

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**MICHELE MAZZARON DE CASTRO**

**Participação das metaloproteinases da matriz  
extracelular nas alterações vasculares associadas à  
hipertensão renovascular: efeitos de antioxidantes.**

**Ribeirão Preto – SP**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**MICHELE MAZZARON DE CASTRO**

**Participação das metaloproteinases da matriz extracelular nas alterações vasculares associadas à hipertensão renovascular: efeitos de antioxidantes.**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.**

**Área de concentração: Farmacologia**

**Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos**

**Ribeirão Preto – SP**

**2008**

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADO A FONTE.**

### **Ficha Catalográfica**

Castro, Michele Mazzaron

Participação das metaloproteinases da matriz extracelular nas alterações vasculares associadas à hipertensão renovascular: efeitos de antioxidantes. Ribeirão Preto, 2008

120p. Il. 30cm.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Metaloproteinases, 2. doxiciclina, 3. espécies reativas de oxigênio, 4. disfunção vascular, 5. hipertensão, 6. 2R-1C, 7. antioxidantes.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Michele Mazzaron de Castro

**Participação das metaloproteinases da matriz extracelular nas alterações vasculares associadas à hipertensão renovascular: efeitos de antioxidantes.**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.**

**Área de concentração: Farmacologia**

Aprovado em: \_\_\_\_\_

### **Banca Examinadora:**

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Instituição: FMRP – USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Maria Cristina de Oliveira Salgado

Instituição: FMRP – USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Marcos Antônio Rossi

Instituição: FMRP – USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Maria Cláudia Costa Irigoyen

Instituição: USP – INCOR

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Fernando Nobre

Instituição: FMRP – HC

Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho aos meus pais... que estiveram ao meu lado em todos os momentos... que fizeram dos meus sonhos seus próprios objetivos e de meus objetivos suas próprias lutas...!*

***Valeu a pena toda dedicação, lágrimas e sorrisos...***

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus a condução dos meus passos, da minha fala, ações e caminhos! *Por estar sempre à minha frente e acreditar em mim a cada dia.*

Ao amor e incentivo dos meus pais que sempre estiveram ao meu lado na busca pelos meus objetivos, que choraram com as minhas derrotas e sorriram com as minhas conquistas. Obrigada pela amizade e pela mão estendida nos momentos mais difíceis da minha vida. Sou eternamente grata ao amor de vocês.

Agradeço à minha querida irmã Carolina a paciência, a intensa e verdadeira amizade, o companheirismo e amor! Suas palavras de incentivo e gestos de carinho fizeram uma grande diferença em minha caminhada!

Ao meu namorado Marcelo por estar sempre ao meu lado, me oferecendo sua compreensão, carinho, confiança e amor. Muito obrigada pelos sábios conselhos, por respeitar as minhas ânsias e compartilhar os meus sonhos e vitórias. Agradeço a sua paciência ao longo destes anos e seu imenso incentivo, sempre.

Aos meus avôs que mesmo de longe sempre torceram por mim. Obrigada pela preocupação, apoio e carinho.

*Sou privilegiada por ter vocês na minha vida!*

Ao meu orientador e amigo, prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, por toda dedicação, incentivo e ensinamentos. Obrigada pela orientação, paciência, carinho e por acreditar em mim. Agradeço especialmente à profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach todo carinho, a abertura do seu laboratório e toda sua disposição em me ensinar. Grande parte do que sei hoje devo especialmente a você. Obrigada por

participarem do meu crescimento profissional e pessoal. Foi muito bom conviver com vocês todos estes anos.

Agradeço à profa. Dra. Lusiane M. Bendhack todo o carinho, a amizade e os ensinamentos. Obrigada pela dedicação e colaboração em meu trabalho desde o início.

Agradeço aos professores Dra. Maria Cristina de Oliveira Salgado, Dra. Maria Cláudia Costa Irigoyen, Dr. Marcos Rossi e Dr. Fernando Nobre a disponibilidade em fazer parte desta banca e a atenção concedida. Agradeço também à profa. Maria Cristina o agradável convívio durante estes anos e ao prof. Marcos Rossi a colaboração oferecida.

À minha amiga de “costas” e coração, Élen, que caminhou ao meu lado desde o início. Sorrimos juntas, sofremos juntas, dividimos sonhos e angústias juntas... caímos e crescemos juntas! Obrigada por poder contar com você sempre! Quero que saiba que está guardada em meu coração.

Agradeço aos meus amigos, Alisson, Carla, Evandro e Fernando Barbosa, o companherismo indispensável, a força e incentivo. Levo um carinho muito grande por cada um de vocês que, individualmente, ocuparam um lugar muito especial na minha vida.

Aos meus amigos do laboratório que tornaram minha caminhada muito mais agradável e prazerosa. À vocês: Ana Carol, Andrezza, Anna Laura, Andréa, Bárbara, Bruna, Carlos, Carolina, Caroline, César, Cibele, Débora, Diogo, Flávia, Gerson, Gisele, Glauce, Ingrid, Isabel, Jefferson, Jóice, Jonas, Juliana, Karla, Lisandra, Lívia, Marcelo Montenegro, Marcelo Luizon, Márcio, Rafael, Rosângela, Sabrina, Stéfany, Tatiane, Tiago, Valéria Gomes, Valéria Sandrim, Vanessa, Vânia e Vivian.



Agradeço ao Dimitrius e a Mayara a prontidão e disposição em me ajudar sempre que foi necessário. Obrigada pela amizade que surgiu em meio ao auxílio técnico. E ao Serginho, do biotério da Odontologia, a atenção, paciência, prestabilidade e camaradagem. Obrigada por sempre cuidar dos animais com dedicação, seriedade e responsabilidade.

Aos professores do departamento de farmacologia da FMRP – USP pela atenção e contribuição acadêmica.

Aos demais pós-graduandos e funcionários do departamento de farmacologia, agradeço o apoio quando necessário e o agradável convívio. Agradeço em especial ao Waldick Ramon e às queridas secretárias, Soninha e Fátima, o imenso carinho, ajuda profissional e pessoal e a dedicação. Vocês são muito especiais e essenciais na vida de um pós-graduando. Obrigada por tudo, de coração!

Agradeço à FAPESP o apoio financeiro que possibilitou a execução de todo este trabalho.

*“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido. Muito mais que na vitória propriamente dita”.*

**- Mahatma Ghandi -**

***Este trabalho é meu troféu... um troféu pelo imenso sonho conquistado...!***

## Sumário

### LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

### LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

<b>RESUMO</b> .....	<b>18</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>20</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
1– Hipertensão Arterial: um problema mundial de saúde pública .....	23
2- Participação das Espécies Reativas de Oxigênio na Hipertensão Arterial .....	24
2.1- Modelo Experimental Renovascular Dois Rins – Um Clipe (2R-1C) .....	24
2.2- Produção Fisiopatológica das EROs – Estresse Oxidativo e Hipertensão Arterial .....	25
3- Participação das Metaloproteinases (MMPs) na Hipertensão Arterial.....	29
3.1- Introdução às MMPs: Estrutura e Função .....	29
3.2- Importância da MMP 2 e 9 no remodelamento vascular associado à hipertensão .....	32
3.3- Mecanismos de ação da MMP-2 independentes da degradação vascular da MEC .....	35
4- Ativação da MMP-2 via estresse oxidativo .....	37
<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>39</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
<b>1-Considerações Gerais</b> .....	<b>41</b>
1.1- Hipertensão Arterial Induzida pela Técnica de Goldblatt .....	41
1.2- Grupos Experimentais.....	41
<b>2- Materiais</b> .....	<b>43</b>
2.1- Soluções utilizadas nos experimentos .....	43
2.2- Primers utilizados.....	46
2.3- Drogas administradas diretamente nos animais .....	46
2.4- Equipamentos utilizados nos experimentos .....	46

2.5- Programas de Aquisição de Dados .....	47
<b>3- Metodologia .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1- Parâmetros Hemodinâmicos .....</b>	<b>48</b>
3.1.1- Avaliação da Pressão Arterial e do Peso Corporal .....	48
3.1.2- Avaliação da Reatividade Vascular .....	48
<b>3.2- Parâmetros Estruturais .....</b>	<b>49</b>
3.2.1- Análise Morfológica da Aorta .....	49
<b>3.3- Parâmetros Bioquímicos e Moleculares .....</b>	<b>50</b>
3.3.1- Determinação das EROs Vascular e Sistêmica .....	50
3.3.1. A- <i>In situ</i> .....	50
3.3.1. B- Por citometria de fluxo.....	51
3.3.1. C- Quantificação da peroxidação lipídica (TBARS) .....	52
3.3.2- Zimografia em gel .....	52
3.3.2 A- Dosagem de Proteína pelo Método de Bradford .....	53
3.3.2 B- Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% .....	54
3.3.3- Zimografia <i>in situ</i> .....	54
3.3.4- Ensaio fluorimétrico para determinação da atividade gelatinolítica total .....	55
3.3.5- Método da Captura de Anticorpo para avaliar a atividade específica da MMP-2.....	56
3.3.6- Imunofluorescência e Imunohistoquímica .....	57
3.3.6 A- Imunofluorescência .....	57
3.3.6 B- Imunohistoquímica .....	57
3.3.7- Determinação da expressão gênica do RNAm por Real-Time RT-PCR.....	58
<b>3.4- Análise Estatística .....</b>	<b>59</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>60</b>
<b>Protocolo 1: Efeitos vasculares do tratamento de ratos 2R-1C com doxiciclina ...</b>	<b>60</b>
1- Efeito da doxiciclina sobre a pressão arterial e o peso corporal em ratos 2R-1C.....	60
2- Efeito da doxiciclina sobre a função endotelial em ratos 2R-1C .....	62
3- Efeito da doxiciclina sobre o remodelamento vascular em ratos 2R-1C .....	65

4- Efeito da doxiciclina sobre as concentrações vasculares da MMP-2 em ratos 2R-1C .....	71
5- Efeito da doxiciclina sobre a atividade gelatinolítica <i>in situ</i> em ratos 2R-1C .....	73
6- Efeito da doxiciclina sobre a atividade específica da MMP-2 em ratos 2R-1C ..	75
7- Efeito da doxiciclina sobre a expressão gênica do RNAm da MMP-2 e do TIMP-2 em ratos 2R-1C .....	76
8- Efeito da doxiciclina sobre a expressão da MMP-2, 9 e 14 em ratos 2R-1C .....	78
<b>Protocolo 2: Efeitos vasculares do tratamento de ratos 2R-1C com antioxidantes....</b>	<b>80</b>
1- Efeito dos Antioxidantes sobre pressão arterial e peso corporal em ratos 2R-1C .....	80
2- Efeito dos antioxidantes sobre função endotelial em ratos hipertensos 2R-1C ..	82
3- Efeito dos antioxidantes sobre o remodelamento vascular em ratos 2R-1C.....	84
4- Efeito dos antioxidantes sobre as concentrações vasculares e sistêmicas de EROs em ratos 2R-1C .....	86
5- Efeito dos antioxidantes sobre a atividade e expressão da MMP-2 em ratos 2R-1C .....	89
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>96</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>108</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>109</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>120</b>

## **Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos**

**2R-1C-** Dois rins um clipe

**Ach-** Acetilcolina

**ACTB-**  $\beta$ -actina

**Ae-** Área externa

**Ai-** Área interna

**AM-** Adrenomedulina

**ANOVA-** Análise de Variância

**APS-** Persulfato de Amônio

**AT<sub>1</sub>-** Receptores da angiotensina do subtipo II

**BH<sub>4</sub>-** Tetrahydrobiopterina

**Big-ET-1-** Big endotelina-1

**BSA-** Albumina sérica bovina

**CaCl<sub>2</sub>-** Cloreto de Cálcio

**cDNA-** Ácido desoxirribonucléico complementar

**CGRP-** Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

**CSA-** Área de secção transversal

**DAB-** 3-3' diaminobenzidina

**DEPC-** Dietilpirocarbonato

**DHE-** Dihidroetídeo

**DNA-** Ácido desoxirribonucléico

**Dq gelatin-** Substrato fluorescente para ensaios de atividade gelatinolítica

**ED-** Diâmetro externo

**E<sub>max</sub>-** Efeito máximo

**eNOS-** Sintase endotelial do óxido nítrico

**EPM-** Erro padrão da média

**EOH-** 2-hidroxietídeo

**EROs-** Espécies reativas de oxigênio

**ET-1-** Endotelina-1

**FAK-** Quinase de adesão focal

**g-** gramas

**GPX-** Glutathiona peroxidase

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-** Peróxido de hidrogênio

**HAS-** Hipertensão arterial sistêmica

**HE-** Hematoxilina e Eosina

**ID-** Diâmetro interno

**i.p.-** intra-peritoneal

**KCl-** Cloreto de potássio

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**- Hidrogenofosfato de potássio

**KDa**- Quilodalton

**Kg**- Quilograma

**L**- Litro

**L-NAME**- N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina

**M**- Molar

**μmol**- Micromol

**mL**- Mililitros

**mg**- Miligrama

**mmol**- Milimol

**mmHg**- Milímetros de mercúrio

**MDA**- Malondialdeído

**MEC**- Matriz extracelular

**Media**- média

**M/L**- Razão média/lúmen

**MMPs**- Metaloproteinases

**MT-MMPs**- Metaloproteinases de membrana

**N**- Número

**NaCl**- Cloreto de sódio

**NaHCO<sub>3</sub>**- Bicarbonato de sódio

**NaOH**- Hidróxido de sódio

**NADPH**- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

**NEM**- N-etilmaleimida

**nmol**- Nanomol

**NO**- Óxido nítrico

**NPS**- Nitroprussiato de sódio

**O<sub>2</sub>**- Oxigênio

**·O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - Ânion superóxido

**OCT**- Composto para congelar tecidos

**OH<sup>-</sup>** - Radical hidroxil

**OONO<sup>-</sup>** - Peroxinitrito

**P**- Pressão

**pb**- pares de base

**PBS**- Tampão salina fosfato

**pD<sub>2</sub>**- Logarítimo negativo da EC<sub>50</sub>

**PFA**- Paraformaldeído

**pH**- Potencial hidrogeniônico

**PCR**- Reação em cadeia da polimerase



**PMSF-** Fluoreto de fenilmetilsulfonil

**R-** Raio

**Real-Time RT-PCR-** Reação reversa em cadeia da polimerase em tempo real

**RNA<sub>m</sub>-** Ácido ribonucléico mensageiro

**RT-** Reação transversa

**SDS-** Dodecil sulfato de sódio

**SOD-** Superóxido dismutase

**Std-** Padrão interno

**T-** Tensão

**TBA-** Ácido tiobarbitúrico

**TBARS-** Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TBS-** Tampão Tris salina

**TEMED-** Tetrametiletilenodiamina

**TIMPs-** Inibidores endógenos das MMPs

**TN-C-** Tenascina-C

**TSP-1-** Trombospondina-1

## Lista de Ilustrações e Tabelas

### Figuras:

<b>Figura 1-</b> Esquema representativo da regulação vascular das EROs .....	28
<b>Figura 2-</b> Principais metaloproteinases e suas características estruturais.....	30
<b>Figura 3-</b> Ativação proteolítica e/ou não proteolítica das MMPs.....	31
<b>Figura 4-</b> Participação das MMPs nos processos de hipertrofia, migração e proliferação celular via degradação de proteínas da MEC.....	34
<b>Figura 5-</b> Ações exercidas pela MMP-2 sobre o tônus vascular.....	36
<b>Figura 6-</b> Efeito da doxíciclina sobre a pressão arterial e o peso corporal .....	61
<b>Figura 7-</b> Efeito da doxíciclina sobre o relaxamento vascular dependente e independente do endotélio .....	63
<b>Figura 8-</b> Efeito da doxíciclina sobre as alterações estruturais da aorta .....	66
<b>Figura 9-</b> Efeito da doxíciclina sobre a proliferação de células musculares lisas.....	68
<b>Figura 10-</b> Efeito da doxíciclina sobre a deposição vascular de colágeno.....	69
<b>Figura 11-</b> Efeito da doxíciclina sobre a deposição vascular de elastina .....	70
<b>Figura 12-</b> Efeito da doxíciclina sobre as concentrações vasculares das MMPs .....	72
<b>Figura 13-</b> Efeito da doxíciclina sobre a atividade gelatinolítica <i>in situ</i> .....	74
<b>Figura 14-</b> Efeito da doxíciclina sobre a atividade específica da MMP-2.....	75

