAY, J. J. V.; MITCHELL, J. E.; PETERSON, P. N.; RIEGEL, B.; SAM, F.; STEVENSON, L. W.; TANG, W. H. W.; TSAI, E. J.; WILKOFF, B. L. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 16, 15 out. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23747642/>>. Acesso em: 4 nov. 2023.

YASMIN; WALLACE, S.; MCENIERY, C. M.; DAKHAM, Z.; PUSALKAR, P.; MAKI-PETAJA, K.; ASHBY, M. J.; COCKCROFT, J. R.; WILKINSON, I. B. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 2, p. 372–378, fev. 2005. . Acesso em: 5 nov. 2023.

YASSAGHI, Y.; JEDDI, S.; KASHFI, K.; GHASEMI, A. Myocardial infarct size is reduced by nitrite and nitrate administration: a systematic review and meta-analysis of animal studies. **EXCLI Journal**, v. 23, p. 18, 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37111111/>>. Acesso em: 29 jul. 2024.

YU, L.; QUINN, M. T.; CROSS, A. R.; DINAUER, M. C. Gp91(phox) is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 14, p. 7993–7998, 7 jul. 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9653128/>>. Acesso em: 16 jul. 2024.

ZANNAD, F.; DOUSSET, B.; ALLA, F. Treatment of Congestive Heart Failure. **Hypertension**, v. 38, n. 5, p. 1227–1232, 1 nov. 2001. Disponível em:

<<https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/hy1101.099484>>. Acesso em: 3 maio. 2024.

ZAVADZKAS, J. A.; PLYLER, R. A.; BOUGES, S.; KOVAL, C. N.; RIVERS, W. T.; BECK, C. U.; CHANG, E. I.; STROUD, R. E.; MUKHERJEE, R.; SPINALE, F. G. Cardiac-restricted overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer causes myocardial remodeling and dysfunction in aging mice. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 295, n. 4, p. H1394, out. 2008. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3774181/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17475219/)>. Acesso em: 6 maio. 2024.

ZHAO, S.; WU, H.; XIA, W.; CHEN, X.; ZHU, S.; ZHANG, S.; SHAO, Y.; MA, W.; YANG, D.; ZHANG, J. Periostin expression is upregulated and associated with myocardial fibrosis in human failing hearts. **Journal of cardiology**, v. 63, n. 5, p. 373–378, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24219836/>>. Acesso em: 19 jun. 2024.

ZHOU, H. Z.; MA, X.; GRAY, M. O.; ZHU, B. qing; NGUYEN, A. P.; BAKER, A. J.; SIMONIS, U.; CECCHINI, G.; LOVETT, D. H.; KARLINER, J. S. Transgenic MMP-2 expression induces latent cardiac mitochondrial dysfunction. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 358, n. 1, p. 189–195, 22 jun. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17475219/>>. Acesso em: 19 jun. 2024.

ZORZI, A.; MARRA, M. P.; RIGATO, I.; DE LAZZARI, M.; SUSANA, A.; NIERO, A.; PILICHOU, K.; MIGLIORE, F.; RIZZO, S.; GIORGI, B.; DE CONTI, G.; SARTO, P.; SERRATOSA, L.; PATRIZI, G.; DE MARIA, E.; PELLICCIA, A.; BASSO, C.; SCHIAVON, M.; BAUCE, B.; ILICETO, S.; THIENE, G.; CORRADO, D. Nonischemic Left Ventricular Scar as a Substrate of Life-Threatening Ventricular Arrhythmias and Sudden Cardiac Death in Competitive Athletes. **Circulation. Arrhythmia and Electrophysiology**, v. 9, n. 7, p. e004229, 1 jul. 2016. Disponível em: <[pmc/articles/PMC4956679/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26944444/)>. Acesso em: 3 maio. 2024.