<b>Figura 15-</b> Efeito da doxíciclina sobre a expressão gênica do RNAm da MMP-2 e do TIMP-2 .....	77
<b>Figura 16-</b> Efeito da doxíciclina sobre a expressão da MMP-2, 9 e 14 .....	78
<b>Figura 17-</b> Efeito dos antioxidantes sobre a pressão arterial e o peso corporal.....	81
<b>Figura 18-</b> Efeito dos antioxidantes sobre o relaxamento vascular dependente e independente do endotélio .....	83
<b>Figura 19-</b> Efeito dos antioxidantes sobre alterações estruturais da aorta .....	84
<b>Figura 20-</b> Efeito dos antioxidantes sobre as concentrações vasculares e sistêmicas das EROs.....	87
<b>Figura 21-</b> Efeito dos antioxidantes sobre as concentrações vasculares da MMP-2.....	90
<b>Figura 22-</b> Efeito dos antioxidantes sobre a atividade gelatinolítica total.....	92
<b>Figura 23-</b> Efeito dos antioxidantes sobre a expressão da MMP-2 e do TIMP-2.....	94

### **Tabelas:**

<b>Tabela 1-</b> Valores de $pD_2$ e $E_{max}$ relacionado ao relaxamento dependente e independente do endotélio .....	64
<b>Tabela 2-</b> Parâmetros estruturais da aorta referentes aos animais tratados com doxíciclina.....	67

## Resumo

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é considerada um grande problema de saúde pública no mundo, e está amplamente relacionada a significativas alterações morfológicas e funcionais no aparelho cardiovascular. Metaloproteinases (MMPs) são endopeptidases cálcio-dependente, contendo zinco, que apresentam um papel importante na disfunção endotelial e no remodelamento tecidual de várias doenças cardiovasculares, inclusive a hipertensão. Aumentos na atividade destas enzimas podem levar à degradação excessiva das proteínas da matriz extracelular (MEC), além de acentuar a migração de células musculares lisas e monócitos. Isto pode contribuir para as alterações estruturais observadas nos vasos sangüíneos durante a hipertensão. Neste contexto, estudos clínicos e em modelos animais de hipertensão mostraram um aumento significativo da expressão e atividade da MMP-2 (72-kDa gelatinase A) e MMP-9 (92-kDa gelatinase B), tanto no plasma quanto em tecidos cardíacos e vasculares. Interessantemente, estudos *in vitro* mostraram que o aumento da atividade destas MMPs pode estar relacionado diretamente ao estresse oxidativo gerado pela ativação de enzimas pro-oxidantes, tais como a NADPH oxidase vascular e a xantina oxidase. Neste contexto, o modelo experimental 2R-1C foi proposto para este estudo por apresentar concentrações elevadas de EROs associadas ao aumento da renina plasmática e angiotensina II. Estas ações, associadas a um aumento da pressão intra-luminal, podem ser muito importantes para ativação das MMPs, o que pode contribuir para as alterações vasculares observadas neste modelo de hipertensão. Desta maneira, os objetivos deste trabalho foram 1) verificar se aumentos na expressão e atividade destas MMPs podem contribuir para o aumento da pressão arterial e para as alterações vasculares observadas neste modelo. 2) verificar se aumentos nas concentrações das EROs

podem contribuir para esta maior ativação enzimática. Para isto, foi utilizada a doxíciclina, um inibidor inespecífico de MMPs, e diferentes tipos de antioxidantes. A atividade e expressão das MMPs foram avaliadas por zimografia em gel e *in situ*, pelo método de captura de anticorpo e imunohistoquímica. Já a expressão do RNAm da MMP-2 e do TIMP-2 foi analisada por Real Time RT-PCR. Os parâmetros funcionais e estruturais da aorta foram determinados por reatividade vascular e morfologia, respectivamente. Por fim, as concentrações vasculares de EROs foram analisadas usando o dihidroetídeo (DHE) *in situ* e por citometria de fluxo. O tratamento com a doxíciclina atenuou o aumento da pressão arterial nos animais 2R-1C ( $p < 0,01$ ) e preveniu a redução do relaxamento dependente do endotélio nestes animais. Além disso, a doxíciclina preveniu aumentos na espessura da camada média da aorta ( $p < 0,01$ ) e a deposição elevada de colágeno e elastina. Houve um aumento significativo da expressão e atividade da MMP-2 nas aortas destes animais hipertensos (todos,  $p < 0,05$ ) em paralelo a um aumento da razão da expressão do RNAm da MMP-2/TIMP-2 ( $p < 0,01$ ). Da mesma maneira, o tratamento com ambos os antioxidantes atenuou o aumento da pressão arterial nos animais 2R-1C (ambos,  $p < 0,05$ ) e preveniu a redução do relaxamento dependente do endotélio pela acetilcolina. O tempol, mas não o apocinin ( $p > 0,05$ ), também preveniu o remodelamento vascular hipertrófico observado nestes animais ( $p < 0,01$ ). Além disso, o tratamento com o tempol atenuou aumentos na atividade e expressão da MMP-2 (ambos,  $p < 0,05$ ) em paralelo à diminuição do estresse oxidativo ( $p < 0,05$ ). Estes resultados sugerem que 1) as MMPs podem contribuir para o aumento da pressão arterial e para as alterações vasculares observadas neste modelo experimental. 2) Aumentos nas concentrações de EROs podem estar diretamente relacionados com esta atividade aumentada da MMP-2.

## Abstract

Hypertension is a major health problem associated with structural and functional modifications of the vasculature. Recent studies indicated that a group of zinc-endopeptidases called matrix metalloproteinases (MMPs) play an important role in vascular dysfunction and tissue remodeling in many cardiovascular conditions including hypertension. Increased MMPs activation promotes excessive degradation of extracellular matrix components, vascular smooth muscle cell migration and proliferation, and monocyte invasion, thus contributing to hypertensive structural alterations. In fact, clinical and experimental studies have found increased expression and activity of MMP-2 (72-kDa gelatinase A) and MMP-9 (92-kDa gelatinase B) in plasma and vascular tissues of hypertensive patients and animal models of hypertension. Furthermore, recent studies suggest that MMPs-mediated vascular remodeling and dysfunction could result from increased oxidative stress. Increased concentrations of reactive oxygen species (ROS) have been consistently implicated as a major cause of the vascular changes associated with clinical and experimental hypertension. It has been shown that ROS enhance the expression and activity of MMPs, especially MMP-2, via xanthine oxidase, and via mechanical stretch-induced vascular NADPH oxidase. In addition, ROS-induced MMP-2 activation has been reported to play a role in many pathophysiological cardiovascular conditions. Two-kidney, one clip (2K-1C) hypertension is an animal model of renovascular hypertension associated with increased plasma renin activity and systemic/tissue angiotensin II levels, and thereby enhanced oxidative stress. These alterations, combined with the increased transmural pressure, are potent stimuli for the induction of MMPs expression and degrading activities, and may drive the vascular remodeling found in this model. So, we hypothesized that 1) increased

MMP-2 expression/activity would play a role in the vascular remodeling and dysfunction found in the 2K-1C hypertension model. And 2) MMP-mediated such vascular alterations could result from increased oxidative stress. To test these hypotheses, sham operated or 2K-1C hypertension rats were treated with doxycycline 30 mg/kg/day (a non-selective MMP inhibitor); and two antioxidants: tempol 18 mg/kg/day (a general ROS scavenger) and apocynin 25 mg/kg/day (a NADPH oxidase inhibitor). Systolic blood pressure was monitored weekly. After eight weeks of treatment, aortic rings were isolated to assess endothelium-dependent and independent relaxations. Quantitative morphometry of structural changes, collagen, and elastin contents in the aortic wall were studied in hematoxylin/eosin, Sirius Red, and Orceine stained aortic sections, respectively. Aortic and systemic ROS levels were measured by using dihydroethidine (DHE) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs), respectively. Aortic MMP-2 levels and activity were determined by gelatin and *in situ* zymography, antibody capture assay and immunohistochemistry. Aortic MMP-2/tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 mRNA levels was determined by Real Time RT-PCR. Doxycycline attenuated 2K-1C hypertension ( $p < 0.01$ ) and prevented the 35% reduction in endothelium-dependent vasorelaxation found in 2K-1C rats. Doxycycline prevented the increases in media thickness, and was associated with lower media/lumen and cross sectional areas (all  $p < 0.01$ ). Doxycycline also prevented excessive collagen and elastin deposition in the vascular wall. Increased MMP-2 and pro-MMP-2 levels and MMP-2 activity were found in the aortas of 2K-1C rats (all  $p < 0.05$ ). A 21-fold increase ( $p < 0.01$ ) in the ratio of MMP-2/TIMP-2 mRNA expression was found in the 2K-1C group, whereas this ratio remained unaltered in 2K-1C + doxy rats. Likewise, tempol and apocynin attenuated 2K-1C hypertension (both  $p < 0.05$ ) and prevented the reduction in

endothelium-dependent vasorelaxation. Tempol, but not apocynin ( $P>0.05$ ), also prevented the vascular remodeling found in 2K-1C rats (all  $p<0.01$ ). Tempol was more effective than apocynin in attenuating hypertension-induced increases in oxidative stress (both  $P<0.05$ ), MMP-2 levels, and MMP-2 activity in hypertensive rats (all  $P<0.05$ ). These results suggest that 1) MMP-2 plays a role in 2K-1C hypertension and its structural and functional vascular changes, which were attenuated by doxycycline. And 2) antioxidant approaches can attenuate the vascular dysfunction and remodeling during 2K-1C hypertension by decreasing MMP-2 upregulation.



## Introdução

### **1– Hipertensão Arterial: um problema mundial de saúde pública.**

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é considerada um grande problema de saúde pública no mundo. Ela acomete cerca de um bilhão de pessoas, sendo responsável por aproximadamente 7,1 milhões de mortes por ano (Chobanian et al., 2003a). Este elevado índice de mortalidade está relacionado, na maioria das vezes, ao desenvolvimento de outras doenças cardiovasculares, tais como, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência renal, entre outras (Chobanian et al., 2003b), representando cerca de 55% das várias causas de mortes no mundo. No Brasil, de acordo com dados epidemiológicos, a hipertensão atinge aproximadamente 43,9% da população urbana adulta (Freitas et al., 2001) e sua incidência aumenta proporcionalmente com a idade (Chobanian et al., 2003b). De forma geral, estes dados refletem a importância de se estudar fatores e/ou descobrir causas associadas à hipertensão, na tentativa de diminuir sua incidência e conseqüentemente a de outras doenças cardiovasculares relacionadas.

Como na maioria das doenças crônicas, a HAS envolve tanto componentes ambientais como hereditários, sendo classificada como uma doença poligênica e multifatorial, relacionada a significativas alterações morfológicas e funcionais no aparelho cardiovascular. Dentre vários fatores associados à hipertensão, o estresse oxidativo (Escobales and Crespo, 2005; Lassegue and Griending, 2004) e o aumento da atividade de algumas enzimas, como as metaloproteinases (Galis and Khatri, 2002; Raffetto and Khalil, 2008), podem estar amplamente relacionados a alterações cardiovasculares observadas nesta doença.

## **2- Participação das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) na Hipertensão Arterial.**

### **2.1- Modelo Experimental Renovascular Dois Rins – Um Clipe (2R-1C).**

O modelo experimental 2R-1C foi proposto para este estudo por apresentar concentrações elevadas de EROs associadas ao aumento da renina plasmática e, principalmente, da angiotensina II (Lerman et al., 2005). Este modelo, descrito primeiramente por Goldblatt, em 1934, foi caracterizado pela indução de uma estenose da artéria renal (por meio do clampeamento de uma destas artérias), e pela manutenção do rim contralateral intacto. A redução da perfusão arterial para o rim clampeado resulta em uma ativação significativa do sistema renina - angiotensina, promovendo desde disfunção endotelial e aumento da contratilidade vascular até retenção de sódio e água, e hipertrofia vascular e cardíaca (Griendling et al., 1996; Levy, 2005; Weir and Dzau, 1999; Welch, 2008). Estas ações, mediadas principalmente pela angiotensina II, podem contribuir significativamente para o aumento da pressão arterial observado neste modelo. Geralmente, este aumento das concentrações plasmáticas de renina e angiotensina II ocorre entre a primeira e a quinta semana após colocado o clipe renal, e estas concentrações podem diminuir progressivamente com o tempo. Entretanto, até a oitava semana após o clipe, mesmo com a diminuição da atividade renina, as ações cardiovasculares exercidas pela angiotensina II ainda continuam elevadas, contribuindo para este quadro hipertensivo (Martinez-Maldonado, 1991; Okamura, 1986; Sigmon and Beierwaltes, 1998). Vários mecanismos intrínsecos as ações da angiotensina, principalmente via atuação em receptores  $AT_1$ , podem contribuir para estas alterações cardiovasculares. O aumento da produção de EROs, por aumento da atividade de

algumas enzimas pro-oxidantes, é um destes principais mecanismos (Seshiah et al., 2002; Touyz, 2004a).

## **2.2- Produção Fisiopatológica das EROs – Estresse Oxidativo e Hipertensão Arterial.**

Conceitualmente, EROs são espécies reativas derivadas do metabolismo do oxigênio, que podem ser encontradas na maioria dos sistemas biológicos. Estas EROs, produzidas principalmente nas mitocôndrias, foram tradicionalmente consideradas produtos celulares prejudiciais, com potente dano lipídico, protéico e de DNA (Freeman and Crapo, 1982). Entretanto, sabe-se que em concentrações fisiológicas, estas espécies reativas são essenciais em alguns processos de sinalização e regulação intracelular, participando de mecanismos de transcrição gênica e síntese protéica (Griendling et al., 2000). Dentre várias EROs, as que apresentam maior relevância para estudos cardiovasculares são: o ânion superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o radical hidroxil ( $\text{OH}^-$ ) e o peroxinitrito ( $\text{OONO}^-$ ), formado a partir da reação do  $\cdot\text{O}_2^-$  com o óxido nítrico (NO) (Cai, 2005; Lassegue and Griendling, 2004; Zimmet and Hare, 2006). Como pode ser observado na figura 1, o  $\cdot\text{O}_2^-$ , que é o principal precursor da produção das outras EROs, pode ser sintetizado nos vasos sanguíneos pela ação de várias enzimas pro-oxidantes (Touyz and Schiffrin, 2004a). Dentre elas, a mais importante para o sistema vascular é a  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, que apresenta múltiplas subunidades essenciais para suas ações (por exemplo,  $\text{p}47^{\text{phox}}$  e  $\text{p}22^{\text{phox}}$ ) (Lassegue and RE, 2003; Touyz and Schiffrin, 2004b). Esta enzima é funcionalmente ativa no endotélio, na camada média e adventícia, tanto de vasos de condutância quanto de resistência (Rey and PJ, 2002; Touyz et al., 2002). Ela é extremamente similar, estrutural e funcionalmente, à enzima NADPH oxidase

encontrada em neutrófilos, que é ativada apenas durante processos inflamatórios. Entretanto, ao contrário desta, a NADPH oxidase vascular é constitutivamente ativa, e fisiologicamente, produz  $\cdot\text{O}_2^-$  de maneira lenta e progressiva (Touyz and Schiffrin, 2004a).

Estas concentrações fisiológicas de EROs também são reguladas por ação de enzimas antioxidantes, tais como, a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPX) e a catalase (Touyz and Schiffrin, 2004a) (Figura 1). Existem três tipos conhecidos de SOD, dependendo de sua localização celular: a SOD<sub>1</sub> ou citosólica, representada por Cu/Zn-SOD, a SOD<sub>2</sub> ou mitocondrial (Mn-SOD) e a SOD<sub>3</sub> ou extracelular (ecSOD). Todas são responsáveis pela remoção do  $\cdot\text{O}_2^-$  dos vasos e pela diminuição da formação do OONO<sup>-</sup>. Já a GPX e a catalase são as principais responsáveis pela remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, convertendo-o em água e oxigênio molecular (Touyz and Schiffrin, 2004a; Touyz, 2004a). Em concentrações fisiológicas, o  $\cdot\text{O}_2^-$  e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem atuar como moléculas sinalizadoras, participando da regulação da função endotelial e contração/relaxamento vascular.

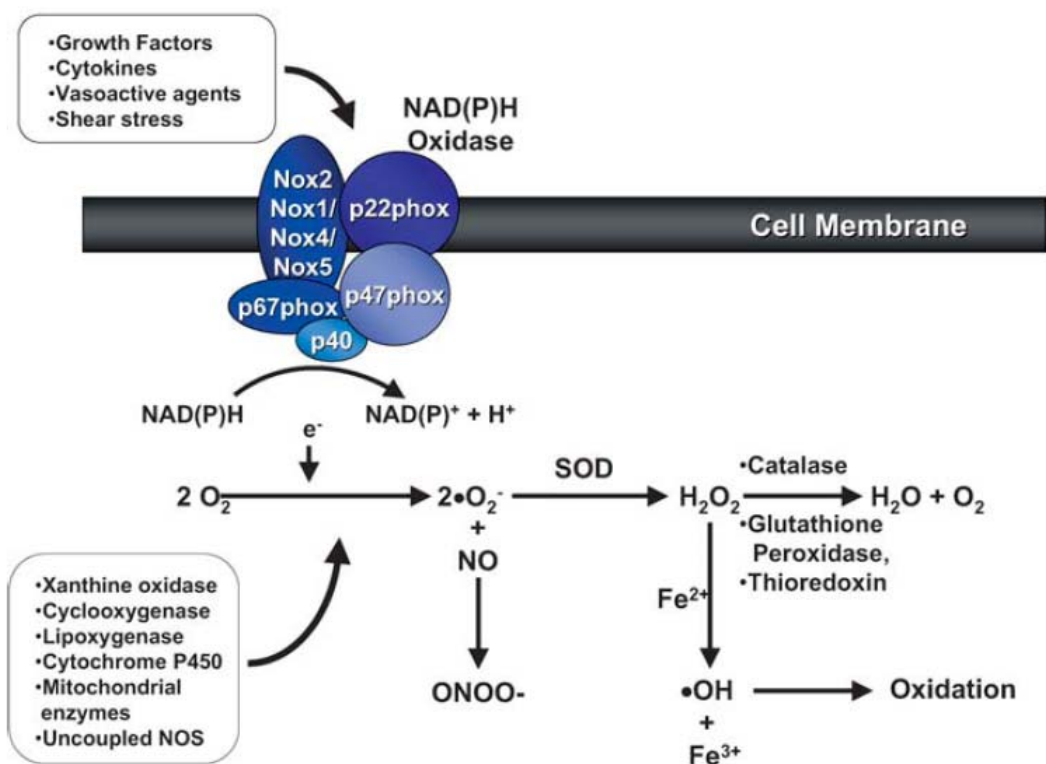
Entretanto, em algumas condições patológicas, como a hipertensão arterial, pode ocorrer um desequilíbrio entre a produção e a remoção destes agentes oxidantes do organismo, resultando em um aumento de suas concentrações e atividades. Este processo, conhecido como *estresse oxidativo*, pode estar relacionado com muitas das alterações cardiovasculares observadas em vários modelos animais de hipertensão (Griendling and FitzGerald, 2003; Touyz, 2004b). Dentre estas alterações pode-se destacar: a disfunção endotelial, o aumento da contratilidade vascular, a proliferação e hipertrofia de células musculares lisas, a peroxidação lipídica e o aumento da atividade de algumas metaloproteinases (principais responsáveis pelo processo de remodelamento tecidual) (Ferroni et al., 2006;

Fortuno et al., 2005; Rao and Berk, 1992). Por exemplo, estudos realizados em animais hipertensos 2R-1C mostraram que o estresse oxidativo, gerado principalmente pelo aumento da ativação do sistema renina-angiotensina, exerce um papel fundamental na disfunção endotelial observada nestes animais. Este efeito pode estar relacionado à diminuição da biodisponibilidade do NO, que se liga ao  $\cdot\text{O}_2^-$  em excesso, formando o OONO-, que é extremamente prejudicial (Dobrian et al., 2001; Lerman et al., 2001).

Este aumento das concentrações de EROs na hipertensão pode estar relacionado, principalmente, ao aumento da atividade da NADPH oxidase vascular (Cai et al., 2003; Keaney, 2005; Zalba et al., 2001). Embora seja uma enzima constitutiva, ela pode ser regulada por vários fatores humorais, além de citocinas, fatores de crescimento e agentes vasoativos (Touyz and Schiffrin, 2004a) (Figura 1). Vários estudos realizados em modelos animais de hipertensão mostraram que a angiotensina II, via atuação em receptores  $\text{AT}_1$ , é um dos principais fatores relacionados ao aumento da atividade e expressão da NADPH oxidase vascular (Seshiah et al., 2002; Touyz, 2004a). Ela pode aumentar a expressão das principais subunidades relacionadas à atividade enzimática, contribuindo para o aumento da produção e atividade das EROs nos vasos (Landmesser et al., 2002; Wassmann et al., 2001).

Em paralelo às ações mediadas pela NADPH oxidase vascular, a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), que é responsável pela produção do NO, também pode contribuir para produção de  $\cdot\text{O}_2^-$  vascular durante a hipertensão. Isto pode ocorrer, principalmente, em condições de baixas concentrações de L-arginina ou do cofator tetrahydrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ), processo pelo qual a enzima recebe o nome de eNOS desacoplada (Landmesser et al., 2003; Touyz and Schiffrin, 2004a). Outras

enzimas pro-oxidantes que podem gerar EROs na vasculatura são: a xantina oxidase, o complexo citocromo P450, as enzimas mitocondriais da cadeia respiratória, entre outras (Taniyama and Griendling, 2003; Touyz and Schiffrin, 2004a). Entretanto, a contribuição destas enzimas para produção de EROs pode ser relativamente menor quando comparado com a atividade da NADPH oxidase vascular.



**Figura 1:** Esquema representativo da regulação vascular das EROs. O desequilíbrio entre produção e remoção destas EROs estão relacionados ao processo de estresse oxidativo (Touyz and Schiffrin, 2004a).

Uma das principais maneiras de verificar a participação destas EROs na hipertensão é utilizando drogas com ações antioxidantes. A vitamina C e E foram as primeiras drogas a serem utilizadas em modelos animais de hipertensão, por diminuírem concentrações vasculares de EROs (Chen et al., 2001; Escobales and Crespo,

2005; Lassegue and Griendling, 2004; Ulker et al., 2003). Além delas, vários estudos em modelos animais de hipertensão mostraram que inibidores da NADPH oxidase, como o apocinin, e miméticos da SOD, como o tempol, também podem ser eficientes em reduzir a pressão arterial e algumas alterações vasculares, via diminuição das concentrações de EROs (Cai et al., 2003; Cifuentes and Pagano, 2006; Escobales and Crespo, 2005; Park et al., 2002; Schnackenberg and Wilcox, 1999; Schnackenberg et al., 1998).

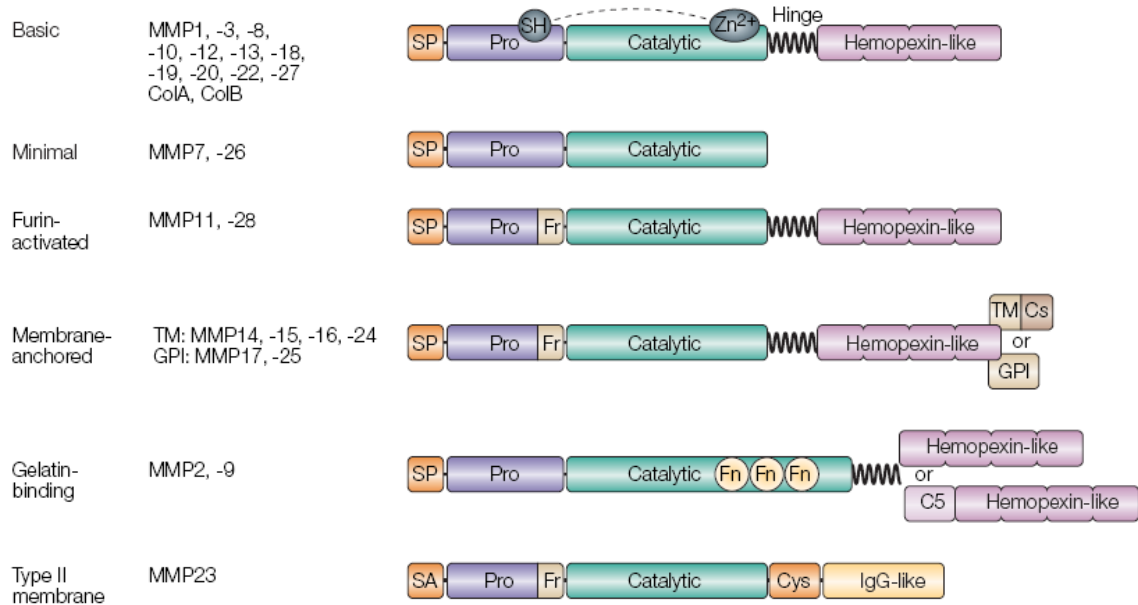
Várias destas ações vasculares mediadas pelas EROs podem ocorrer por ativação de outras vias enzimáticas. Dentre elas, a ativação das metaloproteinases pode apresentar uma importância fundamental nestas alterações vasculares associadas a hipertensão (Castier et al., 2005; Luchtefeld et al., 2005; Rajagopalan et al., 1996).

### **3- Participação das Metaloproteinases (MMPs) na Hipertensão Arterial.**

#### **3.1- Introdução às MMPs: Estrutura e Função.**

Metaloproteinases são endopeptidases cálcio-dependentes, contendo zinco, presentes na matriz extracelular de vários tecidos, incluindo musculatura lisa vascular, endotélio, miocárdio, entre outros. A família das MMPs apresenta mais de 25 espécies, sendo que as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) são as mais relacionadas a alterações estruturais e funcionais associadas a algumas doenças cardiovasculares (Galis and Khatri, 2002; Raffetto and Khalil, 2008). Todas elas apresentam similaridade de estrutura e função. Observa-se pela figura abaixo, que, basicamente, são compostas de um sítio catalítico, contendo zinco e cálcio, e de um pró-peptídeo, ligado a este sítio por uma ligação sulfidrila (o que as mantém em sua forma inativa). Grande parte delas possuem também uma região conhecida como “hemopexin – like”, responsável pelo reconhecimento e adesão aos componentes da

matriz extracelular (Bode and Maskos, 2003; Brinckerhoff and Matrisian, 2002; Nagase and Woessner, 1999).



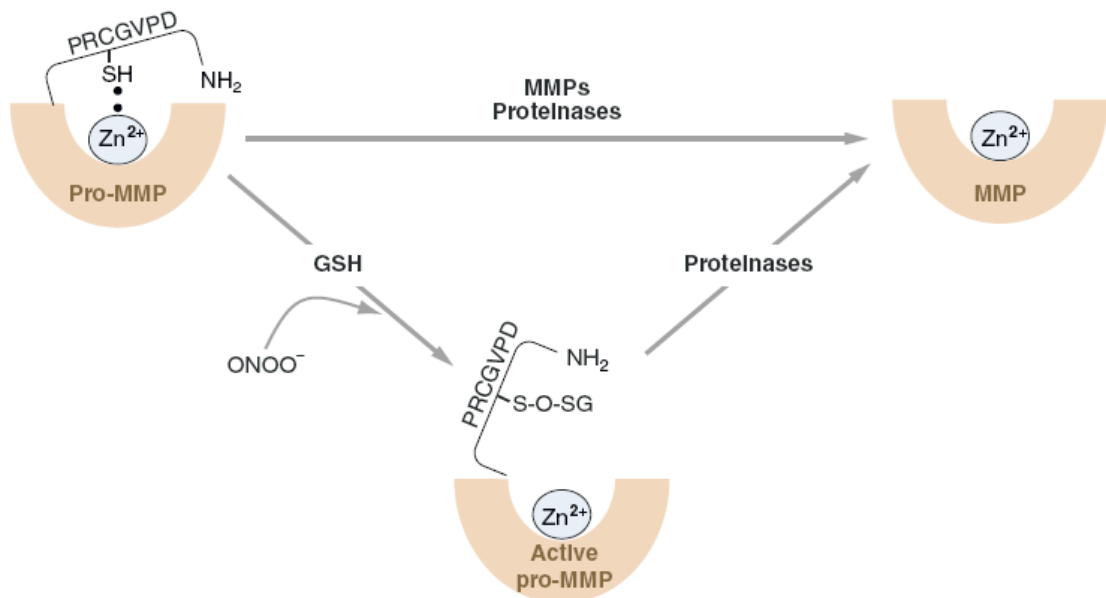
**Figura 2:** Principais metaloproteinasas e suas características estruturais. As gelatinases apresentam três domínios “fibronectin – like” que as diferenciam das outras MMPs (Parks et al., 2004).

Além disso, as MMPs também podem se diferenciar em relação a localização celular, regulação de transcrição e, principalmente, especificidade a substratos (Visse and Nagase, 2003). As gelatinases, especificamente, são responsáveis pela degradação dos componentes da membrana basal, tais como colágeno tipo IV, V e laminina, além do colágeno tipo I e III, da elastina e da fibronectina; entre outros (Nagase et al., 2006).

Elas são sintetizadas e secretadas em uma pró-forma latente (zimogênios ou pró-MMPs), e sua atividade depende, na maioria das vezes, da ruptura dos seus domínios pró-peptídicos, do sítio ativo da enzima. Proteases, como plasmina e MT-MMPs (metaloproteinasas de membrana), foram consideradas muito importantes



nesta ativação (Bode and Maskos, 2003; Brinckerhoff and Matrisian, 2002; Nagase and Woessner, 1999). Além disso, vários fatores como citocinas, angiotensina II, fatores de crescimento, estresse de cisalhamento e, principalmente o estresse oxidativo também podem regular a atividade destas MMPs (Bobik and Tkachuk, 2003; Deschamps and Spinale, 2006; Parks et al., 2004; Spinale, 2002). Esta regulação pode ser de três formas: (i) indução da expressão gênica; (ii) ativação de suas pró-formas latentes; e (iii) inibição por TIMPs, que são inibidores teciduais específicos das MMPs (Visse and Nagase, 2003). Embora a MMP-2 seja uma enzima constitutiva, sua ativação também pode ser regulada por estes vários fatores. A MT-MMP1, ou MMP-14 (Visse and Nagase, 2003), e o estresse oxidativo são um dos principais responsáveis por esta ativação. A figura 3 abaixo exemplifica este mecanismo (Schulz, 2007).



**Figura 3:** Ativação proteolítica e/ou não proteolítica das MMPs. Pode ocorrer ruptura total do pró-peptídeo ou ele pode apenas deslocar-se do sítio catalítico da enzima, deixando-a na forma ativa (Schulz, 2007).

Fisiologicamente, existe um equilíbrio entre a ativação das MMPs e sua inativação pelos TIMPs. Estes inibidores endógenos das MMPs podem ser classificados em quatro tipos diferentes: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. Esta classificação varia de acordo com suas localizações teciduais e, principalmente, especificidade a substratos, sendo que o TIMP-1 apresenta maior seletividade para MMP-9, enquanto o TIMP-2 para MMP-2 (Bode and Maskos, 2003; Nagase et al., 2006; Visse and Nagase, 2003).