8. Comprovante de aceite de artigo científico

Pharmacological Research 206 (2024) 107285



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacological Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yphrs



The role of matrix metalloproteinase-9 in cardiac remodeling and dysfunction and as a possible blood biomarker in heart failure

Keuri Eleutério Rodrigues^{a,b}, Maria Helena Barbosa Pontes^{b,c},
Manoel Benedito Sousa Cantão^{b,c}, Alejandro Ferraz Prado^{a,b,c,*}

^a Biodiversity and Biotechnology Post Graduate Program – BIONORTE, Institute of Biological Sciences, Federal University of Para, Belem, Brazil

^b Cardiovascular System Pharmacology and Toxicology Laboratory, Institute of Biological Sciences, Federal University of Para, Belem, Brazil

^c Pharmacology and Biochemistry Post Graduate Program – FARMABIO, Institute of Biological Sciences, Federal University of Para, Belem, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

MMP-9
Extracellular matrix
Fibrosis
Inflammation
Systolic and diastolic dysfunction

ABSTRACT

Heart failure (HF) is the leading cause of morbidity and mortality in cardiovascular diseases, being responsible for many hospitalizations annually. HF is considered a public health problem with significant economic and social impact, which makes searches essential for strategies that improve the ability to predict and diagnose HF. In this way, biomarkers can help in risk stratification for a more personalized approach to patients with HF. Preclinical and clinical evidence shows the participation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in the HF process. In this review, we will demonstrate the critical role that MMP-9 plays in cardiac remodeling and dysfunction. We will also show its importance as a blood biomarker in acute and chronic HF patients.

1. Introduction

Heart failure (HF) occurs due to structural, conduction and functional changes in the heart. Originating from an initial harmful event, which can be insidious, such as diabetes, atherosclerosis, hypertension, obesity, and Chagas disease, or abrupt, as in acute myocardial infarction [1].

HF affects approximately 64 million people worldwide. The prevalence of people living with HF varies geographically, with higher rates in Central Europe, the United States, the Middle East, and North Africa and lower rates in Southeast Asia. The incidence of HF is higher in the African American population compared to the white population [2,3]. The Framingham study, a cohort study developed with the support of Boston University, showed that the prevalence of men with HF increases with age, and the same correlation was found for women [4]. The aging of the population and the increase in life expectancy lead to an increase in the prevalence of HF. Despite improvements in the management of people living with HF through therapeutic innovations, hospitalization and death rates remain unacceptably high. Early detection of susceptible individuals is imperative since the symptoms present are non-specific in the early stages of the disease [2,5,6].

The progression of HF is associated with heart remodeling as a result

of maladaptive pathophysiological processes in the neurohumoral pathways, which will influence the survival processes of cardiomyocytes and fibroblasts, changes in fibroblast phenotypes and changes in components of the extracellular matrix (ECM) [7–11].

The cleavage and maintenance of ECM content is carried out by matrix metalloproteinases (MMPs), zinc-dependent endopeptidases, which play an essential role in many pathophysiological processes in cardiovascular diseases. The activity of MMPs is controlled at the transcriptional level and after the protein translation, mainly by the Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) [12,13].

Among the MMPs, MMP-9 is most investigated in HF due to its participation in regulating cardiac remodeling through the direct degradation of ECM proteins, activating pro-fibrotic pathways, and activating cytokines and chemokines [14]. Studies in patients with HF, which investigated the increase in circulating MMP-9 activity and myocardial remodeling, showed a positive correlation between these variables. MMP-9 levels can serve as a marker to stratify the risk of poor prognosis, as well as serve as an indicator of the efficiency of established therapy and implementation of specific therapeutic interventions [15, 16].

This review will address the classification, expressing cells, transcription process, translation, activation, proteolytic targets, and the

* Correspondence to: Federal University of Para, Institute of Biological Sciences, Cardiovascular System Pharmacology and Toxicology, Rua Augusto Corrêa - 01, Belém, PA 66075-110, Brazil.

E-mail address: alejandropf@ufpa.br (A.F. Prado).

<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2024.107285>

Received 26 February 2024; Received in revised form 15 June 2024; Accepted 23 June 2024

Available online 26 June 2024

1043-6618/© 2024 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).