De forma geral, as MMPs podem promover degradação de várias proteínas da matriz extracelular (MEC) participando ativamente do processo de remodelamento tecidual (Page-McCaw et al., 2007). Um desequilíbrio na regulação destas MMPs pode resultar em um aumento significativo de suas atividades, o que pode contribuir para o desenvolvimento e/ou progressão de várias doenças cardiovasculares, inclusive a hipertensão (Galis and Khatri, 2002; Raffetto and Khalil, 2008).

### **3.2- Importância da MMP 2 e 9 no remodelamento vascular associado à hipertensão.**

O remodelamento vascular é caracterizado como sendo uma resposta adaptativa ao aumento da pressão arterial, que tem como objetivo normalizar a tensão exercida na parede das artérias (Mayet and Hughes, 2003). Inicialmente, é considerado um processo adaptativo; entretanto, com aumentos constantes da pressão, torna-se crônico e mal-adaptativo, levando a alterações estruturais, mecânicas e funcionais significativas, principalmente na camada média das artérias (Intengan and Schiffrin, 2000). De acordo com a teoria de Laplace ( $T = P \times R$ ; T: tensão, P: pressão e R: raio), o remodelamento vascular pode ser classificado em hipertrófico e eutrófico, e está relacionado a artérias de condutância e resistência, respectivamente. Ambos

podem contribuir para manutenção da hipertensão arterial e/ou para o desenvolvimento de outras doenças cardiovasculares associadas (Dajnowiec and Langille, 2007; Humphrey, 2008; Intengan and Schiffrin, 2001; Mulvany, 2002).

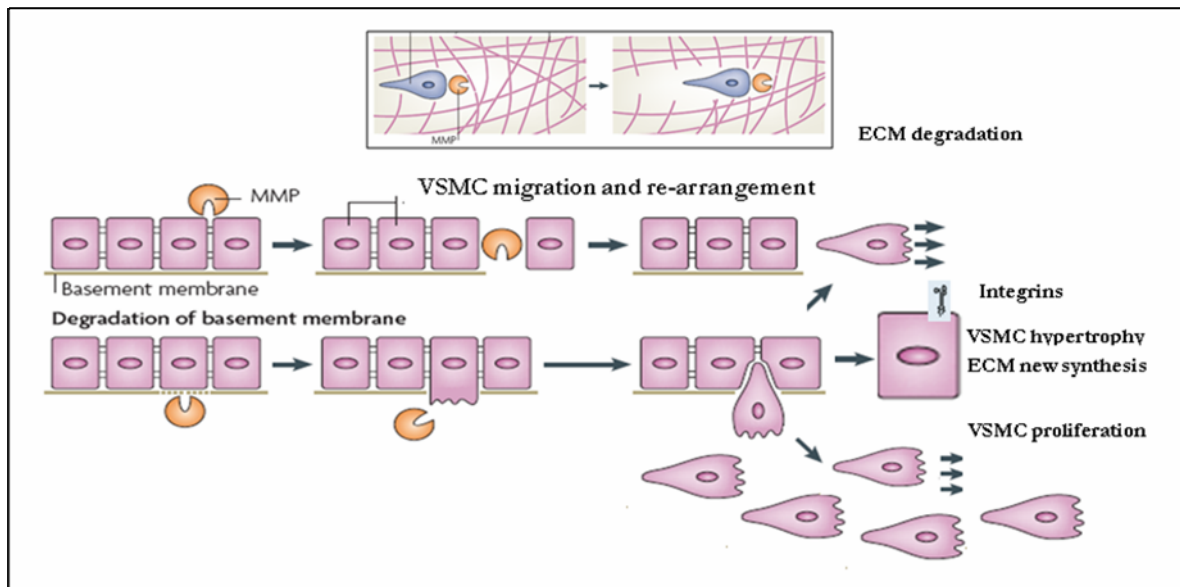
Vários estudos *in vitro*, realizados em células musculares lisas, mostraram que um aumento da pressão intra-luminal e/ou o estiramento mecânico pode levar a um aumento significativo tanto da expressão quanto da atividade da MMP-2 e 9 (Asanuma et al., 2003; Chesler et al., 1999; Lehoux et al., 2004). Em paralelo, estudos clínicos e em modelos animais de hipertensão também mostraram um aumento significativo desta expressão e atividade enzimática, tanto no plasma quanto em tecidos cardíacos e vasculares (Bouvet et al., 2005; Camp et al., 2004; Flamant et al., 2007; Martinez et al., 2006; Watts et al., 2007; Yasmin et al., 2005). Estas ações podem estar relacionadas diretamente com o remodelamento vascular observado na hipertensão.

Inicialmente, estudos mostraram que estas MMPs são importantes para o processo de remodelamento adaptativo associado à hipertensão arterial. Por degradarem grande parte dos componentes da matriz extracelular, elas podem contribuir para o aumento do diâmetro e da complacência arterial observados nesta fase inicial do remodelamento (Flamant et al., 2007). Entretanto, em decorrência da degradação constante das proteínas da MEC, as MMPs podem promover uma intensa migração e proliferação de células musculares lisas, além de hipertrofia celular e re-síntese protéica (Intengan and Schiffrin, 2000; Newby, 2006) (Figura 4), progredindo para um remodelamento crônico e mal-adaptativo (Bouvet et al., 2005; Watts et al., 2007).

Vários mecanismos foram propostos para explicar estas ações. Por exemplo, por degradarem proteínas da membrana basal, as gelatinases podem promover interação de algumas proteínas da MEC com as integrinas. Esta interação é importante porque

resulta na ativação de algumas vias de sinalização intracelular, que são essenciais para os processos de hipertrofia, proliferação e migração celular observados durante o remodelamento crônico (Intengan and Schiffrin, 2000; Lehoux et al., 2006; Lehoux and Tedgui, 1998). Além disso, estudos mostraram que a MMP-9 também apresenta uma participação importante na nova interação das células musculares lisas migratórias com as proteínas da MEC (Johnson and Galis, 2004), o que pode resultar em um aumento da ativação das integrinas e das vias hipertróficas de sinalização. Estas ações podem contribuir significativamente para o espessamento da camada média das artérias observado durante a fase crônica da hipertensão.

As principais proteínas da matriz responsáveis por estes processos são: trombospondina-1 (TSP-1), a tenascina-C (TN-C) e a fibronectina; além de alguns produtos de degradação do colágeno tipo I (Willis et al., 2004).



**Figura 4:** Participação das MMPs nos processos de hipertrofia, migração e proliferação celular via degradação de proteínas da MEC. Estes mecanismos contribuem de forma significativa para o remodelamento vascular crônico observado durante a hipertensão, especialmente o remodelamento hipertrófico. A figura também ilustra a degradação da membrana basal e as moléculas de adesão, ou integrinas, principais responsáveis por transmitir sinais da matriz para células musculares lisas (Page-McCaw et al., 2007).

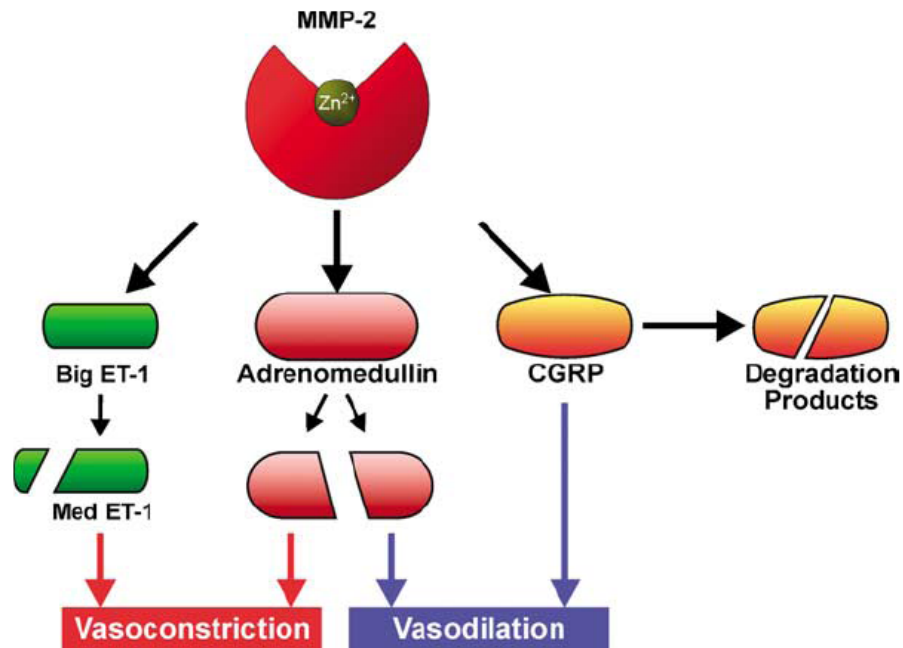
Baseado nisto, um estudo recente realizado em animais hipertensos mostrou que a MMP-2 apresenta participação fundamental no remodelamento hipertrófico das artérias de grande calibre, enquanto que apenas participação transitória no remodelamento eutrófico das artérias de resistência. Estas ações foram evidenciadas pelo uso da doxiciclina, inibidor não específico das MMPs. As aortas dos animais hipertensos tratados com esta droga apresentaram menor área de secção transversal do corte (CSA) e razão média por lúmen (M/L) quando comparadas aos seus controles hipertensos. Estes efeitos foram diretamente proporcionais a diminuição da MMP-2 nestes animais. Já nas artérias de resistência, a doxiciclina diminuiu apenas transitoriamente a razão M/L, em paralelo a redução transitória da MMP-2 (Bouvet et al., 2005). Assim, como descrito anteriormente, estas alterações estruturais podem contribuir para a manutenção da hipertensão arterial e/ou para o desenvolvimento e progressão de outras doenças cardiovasculares associadas.

Aumentos na expressão e atividade destas MMPs também foram observados na aterosclerose, durante ruptura de placas ateroscleróticas, restenoses coronarianas e aneurismas de aorta (Barbour et al., 2007; Batchelor et al., 1998; Galis and Khatri, 2002; Garcia-Touchard et al., 2005; Newby, 2005).

### **3.3- Mecanismos de ação da MMP-2 independentes da degradação vascular da MEC.**

A MMP-2, especificamente, além de participar destes processos crônicos de remodelamento tecidual, também pode regular o tônus vascular por clivar alguns peptídeos vasoativos (Fernandez-Patron et al., 1999; Fernandez-Patron et al., 2000; Martinez et al., 2004). Como pode ser observado na figura 5, elas podem clivar a big

endotelina-1(big ET-1), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a adrenomedulina (AM), em potentes metabólitos vasoconstritores, o que pode contribuir para o aumento da resistência vascular periférica observado na hipertensão.



**Figura 5:** Ações exercidas pela MMP-2 sobre o tônus vascular. Elas podem clivar a big ET-1 em metabólitos com ações vasoconstritoras ainda mais intensas (ET<sub>1-32</sub>, ou Med ET-1). Além disso, podem clivar o CGRP, potente vasodilatador arterial, em produtos de degradação sem ação vasodilatadora. E por fim, podem clivar a AM, peptídeo vasodilatador, em produtos de degradação com ações vasoconstritoras (Chow et al., 2007).

Estas alterações, mediadas pela MMP-2, podem estar relacionadas com a disfunção endotelial evidenciada na clínica (Panza et al.) e em vários modelos animais de hipertensão arterial. Entretanto, ainda não há estudos mostrando uma relação direta entre estas alterações.

No coração, a MMP-2 também pode desencadear ações independentes da degradação da MEC. Estudos mostraram que elas podem degradar tanto a

troponina I, quanto a cadeia leve de miosina, contribuindo para disfunção contrátil observada na hipertensão (Sawicki et al., 2005; Schulz, 2007; Wang et al., 2002b).

Embora alguns estudos tenham mostrado um aumento da atividade da MMP 2 e 9 na hipertensão arterial e no remodelamento vascular, nenhum estudo, até o momento, mostrou se estas MMPs podem participar das alterações vasculares, tanto estruturais quanto funcionais, associadas ao modelo de hipertensão renovascular 2R-1C.

#### **4- Ativação da MMP-2 via estresse oxidativo.**

Como vimos anteriormente, as EROs são muito importantes na ativação de algumas MMPs, especialmente da MMP-2 (Castier et al., 2005; Luchtefeld et al., 2005; Rajagopalan et al., 1996). Elas podem reagir com o resíduo de cisteína, presente no pró-peptídeo desta enzima, promovendo uma ruptura do grupamento tiol com o zinco, o que resulta na sua ativação (Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990) (Figura 3). Estas ações podem ocorrer de forma proporcional ao aumento das concentrações das EROs na hipertensão.

Baseado nisto, alguns estudos *in vitro* mostraram que aumentos na expressão e atividade da MMP-2, observados após estiramento mecânico de células musculares lisas, podem ocorrer via um aumento da produção vascular de EROs. Estas ações foram dependentes do aumento da ativação de enzimas pro-oxidantes, como a NADPH oxidase vascular (Grote et al., 2003) e a xantina oxidase (Rajagopalan et al., 1996; Valentin et al., 2005). Além disso, estudos em modelos animais de isquemia cardíaca mostraram que muitas das alterações funcionais e estruturais associadas a esta doença estão relacionadas ao aumento da atividade da MMP-2 pelas EROs (Sawicki et al., 2005; Wang et al., 2002a; Wang et al., 2002b).

Entretanto, apesar destes resultados, não há estudos mostrando se esta ativação pode ocorrer em modelos animais de hipertensão; e se ela pode estar relacionada às alterações cardiovasculares associadas a esta doença. O tratamento com drogas antioxidantes pode ser uma das maneiras de estudar esta hipótese.



## Hipótese

Levando-se em consideração que:

1- o aumento da pressão arterial está relacionado diretamente com aumentos das concentrações vasculares de EROs e da MMP 2 e 9;

2- estas MMPs participam do processo de remodelamento vascular crônico associado à hipertensão e de ações vasculares independentes da degradação da MEC;

3- aumentos nas concentrações de EROs promovem maior ativação destas MMPs;

*é possível que um aumento da expressão e atividade destas enzimas participem da fisiopatologia da hipertensão renovascular em modelos experimentais 2R-1C, podendo haver a participação de EROs neste processo.*

## Objetivos

Baseado nesta hipótese, o estudo teve como objetivo:

- 1)-** Verificar se aumentos na expressão e atividade destas MMPs (principalmente da MMP-2) podem contribuir para manutenção da hipertensão arterial e para as alterações vasculares (estruturais e funcionais) observadas neste modelo experimental.
  
- 2)-** Verificar se aumentos nas concentrações de EROs influenciam a expressão e atividade da MMP-2, contribuindo para as alterações vasculares associadas à hipertensão.

## **Materiais e Métodos**

### **1- Considerações Gerais:**

Os experimentos foram realizados utilizando ratos machos Wistar (180 a 200 gramas), provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em salas com ciclos claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada (22-25°C) e livre acesso à ração e água. Este estudo foi previamente aprovado pelo comitê de ética desta universidade.

#### **1.1- Hipertensão Arterial Induzida pela Técnica de Goldblatt:**

Esta técnica consiste na indução de uma estenose da artéria renal, por meio da introdução de um clipe de prata, com abertura interna de 0,2 milímetros, sobre estas artérias. Como descrito anteriormente, este procedimento leva a uma ativação significativa do sistema renina - angiotensina, o que resulta em um aumento da pressão arterial (Goldblatt, 1958). Os animais usados como controles foram submetidos apenas a laparotomia, sem introdução do clipe na artéria. A cirurgia foi realizada sobre efeito de anestesia geral com ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), via intra-peritoneal (i.p.).

#### **1.2- Grupos Experimentais:**

Este estudo foi dividido em dois protocolos experimentais.

**Protocolo 1: Efeitos vasculares do tratamento de ratos 2R-1C com doxiciclina.**

- **Sham e Sham + doxiciclina:** ratos que foram submetidos apenas a laparotomia e que receberam água e doxiciclina, respectivamente, na dose de 30 mg/kg/dia;
- **2R-1C e 2R-1C + doxiciclina:** ratos que foram submetidos à estenose da artéria renal, e que receberam água e doxiciclina, respectivamente, na dose de 30 mg/kg/dia.

Estudos prévios, em modelos animais de hipertensão, mostraram que esta dose de doxiciclina foi eficiente em inibir, de maneira não específica, a atividade das MMPs *in vivo* (Bouvet et al., 2005).

**Protocolo 2: Efeitos vasculares do tratamento de ratos 2R-1C com antioxidantes.**

O tempol (seqüestrante geral de EROs) e o apocinin (inibidor da NADPH oxidase) foram utilizados como terapia antioxidante neste protocolo.

- **Sham e Sham + tempol ou apocinin:** ratos que foram submetidos apenas a laparotomia e que receberam água e tempol ou apocinin, respectivamente, nas doses de 18 e 25 mg/kg/dia (Beswick et al., 2001; Sainz et al., 2005);
- **2R-1C e 2R-1C + tempol ou apocinin:** ratos que foram submetidos à estenose da artéria renal, e que receberam água e tempol ou apocinin, respectivamente, nas doses de 18 e 25 mg/kg/dia (Beswick et al., 2001; Sainz et al., 2005).

**Observações importantes:**

- 1)- Somente os animais que apresentaram aumento mínimo da pressão arterial sistólica, de cauda, de pelo menos 30 mmHg, que foram utilizados para este estudo.
- 2)- Os tratamentos se iniciaram após duas semanas da indução de hipertensão arterial renovascular. Os animais que ficaram hipertensos, segundo o critério descrito na observação 1) acima, foram aleatoriamente alocados a cada um dos grupos experimentais de animais hipertensos, tratados ou não.
- 3)- Todos os tratamentos foram realizados por gavagem, e por um período de 8 semanas; seguido da coleta de tecidos para as análises estruturais, bioquímicas e moleculares.

**2- Materiais:****2.1- Soluções utilizadas nos experimentos:**

- Solução de Krebs modificada (em mmol/L: NaCl 130, CaCl<sub>2</sub> 1,6, MgSO<sub>4</sub> 1,2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, KCl 4,7, NaHCO<sub>3</sub> 14,9 e glicose 5,5);
- Fenilefrina (10<sup>-4</sup> mol/L);
- Acetilcolina (10<sup>-11</sup> a 10<sup>-5</sup> mol/L);
- Nitroprussiato de sódio (10<sup>-11</sup> a 10<sup>-6</sup> mol/L);
- Paraformaldeído (PFA) 4% v/v tamponado;
- Hematoxilina e Eosina (H&E), Orceína e Sirius Red;

- Tampão de extração de proteínas: 20 mmol/L de Tris-HCl, 1 mmol/L de 1,10-fenantrolina, 1 mmol/L de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 1 mmol/L de NEM e 10 mmol/L de CaCl<sub>2</sub>.
- Albumina sérica bovina (BSA), 8 mg/mL;
- Reagente de Bradford;
- Dodecilsulfato de sódio (SDS) 12%, co-polimerizado com gelatina (1 mg/mL);
- Tampão usado no gel de separação: Tris-HCl/SDS, pH 8,8;
- Tampão usado no gel de largada: Tris-HCl, pH 6,8;
- Tampão de amostra não-redutor: SDS 2%, Tris-HCl 125 mmol/L, glicerol 10% e azul de bromofenol 0.001%; pH 6,8;
- Solução de Triton X-100 a 2%;
- Solução de Agarose;
- Persulfato de Amônio (APS) 10%;
- TEMED (Tetrametil etilenodiamina);
- Solução de acrilamida 30% e bisacrilamida 0,8%;
- Solução de Coloração: Coomassie Brilliant Blue G-250 0,05%;
- Solução fixadora e de descoloração: Metanol 30% e Ácido acético 10%;
- Solução Tampão de Tris-CaCl<sub>2</sub> (Tris 50 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 10 mmol/L, ZnCl<sub>2</sub> 1 µmol/L);
- Solução de DQ Gelatin 5 µg/mL (Molecular Probes, Oregon, USA);
- Solução de *Clostridium sp* 2U/mL (Molecular Probes, Oregon, USA);

- Água Dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1%;
- Reagente Trizol (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, USA);
- Superscript RT II 200 U (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY);
- DHE (Dihidroetídio) 10  $\mu\text{mol/L}$  e 50  $\mu\text{mol/L}$ ;
- Solução de Hanks (em  $\text{mmol/L}$ : 1,6  $\text{CaCl}_2$ , 1,0  $\text{MgCl}_2$ , 145,0  $\text{NaCl}$ , 5,0  $\text{KCl}$ , 0,5  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10,0 dextrose e 10,0 HEPES - pH 7,4)
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,067% v/v;
- 1,1,3,3 – tetrametoxipropano 1  $\mu\text{mol/L}$ ;
- Ácido sulfúrico 0,04  $\text{mol/L}$ ;
- Ácido fosfotungstíco 10% v/v;
- N-butanol;
- PBS (Tampão Salina Fosfato);
- TBS-Tween (Tampão Tris-salina);
- Anticorpos monoclonais: anti-MMP-2 (MAB3308), anti-MMP-9 (MAB3309), anti-MMP-14 (MAB3317) e anti-TIMP-2 (MAB13446); diluição 1/10, em PBS, a partir da solução inicial de 1  $\mu\text{g/mL}$  (Chemicon, Temecula, CA USA);
- Anticorpo secundário rodamina (AP160P); diluição 1/200, em PBS, a partir da solução inicial de 1  $\text{mg/mL}$  (Chemicon, Temecula, CA USA);
- Kit de Detecção de Imunohistoquímica: “Anti-Mouse Poly Horseradish peroxidase (HRP)” (Chemicon, Temecula, CA USA);

*Os outros reagentes não especificados foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA).*

## **2.2- Primers utilizados:**

$\beta$ -Actina (ACTB) (ID 81822), forward: 5'- TCTGTGTGGATTGGTGGCTCT-3';  
reverse: 3'- GACTCATCGTACTCCTGCTTGCT-5', 83 pares de base;

MMP-2 (ID 81686), forward: 5'- GTGCCAAGGTGGAAATCAGAG-3', reverse: 3'-  
AAGGTTGAAGGAAACGAGCGA-5', 100 pares de base;

TIMP-2 (ID 29543), forward: 5'- CTACATCTCCTCCCCGGATGA -3', reverse: 5'-  
GGTGCCCATGATGCTCTTC-3', 68 pares de base.

## **2.3- Drogas administradas diretamente nos animais:**

- Doxiciclina 30 mg/kg/dia, Tempol 18 mg/kg/dia e Apocinin 25 mg/kg/dia (Sigma-Aldrich): administração de 1 mL da droga em solução aquosa, por via oral;
- Ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intra-peritoneal.

## **2.4- Equipamentos utilizados nos experimentos:**

- Balança de Precisão (Shimadzu AY220), pHmetro (Incibrás) e centrífuga refrigerada (CELM – 3 plus);
- Transdutor de pressão acoplado a um manguito (MLT125R pulse transducer/pressure cuff; Castle Hill, Austrália);
- Transdutor de tensão isométrica (Letica Scientific Instruments; Barcelona, Espanha);
- Micrótopo (Leica RM2025) e criostato (CM 1900; Leica, Germany);



- Microscópio de luz branca e polarizada (DMLB; Leica, Bensheim, Germany) e microscópio de fluorescência (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England), acoplados a uma câmera fotográfica;
- Espectrofotômetro;
- Fonte de eletroforese (Electrophoresis Power Supply – EPS 301);
- Sistema de Documentação de Eletroforese Kodak (Kodak, Rochester, NY);
- Espectrofluorímetro (Gemini EM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA);
- Real-Time RT-PCR – Chromo 4 Detector (Bio-Rad Laboratories, USA);
- Citômetro de Fluxo Facscan (Becton-Dickinson, San Jose- CA).

#### **2.5- Programas de Aquisição de Dados:**

- PowerLab 4/S analog-to-digital converter (AD Instruments Ltd., Castle Hill, Australia);
- Chart V4.04, PowerLab ADInstruments (2000) Program;
- ImageJ Program (NIH – National Institutes of Health);
- Analysis System (EDAS) 290 (Kodak, Rochester, NY);
- KCJunior e SoftMax Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA);
- CellQuest 1.2 software (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

### **3- Metodologia:**

#### **3.1- Parâmetros Hemodinâmicos**

##### **3.1.1- Avaliação da Pressão Arterial e do Peso Corporal:**

A pressão arterial e o peso corporal foram avaliados, semanalmente, durante as 8 semanas de tratamento. A pressão arterial foi verificada pelo método de plestimografia de cauda. Para isto, um manguito acoplado a um transdutor de pressão foi colocado em torno da cauda dos animais acordados e previamente aquecidos (em gabinetes com temperatura de 37 °C). As variações da pressão foram capturadas por um programa específico de aquisição de dados: PowerLab 4/S analog-to-digital converter (AD Instruments Ltd., (Castle Hill, Australia), e os resultados foram representados por uma média de três medidas consecutivas para cada animal.

##### **3.1.2- Avaliação da Reatividade Vascular:**

Ao final da 8ª semana de tratamento, os animais foram decapitados, e suas aortas foram retiradas delicadamente e lavadas em solução de Krebs. Estas foram cortadas em anéis de 4 mm de comprimento e colocadas em um sistema de cubas para órgãos isolados, de 10 mL, contendo solução modificada de Krebs à 37 °C, pH 7,4 e aeração constante com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>). Este sistema foi previamente conectado a um transdutor de tensão isométrica (Letica Scientific Instruments; Barcelona, Espanha), e os registros de tensão, em gramas, foram adquiridos utilizando o programa de aquisição de dados: Chart V4.04. PowerLab ADInstruments (2000) (Castro et al., 2004).

Após 60 minutos de estabilização sob tensão basal de 1,5 g, estes anéis foram estimulados com fenilefrina (10<sup>-4</sup> mol/L), seguido de uma concentração de 10<sup>-3</sup> mol/L

de acetilcolina (Ach). Somente os anéis que produziram relaxamento igual ou superior a 80% é que foram utilizados no experimento. O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina. Para avaliar o relaxamento vascular, dependente e independente do endotélio, foram usadas concentrações cumulativas de Ach ( $10^{-11}$ - $10^{-5}$  mol/L) e de nitroprussiato de sódio (NPS;  $10^{-11}$ - $10^{-6}$  mol/L), respectivamente.

### **3.2- Parâmetros Estruturais**

#### **3.2.1- Análise Morfológica da Aorta.**

Ao final da 8<sup>a</sup> semana de tratamento, os animais foram decapitados, e suas aortas foram lavadas em solução de Krebs, dissecadas de tecidos conjuntivos e gordura, e fixadas imediatamente em solução tamponada de PFA 4%, por 24 horas . Após desidratação em diferentes concentrações de álcool 70% v/v, elas foram inseridas em parafina e cortadas transversalmente, por um micrótomo (Leica RM2025), a uma espessura de 4  $\mu$ m. Estes cortes, feitos em lâminas de vidro, foram colocados sobre uma chapa pré-aquecida (37-39 °C), com objetivo de promover aderência e abertura. Para cada animal foram feitas três lâminas, contendo três cortes cada.

Algumas lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para determinação dos parâmetros estruturais da aorta: área de secção transversal do corte (CSA), diâmetro interno e externo (ID e ED, respectivamente), espessura da camada média (media) e razão média por lúmen (M/L). Além disso, o número de células musculares lisas (determinado por contagem de núcleos) também foi analisado usando esta coloração. Já outras lâminas foram coradas com o Sirius Red e a Orceína para determinação quantitativa de colágeno e elastina na camada média da aorta.

As imagens dos cortes foram obtidas usando um microscópio de luz branca e polarizada (DMLB; Leica, Bensheim, Germany) acoplado a uma câmera digital. Estas imagens foram registradas, pelo programa Leica IM50, em um aumento de 50 e 400x, e posteriormente analisadas pelo ImageJ. A partir da análise da área interna ( $A_i$ ) e externa ( $A_e$ ) dos cortes, conseguiu-se determinar o CSA ( $A_e - A_i$ ), o ID (raiz quadrada de  $4A_i/\pi$ ), o ED (raiz quadrada de  $4A_e/\pi$ ), a média ( $(ED - ID)/2$ ), e a razão M/L ( $2 \times \text{Média}/ID$ ). Todos estes cálculos foram realizados com base no artigo publicado por Dao e colaboradores, em 2001 (Dao et al., 2001).

A contagem do número de células da musculatura lisa vascular e a determinação das quantidades de colágeno e elastina (Escolar et al., 1997a; b; Verheyen et al., 1987), na camada média das aortas, também foram determinadas pelo ImageJ, em aumentos de 400x. Estas técnicas também estão descritas detalhadamente no artigo publicado por Dao e colaboradores (Dao et al., 2001). O número de células musculares lisas foi quantificado em dois cortes consecutivos, pelo método tri-dimensional, que é independente da orientação, da forma e do tamanho do núcleo (Dao et al., 2001).

### **3.3- Parâmetros Bioquímicos e Moleculares**

#### **3.3.1- Determinação Vascular e Sistêmica das EROs:**

##### **3.3.1. A- *In situ*:**

As concentrações vasculares de EROs foram analisadas, *in situ*, na camada média das aortas, utilizando dihidroetíteo (DHE) na concentração de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Hao et al., 2006; Viel et al., 2008). Este “probe” reage com o  $\cdot\text{O}_2^-$  presente nos tecidos, resultando na formação de 2-hidroxi-etíteo (EOH) e de etíteo, produtos da reação que emitem uma fluorescência vermelha no local. Inicialmente, os tecidos foram

congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA), utilizando acetona e gelo seco. Eles foram cortados, em criostato, a 4- $\mu\text{m}$  de espessura, e incubados com o DHE, em uma câmara úmida e escura, por 30 minutos. Após este período de incubação, os cortes foram lavados com tampão salina fosfato (PBS) e fixados em paraformaldeído 4%. Com auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado a uma câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram registradas na objetiva de 40x. As concentrações de EROs presentes nos tecidos foram representadas pela emissão de fluorescência vermelha, como descrito anteriormente. Esta foi quantificada utilizando o programa ImageJ (NIH – National Institutes of Health).

### **3.3.1. B- Por citometria de fluxo:**

As concentrações vasculares das EROs também foram analisadas nas células endoteliais por citometria de fluxo, utilizando o DHE na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  (Fernandes et al., 2007; Rodrigues et al., 2008). Inicialmente, para remover estas células da aorta, foi feito um raspado endotelial na presença de solução de Hanks. Após centrifugação desta solução, a 200x g, as células endoteliais foram incubadas com o DHE a 50  $\mu\text{g/mL}$ , durante 20 minutos, à temperatura ambiente. Como descrito anteriormente, este “probe” reage com o  $\cdot\text{O}_2^-$  presente nas células resultando na emissão de uma fluorescência vermelha via formação de EOH e etídeo. A intensidade média de fluorescência por célula, emitida por esta oxidação do DHE, foi avaliada quantitativamente por um citômetro de fluxo ( $\lambda_{\text{excitação}}$ : 510 nm e  $\lambda_{\text{emissão}}$ : 595 nm; FACScan, Becton-Dickinson, San Jose- CA); e posteriormente analisada pelo programa CellQuest 1.2 (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Com isto, pode-se dizer que a oxidação do DHE é quantitativamente proporcional às concentrações de EROs nas células.

### 3.3.1. C- Quantificação da peroxidação lipídica por TBARS:

A peroxidação lipídica foi o parâmetro usado para avaliar o estresse oxidativo no plasma. Este processo pode ser analisado por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Cau et al., 2008). Basicamente, este ácido reage com alguns aldeídos formados na lipoperoxidação, como malondialdeído (MDA), formando espécies facilmente quantificadas por espectrofotometria e/ou fluorimetria.

Inicialmente, 10 µL de plasma foram misturados com soluções de ácido sulfúrico 0,04 M e ácido fosfotungstístico 10%v/v, para separar os lipídeos da solução de substâncias solúveis interferentes. Após duas centrifugações consecutivas, a 1600x g, o sedimento foi re-suspendido em água destilada e 500 µL do ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% v/v. Os tubos foram agitados e colocados em banho-maria a 95°C, por uma hora. Estes foram novamente centrifugados, após acréscimo de 2,5 mL de n-butanol, e 200 µL do sobrenadante foram transferidos para uma microplaca. Os produtos formados a partir desta reação foram quantificados por um espectrofluorímetro ( $\lambda_{\text{excitação}}$ : 515 nm e  $\lambda_{\text{emissão}}$ : 553 nm; Gemini EM, Molecular Devices; USA), utilizando a seguinte fórmula:  $f \times 25/F$  (onde, f representa a absorbância da amostra, e F a absorbância do padrão). Como padrão foi utilizado 5 µL de 1,1,3,3 tetrametoxipropano 1 µM.

### 3.3.2- Zimografia em gel:

A zimografia em gel é um dos métodos mais comuns para se avaliar as concentrações de MMPs no plasma e em tecidos biológicos (Gerlach et al., 2007; Gerlach et al., 2005; Souza-Tarla et al., 2005).

### 3.3.2 A- Dosagem de Proteína pelo Método de Bradford:

Previamente à zimografia, é necessário determinar a quantidade de proteína presente em cada amostra de aorta. Isto porque as variações protéicas entre um tecido e outro podem interferir nos resultados finais da zimografia. Para isto, foi utilizado o método de Bradford, que consiste em um método colorimétrico e quantitativo.

Inicialmente, as amostras de aorta foram trituradas, homogeneizadas em tampão de extração de proteínas (CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Tris 20 mM pH 7.4, Fenantrolina 1 mM, PMSF 1 mM, NEM 1 mM) e incubadas por 16 horas na geladeira. Para cada 0,08g de tecido foram acrescentados 150µL deste tampão. Após este período, os extratos foram centrifugados por 15 minutos, e os sobrenadantes retirados para determinação protéica.

Para a construção da curva padrão foi utilizado o BSA nas seguintes concentrações, em mg/mL: 0,085; 0,175; 0,35; 0,7 e 1,4. Todas elas foram preparadas, em água destilada, a partir de uma solução inicial de 8 mg/mL.

O reagente de Bradford foi utilizado para determinar as concentrações de proteínas de cada amostra analisada. Ao se ligar às proteínas do tecido, ele adquire uma coloração azul que pode ser quantificada por um espectrofotômetro de luz visível (595 nm). A intensidade da cor varia de acordo com a quantidade de proteína no tecido. Para cada 5µL da amostra e da curva padrão foi acrescentado 250µL deste reagente. Pelos valores obtidos após a leitura, em µg/µL, foi possível normalizar a quantidade de proteínas, que será aplicada, posteriormente, nos géis de zimografia. Neste estudo, foi aplicado 30 µg de proteína por lane.

### **3.3.2 B- Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%:**

As amostras previamente preparadas (SDS 2%, Tris-HCl 125 mM, glicerol 10% e azul de bromofenol 0.001%) foram aplicadas em géis de poliacrilamida 12% e separadas por eletroforese, conforme a técnica de SDS-PAGE.

Após este processo, os géis foram submetidos a dois banhos de Triton X-100 a 2%, para remover o SDS, e colocados em solução Tris-CaCl<sub>2</sub> 50 mmol/L, por 16 horas, a 37°C. Posteriormente, foram fixados e corados em solução Coomassie Blue 0,05% por 4 horas. Para visualização das bandas referentes às MMPs, os géis foram descorados com metanol a 30% e ácido acético 10%. Observa-se a formação de bandas claras contra o fundo azul escuro do Coomassie (devido à degradação da gelatina incorporada ao gel).

Para cada gel foi utilizado um padrão interno (soro fetal bovino 2%), representado nas figuras como Std. Por ele, foi possível normalizar as quantidades de proteínas obtidas entre os géis, podendo compará-los entre si. A quantificação das bandas das MMPs foi feita usando o sistema Kodak Eletrophoresis Documentation and Analylis System - EDAS 290 (Kodak, Rochester, NY). A forma latente e ativa da MMP-2 e 9 foi identificada por meio dos seus pesos moleculares: 72, 67, 92 e 87 KDa, respectivamente (Gerlach et al., 2007; Gerlach et al., 2005; Souza-Tarla et al., 2005). Ambas foram inibidas com fenantrolina, mas não por outros inibidores de proteases.

### **3.3.3- Zimografia *in situ*:**

Diferente da zimografia convencional, este método reflete a atividade *in situ* das MMPs. Ele permite localizar e quantificar as gelatinases diretamente nos tecidos (Galis et al., 1995).



A atividade das MMPs, *in situ*, foi analisada utilizando como substrato DQ gelatin (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA) na concentração de 1,0 µg/mL, preparada em tampão Tris-CaCl<sub>2</sub> 50mmol/L. Inicialmente, os tecidos foram congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA), utilizando acetona e gelo seco. Eles foram cortados, em criostato, a 4-µm de espessura, e incubados com o substrato, em uma câmara úmida e escura, por 60 minutos. Após este período, os cortes foram lavados 5x com PBS e fixados em paraformaldeído 4% v/v, por 10 minutos. Com auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado a uma câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram registradas na objetiva de 40x. A atividade gelatinolítica, *in situ*, foi visualizada por uma coloração verde brilhante contra um fundo preto. Para análise e quantificação da atividade, foi utilizado o programa ImageJ (NIH – National Institutes of Health). Fenantrolina e PMSF foram utilizados para confirmar a atividade das MMPs nos tecidos. A fenantrolina diminuiu significativamente a atividade gelatinolítica; entretanto, o mesmo não foi observado para o PMSF.

#### **3.3.4- Ensaio fluorimétrico para determinação da atividade gelatinolítica total:**

Diferente da zimografia convencional e da zimografia *in situ*, este método determina a atividade gelatinolítica, *in vivo*, em extratos de aorta (Lalu et al., 2006).

A atividade gelatinolítica total, nos extratos de aorta, foi determinada usando o Kit EnzChek Gelatinase/Collagenase (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA). Inicialmente, foi analisada a quantidade de proteínas nas amostras pelo método de Bradford, como descrito anteriormente. Sessenta microgramas de proteína dos extratos de aorta foram aplicados, em duplicatas, em cada poço de uma microplaca. Como substrato, foi utilizado DQ gelatin na concentração de 5,0 µg/mL, em tampão

Tris-CaCl<sub>2</sub>. A atividade gelatinolítica foi determinada por um espectrofluorímetro ( $\lambda_{\text{excitação}}$  495,  $\lambda_{\text{emissão}}$  515 nm; Gemini EM, Molecular Devices, USA), após 30 minutos de incubação à 37 °C. A curva padrão foi preparada como recomendada pelo fabricante (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA). Para isto, *Clostridium sp* foi diluído em tampão Tris-CaCl<sub>2</sub> 50 mmol/L, nas concentrações de 62,5 $\mu$ U a 1000 $\mu$ U. Fenantrolina 1,0 mmol/L e PMSF 1,0 mmol/L foram utilizados para confirmar a atividade das MMPs neste tecido. A fenantrolina diminuiu significativamente a atividade gelatinolítica; entretanto, o mesmo não foi observado para o PMSF.

### **3.3.5- Método da Captura de Anticorpo para avaliar a atividade específica da MMP-2:**

Para determinar a atividade específica da MMP-2, em extratos de aorta, foi realizado o método da captura de anticorpo seguido do ensaio da atividade gelatinolítica. Para isto, uma microplaca foi incubada com 100  $\mu$ L do anticorpo monoclonal anti-MMP-2 (MAB3308; Chemicon USA), na concentração de 1,0  $\mu$ g/mL, durante 16 horas. Após este período, o anticorpo foi retirado e substituído por volumes adequados de amostras, previamente preparadas em tampão Tris-CaCl<sub>2</sub> 50 mmol/L. O volume aplicado foi correspondente a concentração de 60  $\mu$ g de proteínas, determinadas pelo método de Bradford. As amostras ficaram em contato com o anticorpo aderido na placa, por uma hora, a 25°C. Em seguida, elas foram recolhidas e analisadas por zimografia, para confirmar a aderência da MMP-2 na placa. Por fim, estas placas foram lavadas 3x com tampão Tris-salina (TBS-Tween), e utilizadas para o ensaio de atividade gelatinolítica, descrito acima. Fenantrolina 1,0 mmol/L e PMSF 1,0 mmol/L também foram utilizados para confirmar a atividade desta MMP nestes tecidos.

### **3.3.6- Imunofluorescência e Imunohistoquímica:**

#### **3.3.6 A- Imunofluorescência:**

Este método foi utilizado para co-localizar a atividade gelatinolítica *in situ* com a expressão da MMP-2. Após incubação com a DQ gelatin, os mesmos cortes foram incubados com anticorpo primário anti-MMP-2 (MAB3308; Chemicon,USA), na concentração de 0,1 µg/mL, por uma hora. Para isto, também foi utilizada uma câmara úmida e escura. Depois de lavados 5x com PBS, estes cortes foram incubados com o anticorpo secundário rodamina (AP160P; Chemicon,USA) a 5 µg/mL, por uma hora, no escuro. Ele foi utilizado por emitir fluorescência vermelha quando ligado ao anticorpo primário. Por fim, foram aplicados 20 µl de solução Antifade (S7114; Chemicon USA) para aumentar a estabilidade da fluorescência. Com auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado a uma câmara fotográfica, as imagens dos cortes foram registradas na objetiva de 40x. A MMP-2 foi visualizada em vermelho contra um fundo preto. Para sobreposição da atividade gelatinolítica com a expressão da MMP-2 foi utilizado o programa Adobe Photoshop. As imagens sobrepostas obtiveram uma coloração amarelada.

#### **3.3.6 B- Imunohistoquímica:**

Este método foi realizado para determinar a expressão e localização das MMPs e TIMP-2, diretamente nos tecidos. Para isto foi utilizado anticorpos específicos para cada um deles, e o kit de imunohistoquímica: Anti-Mouse Poly Horseradish peroxidase (HRP) (Chemicon USA). Inicialmente, os tecidos foram congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA), utilizando acetona e gelo seco. Eles foram cortados, em criostato, a 4-µm de espessura, e fixados imediatamente em

acetona. Posteriormente, foram incubados com solução de bloqueio da peroxidase, contendo  $H_2O_2$ , durante 10 minutos. Depois de lavados 3x com PBS, cada corte foi incubado com um anticorpo monoclonal primário específico: anti-MMP-2 (MAB3308; Chemicon,USA), anti-MMP-9 (MAB3309; Chemicon,USA), anti-MMP-14 (MAB3317; Chemicon USA) e anti-TIMP-2 (MAB13446; Chemicon USA), todos a 0,1  $\mu$ g/mL, por uma hora. Em seguida, foram lavados novamente 3x com PBS e incubados com o anticorpo secundário do kit, também por uma hora, no escuro. Por fim, os cortes foram incubados com o substrato cromógeno 3-3' diaminobenzidina (DAB) (25  $\mu$ L do cromógeno para cada 1,0 ml de tampão do DAB) por 20 minutos, e contra-corados com hematoxilina. Com auxílio de um microscópio de luz branca (Leica, Germany) acoplado a uma câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram registradas na objetiva de 40x. O TIMP-2 e as MMPs foram visualizados por uma cor marrom contra o fundo roxo da hematoxilina. Para análise e quantificação da expressão foi utilizado o programa ImageJ (NIH – National Institutes of Health) (Faia et al., 2002).

### **3.3.7- Determinação da expressão gênica do RNAm por Real-Time RT-PCR:**

Este método foi realizado para determinar a expressão gênica do RNAm da MMP-2 e TIMP-2 nas aortas. Para extrair o RNA, as aortas foram congeladas em nitrogênio líquido, trituradas e homogeneizadas em Trizol (Invitrogen). Após centrifugação, na presença de isopropanol, o precipitado foi re-suspenso em água livre de RNase (água DEPC) e analisado por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose.

O RNA total foi utilizado para síntese do cDNA por reação de transcrição reversa (RT), usando Superscript II RT (Gibco Life Technologies, Gran Island, NY). Esta reação foi amplificada por uma reação em cadeia reversa em tempo real (Real-Time RT-PCR), pelo aparelho Chromo 4 Detector (Bio-Rad Laboratories, USA). A

concentração final do produto amplificado foi determinada usando o reagente fluorescente SBYR-Green. Esta reação foi feita nas seguintes condições: 95°C por 2 minutos, com 50 ciclos a 95°C (10s), 58°C (30s) e 72°C (30s), seguida da análise da curva de melting. Como padrão interno do ensaio foi utilizado a  $\beta$ -actina (ACTB). Estas condições de PCR foram determinadas de acordo com a eficiência da amplificação dos genes alvos e do controle.

As seqüências de primers foram desenhadas baseadas no banco de dados do GenBank. Para a ACTB: (ID 81822), forward: 5'- TCTGTGTGGATTGGTGGCTCT-3'; reverse: 3'- GACTCATCGTACTCCTGCTTGCT-5', 83 pares de base;

Para MMP-2 (ID 81686), forward: 5'- GTGCCAAGGTGGAAATCAGAG-3', reverse: 3'- AAGGTTGAAGGAAACGAGCGA-5', 100 pares de base;

Para TIMP-2 (ID 29543), forward: 5'- CTACATCTCCTCCCCGGATGA -3', reverse: 5'- GGTGCCCATGATGCTCTTC-3', 68 pares de base.

### **3.4- Análise Estatística**

Os resultados obtidos neste estudo foram analisados com ANOVA (análise de variância) de dois fatores, seguidos de uma ANOVA de um fator, e teste Tukey (SigmaStat for Windows, Jadel Scientific, USA). Foram considerados estatisticamente diferentes valores com  $p < 0,05$ . Os gráficos foram representados com média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

## Resultados

### Protocolo 1: Efeitos vasculares do tratamento de ratos 2R-1C com doxiciclina.

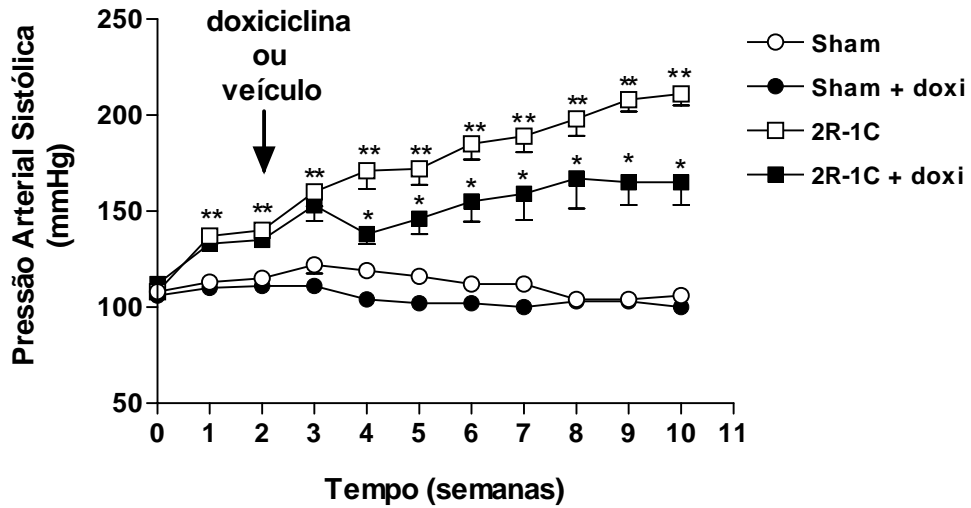
#### 1- Efeito da doxiciclina sobre a pressão arterial e o peso corporal em ratos 2R-1C.

Com objetivo de verificar se as MMPs contribuem para o aumento da pressão arterial observado neste modelo experimental, alguns animais, controles e hipertensos, foram tratados com a doxiciclina (30 mg/kg/dia). A pressão arterial foi avaliada durante dois meses por meio da pletismografia de cauda.

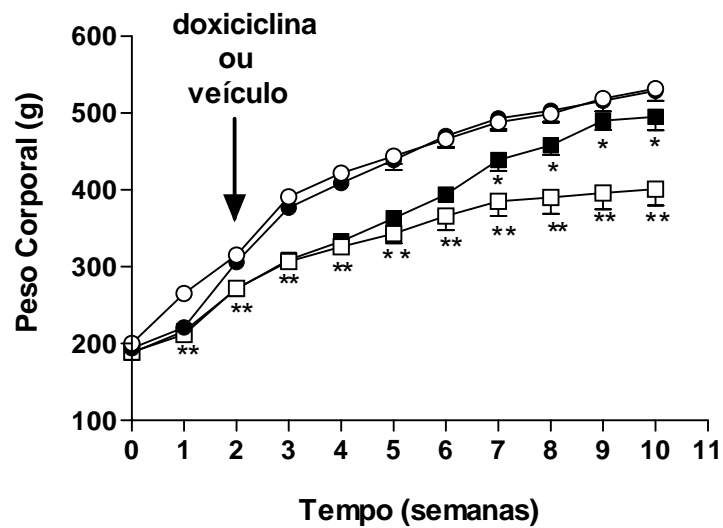
Os valores basais de pressão arterial e peso corporal foram similares entre os animais dos quatro grupos experimentais (Figura 6A e 6B). Entretanto, logo na primeira semana após a cirurgia, foi observado um aumento significativo da pressão arterial nos ratos do grupo 2R-1C quando comparados com os controles (Figura 6A;  $p < 0,01$ ). Este aumento da pressão continuou constante durante todo o período de estudo. Como podemos observar pelo gráfico, a partir da segunda semana de tratamento, a doxiciclina atenuou de forma significativa este aumento da pressão nos animais hipertensos ( $p < 0,01$ ), sem alterá-la nos animais controles ( $p > 0,05$ ).

Além disso, esta atenuação da pressão arterial pode ter contribuído para o maior ganho de peso observado nos animais 2R-1C + doxi, a partir da 5ª semana de tratamento (Figura 6B;  $p < 0,01$ ). Estes efeitos já não foram observados nos animais controles ( $p > 0,05$ ).

A



B



**Figura 6:** Efeito da doxyciclina sobre a pressão arterial e o peso corporal. Evolução da pressão arterial sistólica, em mmHg (A) e do peso corporal, em gramas (B), durante oito semanas de tratamento. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM (n = 20 por grupo). \* e \*\*  $p < 0,01$  versus 2R-1C e Sham, respectivamente.

## 2- Efeito da doxiciclina sobre a função endotelial em ratos 2R-1C.

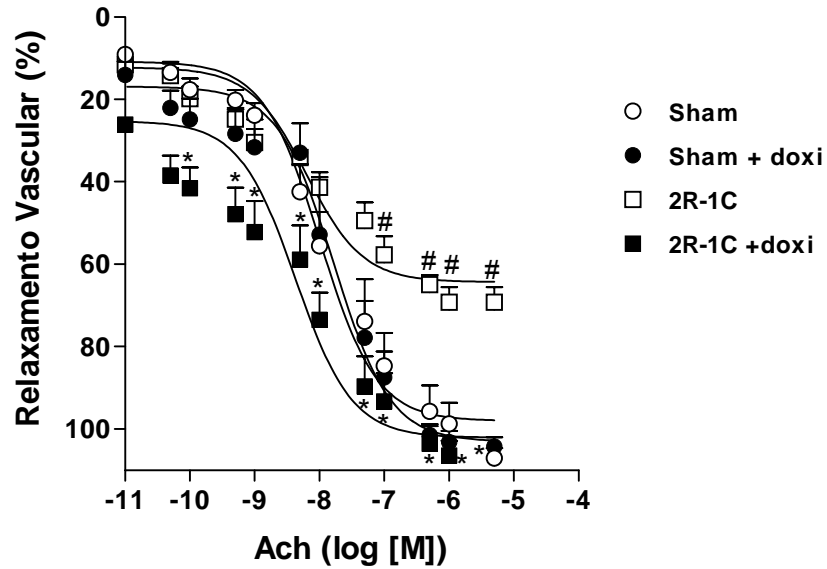
A atenuação da pressão arterial, pela doxiciclina, pode estar relacionada diretamente aos efeitos desta droga sobre as MMPs e a disfunção endotelial. Para testar esta hipótese, o relaxamento vascular, dependente e independente do endotélio, foi analisado em um sistema de banho para órgãos isolados, na presença de concentrações cumulativas de Ach ( $10^{-11}$ - $10^{-5}$  mol/L) e de NPS ( $10^{-11}$ - $10^{-6}$  mol/L), respectivamente (Figura 7A e 7B).

Como pode ser observado na figura 7A, o relaxamento dependente do endotélio, induzido pela Ach, foi menor nas aortas dos ratos hipertensos, quando comparado aos animais controles (Figura 7A e Tabela 1;  $p < 0,05$ ). Entretanto, o tratamento com a doxiciclina reverteu totalmente este comprometimento endotelial nos animais hipertensos (Figura 7A e Tabela 1;  $p < 0,01$ ); sem produzir nenhuma ação nos controles ( $p > 0,05$ ). Estes efeitos foram evidenciados por uma melhora do relaxamento dependente do endotélio pela acetilcolina. Por outro lado, o relaxamento independente do endotélio, induzido pelo NPS, foi similar em todos os grupos experimentais (Figura 7B;  $p > 0,05$ ).

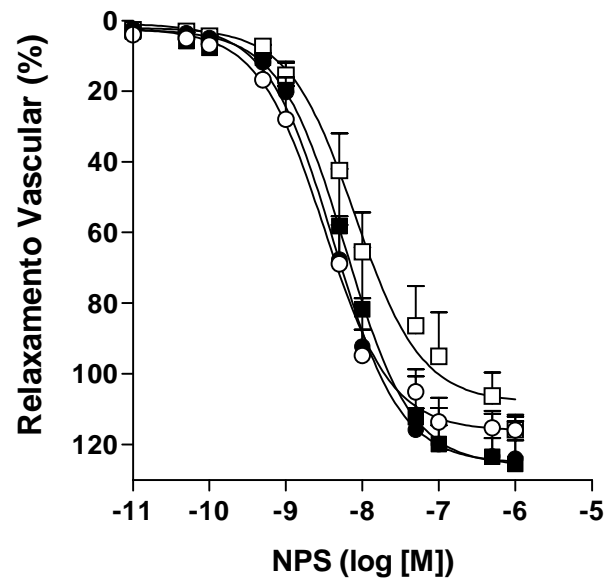
Além disso, a potência da acetilcolina em promover relaxamento, representada pelo  $pD_2$ , também não apresentou diferenças significativas entre os animais dos quatro grupos experimentais (Tabela 1;  $p > 0,05$ ).



A



B



**Figura 7:** Efeito da doxiciclina sobre o relaxamento vascular. Os relaxamentos, dependente (A) e independente (B) do endotélio, foram analisados utilizando concentrações cumulativas de Ach e NPS, respectivamente. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM ( $n = 5$  por grupo). \* e #  $p < 0,05$  versus 2R-1C e Sham, respectivamente.

**Tabela 1:** Valores de  $pD_2$  e efeito máximo (Emax) relacionados ao relaxamento dependente e independente do endotélio.

	Sham	Sham + doxi	2R1C	2R1C + doxi
<b><math>pD_2</math> Ach</b>	7.9 ± 0.3	7.8 ± 0.2	8.6 ± 0.3	8.2 ± 0.3
<b><math>pD_2</math> NPS</b>	8.5 ± 0.2	8.3 ± 0.1	7.9 ± 0.3	8.2 ± 0.2
<b>Emax Ach</b>	107.1 ± 2.3	104.3 ± 2.3	69.3 ± 3.7#	126.8 ± 16.8*
<b>Emax NPS</b>	115.9 ± 3.8	124.0 ± 5.2	115.8 ± 4.3	125.5 ± 12.2
<b>N</b>	5	5	5	5

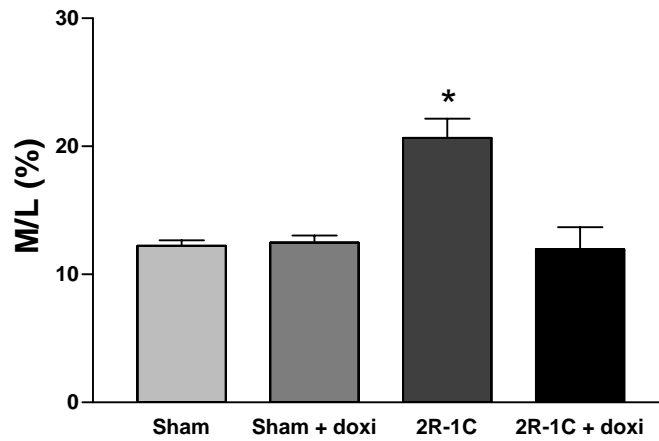
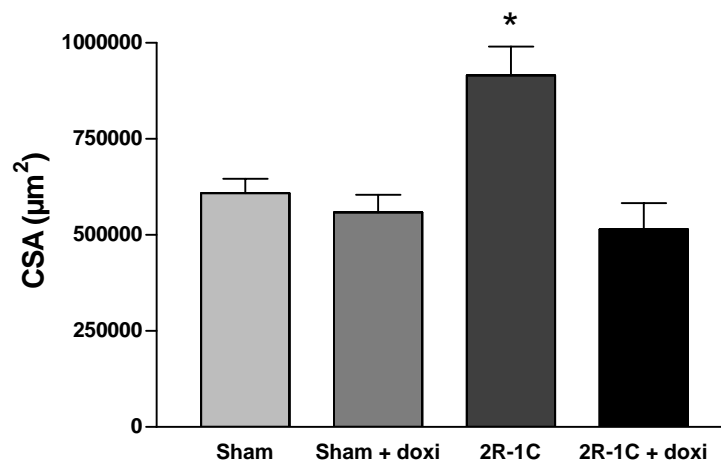
Os dados estão representados como média ± EPM. #  $p < 0,05$  versus grupo Sham e \* $p < 0,01$  versus grupo 2R-1C.

### **3- Efeito da doxiciclina sobre o remodelamento vascular em ratos 2R-1C.**

A atenuação da pressão arterial pela doxiciclina também pode estar relacionada diretamente aos efeitos desta droga sobre as MMPs e o remodelamento vascular crônico.

Como pode ser observado nas figuras abaixo, houve um aumento significativo tanto da razão M/L quanto do CSA nas aortas dos ratos 2R-1C em relação aos controles (todos,  $p < 0,01$ ). Estas alterações foram relacionadas principalmente a um aumento da espessura da camada média destas artérias; o que é típico de um remodelamento vascular hipertrófico. O tratamento com a doxiciclina reverteu completamente estes parâmetros estruturais observados nos animais hipertensos (Figura 8A e B, e Tabela 2;  $p < 0,01$ ), sem alterá-los nos animais controles.

Esta hipertrofia observada na aorta dos animais 2R-1C ocorreu em paralelo a um aumento da proliferação de células musculares lisas e da deposição de colágeno e elastina. Como representado abaixo, houve um aumento, de aproximadamente 45%, da quantidade de células musculares lisas nas aortas dos animais hipertensos em relação aos controles (Figura 9;  $p < 0,05$ ). Este aumento foi diretamente proporcional às deposições de colágeno e elastina observadas nestes animais (Figuras 10 e 11;  $p < 0,05$ ). O tratamento com a doxiciclina preveniu todas estas alterações estruturais nos animais hipertensos, de forma proporcional à redução do CSA analisado anteriormente. Não houve diferença destes parâmetros nos animais controles ( $p > 0,05$ ).

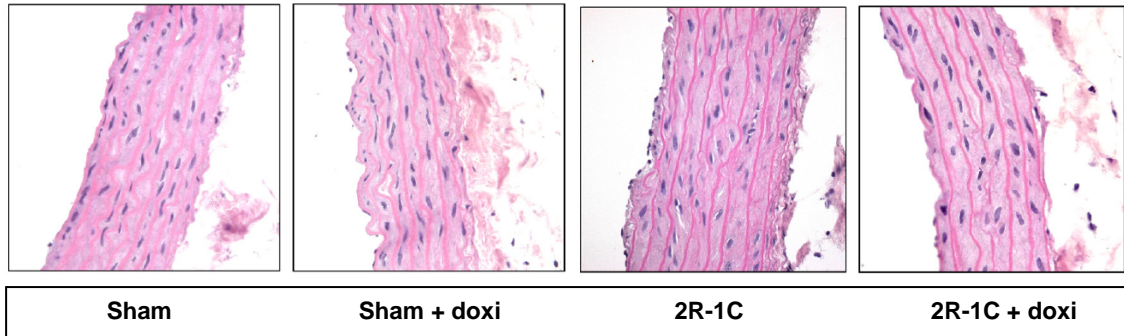
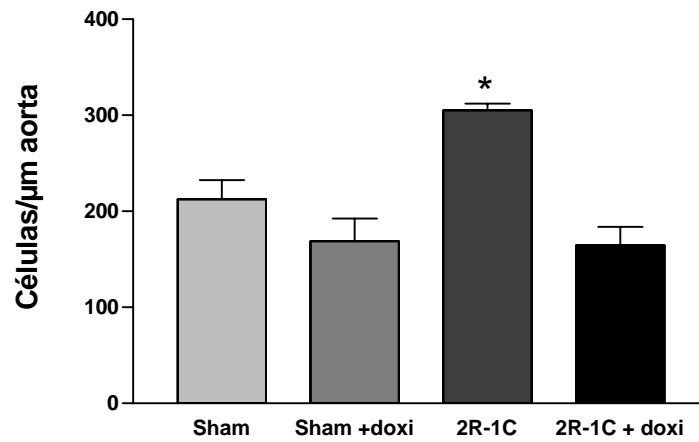
**A****B**

**Figura 8:** Efeito da doxiciclina sobre as alterações estruturais da aorta associadas à hipertensão. (A) Gráfico representativo da razão média/lúmen (M/L). (B) Gráfico representativo da área de secção transversal do corte (CSA), em  $\mu\text{m}^2$ . Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM (n = 5 por grupo). \*  $p < 0,01$  versus os controles e 2R-1C + doxi.

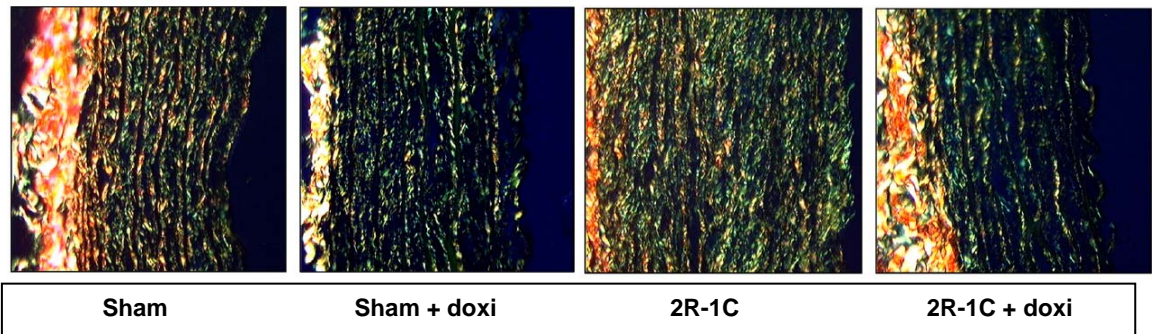
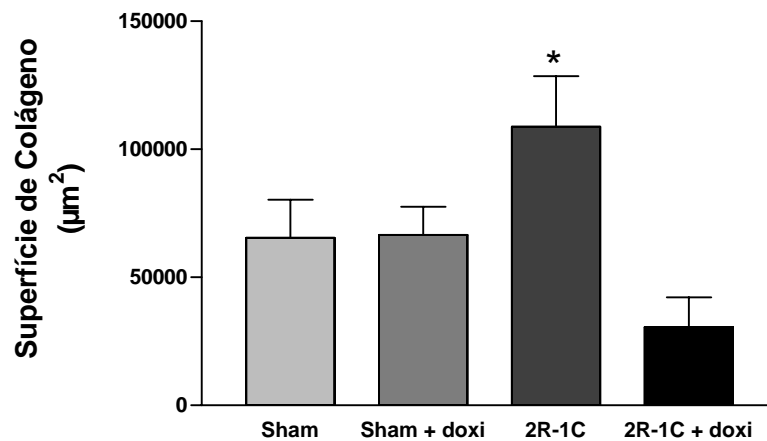
**Tabela 2:** Parâmetros estruturais da aorta referentes aos quatro grupos experimentais.

	<b>Sham</b>	<b>Sham + doxi</b>	<b>2R1C</b>	<b>2R1C + doxi</b>
<b>ID (µm)</b>	1726 ± 36	1631 ± 31	1598 ± 45	1613 ± 34
<b>ED (µm)</b>	1937 ± 42	1835 ± 43	1928 ± 55	1860 ± 48
<b>Media (µm)</b>	105.6 ± 4.8	102.1 ± 6.3	164.9 ± 11.4*	95.94 ± 12.87
<b>M/L (%)</b>	12.23 ± 0.44	12.49 ± 0.55	20.67 ± 1,48 *	11.96 ± 1.74
<b>CSA x 10<sup>3</sup> µm<sup>2</sup></b>	609 ± 37	558 ± 46	915 ± 75 *	514 ± 68
<b>N</b>	5	5	5	5

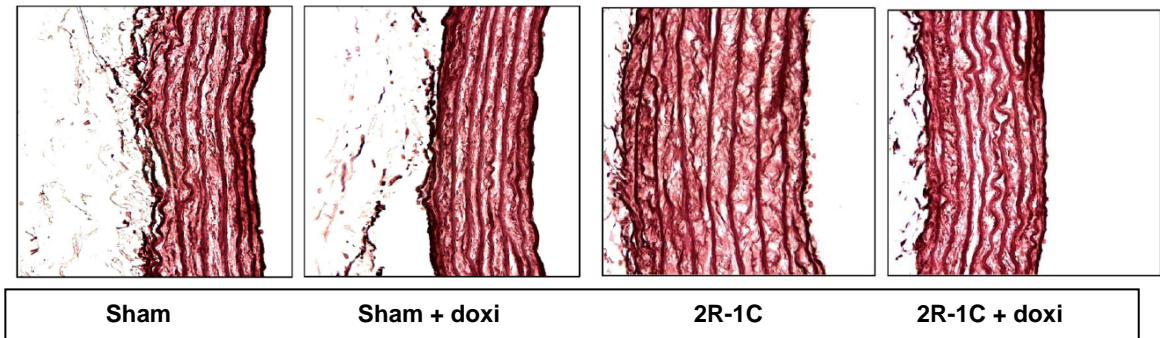
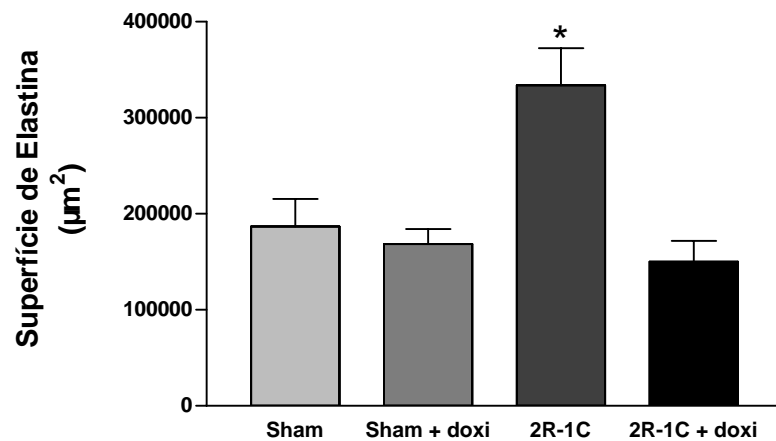
Os dados estão representados como média ± EPM. \*p<0,01 *versus* os controles e 2R-1C + doxi. ID: diâmetro interno. ED: diâmetro externo.

**A****B**

**Figura 9:** Efeito da doxiciclina sobre a proliferação de células musculares lisas. (A) Imagens ilustrativas, em 400x, da quantidade de núcleos na camada média das aortas, referentes aos quatro grupos experimentais. (B) Representação gráfica do número de células musculares lisas por μm de aorta. Os dados estão representados como média ± EPM (n = 5 por grupo). \*  $p < 0,05$  versus os controles e 2R-1C + doxi.

**A****B**

**Figura 10:** Efeito da doxiciclina sobre a deposição vascular de colágeno. (A) Imagens ilustrativas, em 400x, da superfície de colágeno na camada média das aortas, referentes aos quatro grupos experimentais. (B) Representação gráfica da área da superfície de colágeno em  $\mu\text{m}^2$ . Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM (n = 5 por grupo). \*  $p < 0,05$  versus os controles e 2R-1C + doxi.

**A****B**

**Figura 11:** Efeito da doxiciclina sobre a deposição vascular de elastina. (A) Imagens ilustrativas, em 400x, da superfície de elastina na camada média das aortas, referentes aos quatro grupos experimentais. (B) Representação gráfica da área da superfície de elastina, em  $\mu\text{m}^2$ . Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM (n = 5 por grupo). \*  $p < 0,05$  versus os controles e 2R-1C + doxi.



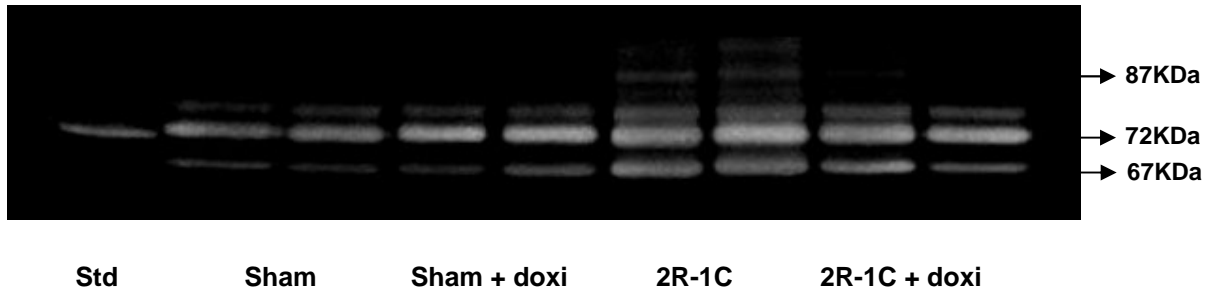
#### **4- Efeito da doxiciclina sobre as concentrações vasculares da MMP-2 em ratos 2R-1C.**

Para avaliar os efeitos da doxiciclina sobre as concentrações vasculares da MMP-2 foi utilizado o método convencional de zimografia em gel. A Figura 12A abaixo mostra um gel representativo dos extratos de aorta referentes aos quatro grupos experimentais. As bandas da pro-MMP-2 e da MMP-2 ativa foram representadas pelos seus respectivos pesos moleculares: 72 e 67 KDa.

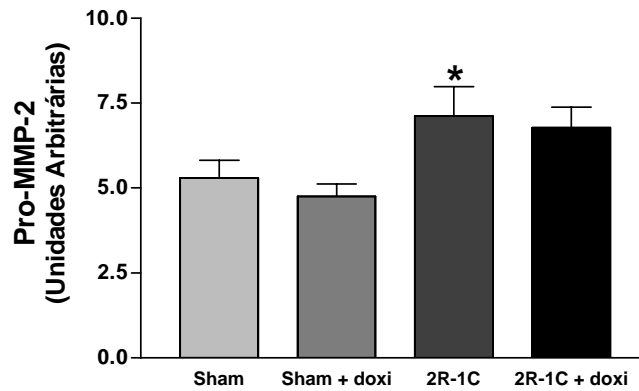
Foi observado um aumento significativo das concentrações vasculares, tanto da pro-MMP-2 quanto da MMP-2 ativa, nas aortas dos ratos hipertensos em relação aos animais controles: Sham e Sham + doxi (Figura 12B e 12C; ambos  $p < 0,05$ ). Entretanto, o tratamento com a doxiciclina não alterou, de forma significativa, estas concentrações enzimáticas elevadas nos animais hipertensos ( $p > 0,05$ ). Isto pode ser decorrente de alguma limitação da técnica de zimografia.

Além disso, foi observado no gel, que houve a formação de bandas de 87 KDa, referentes a MMP-9, apenas nos extratos de aorta dos animais hipertensos (2R-1C e 2R-1C + doxi); sendo que a intensidade destas bandas foram maiores para os animais 2R-1C.

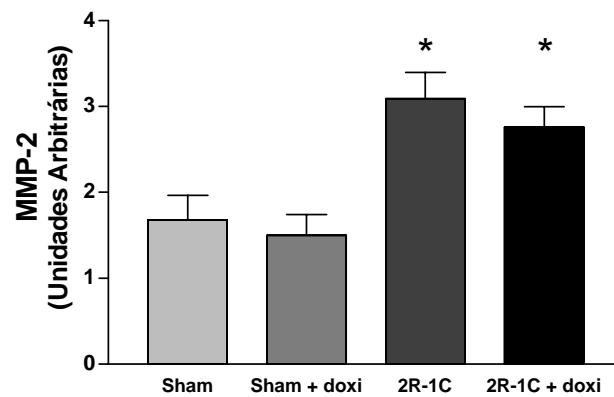
A



B



C



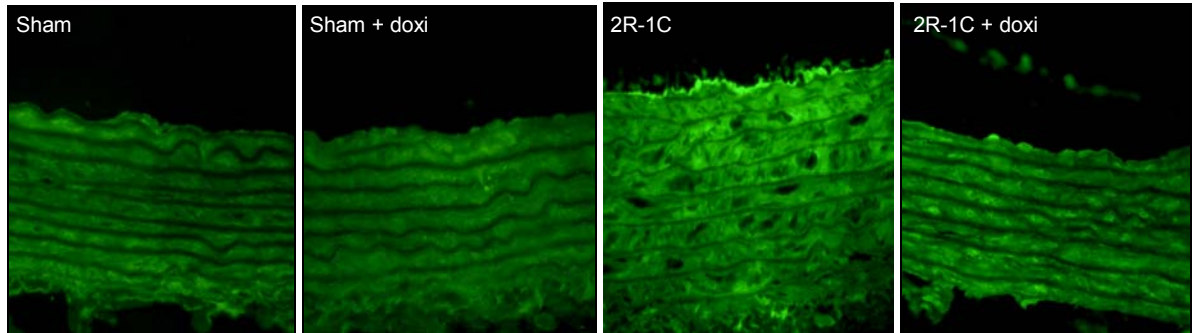
**Figura 12:** (A) Gel representativo dos extratos de aorta dos animais dos 4 grupos experimentais. As formas pro e ativa da MMP-2, e a MMP-9, estão indicadas no gel pelas bandas de 72, 67 e 87 KDa, respectivamente. (B) Representação gráfica das concentrações vasculares da pro-MMP-2 e (C) da MMP-2 ativa nos extratos de aorta. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM (n = 9-15 por grupo). \*  $p < 0,01$  versus os grupos controles.

### **5- Efeito da doxíciclina sobre a atividade gelatinolítica *in situ* em ratos 2R-1C.**

A atividade gelatinolítica foi avaliada nas aortas pelo método de zimografia *in situ*. Diferente da zimografia convencional, este método reflete a atividade das MMPs diretamente nos tecidos.

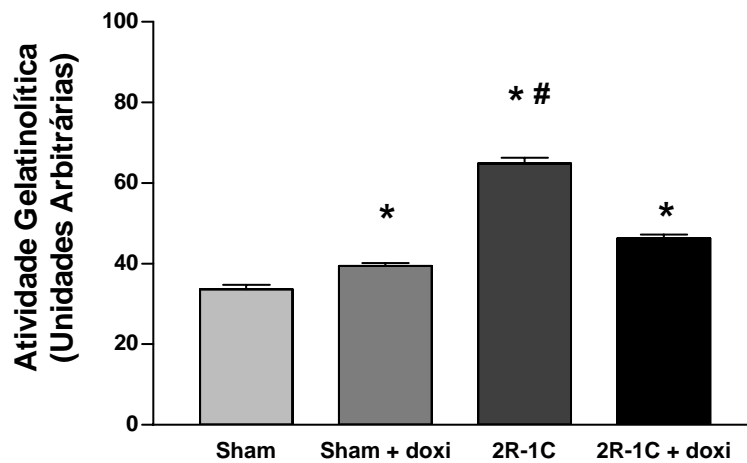
Foi observado um aumento significativo da atividade gelatinolítica total, na camada média e endotélio, das aortas dos ratos hipertensos em relação aos controles (Figura 13A e 13B;  $p < 0,05$ ). O tratamento com a doxíciclina preveniu completamente este aumento da atividade nos animais hipertensos ( $p < 0,05$ ), sem alterá-la nos animais controles ( $p > 0,05$ ). Entretanto, este método não é capaz de diferenciar as ações das duas gelatinase.

A



**Figura 13A:** Efeito da doxíciclina sobre a atividade gelatinolítica *in situ*. (A) Imagens ilustrativas, em 400x, da atividade gelatinolítica total, na camada média e endotélio, das aortas referentes aos quatro grupos experimentais. A fluorescência verde reflete esta atividade via degradação da gelatina (fluoróforo).

B

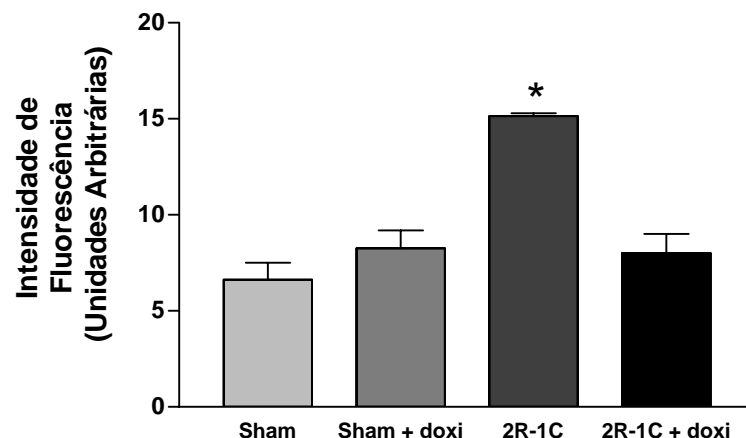


**Figura 13B:** Efeito da doxíciclina sobre a atividade gelatinolítica *in situ*. (B) Quantificação da intensidade de fluorescência na camada média e endotélio das aortas. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM ( $n = 4$  por grupo). \* e #  $p < 0,01$  versus os controles e 2R-1C + doxi, respectivamente.

## 6- Efeito da doxiciclina sobre atividade específica da MMP-2 em ratos 2R-1C.

Para avaliar os efeitos da doxiciclina sobre a atividade específica da MMP-2 foi utilizado o método de captura de anticorpo. Diferente da zimografia convencional e da zimografia *in situ*, este método determina a atividade específica, *in vivo*, da MMP-2.

Como pode ser observado no gráfico abaixo, houve um aumento significativo da atividade da MMP-2 nos extratos de aortas dos ratos hipertensos em relação aos controles (Figura 14;  $p < 0,05$ ); similar ao que ocorreu com a quantidade de proteína ativa na zimografia. O tratamento com a doxiciclina reverteu completamente esta atividade elevada da MMP-2 nos animais hipertensos ( $p < 0,05$ ), sem alterá-la nos animais controles ( $p > 0,05$ ). Isto sugere que a MMP-2 pode apresentar um importante papel nas alterações estruturais e funcionais dos vasos observadas nesta doença.



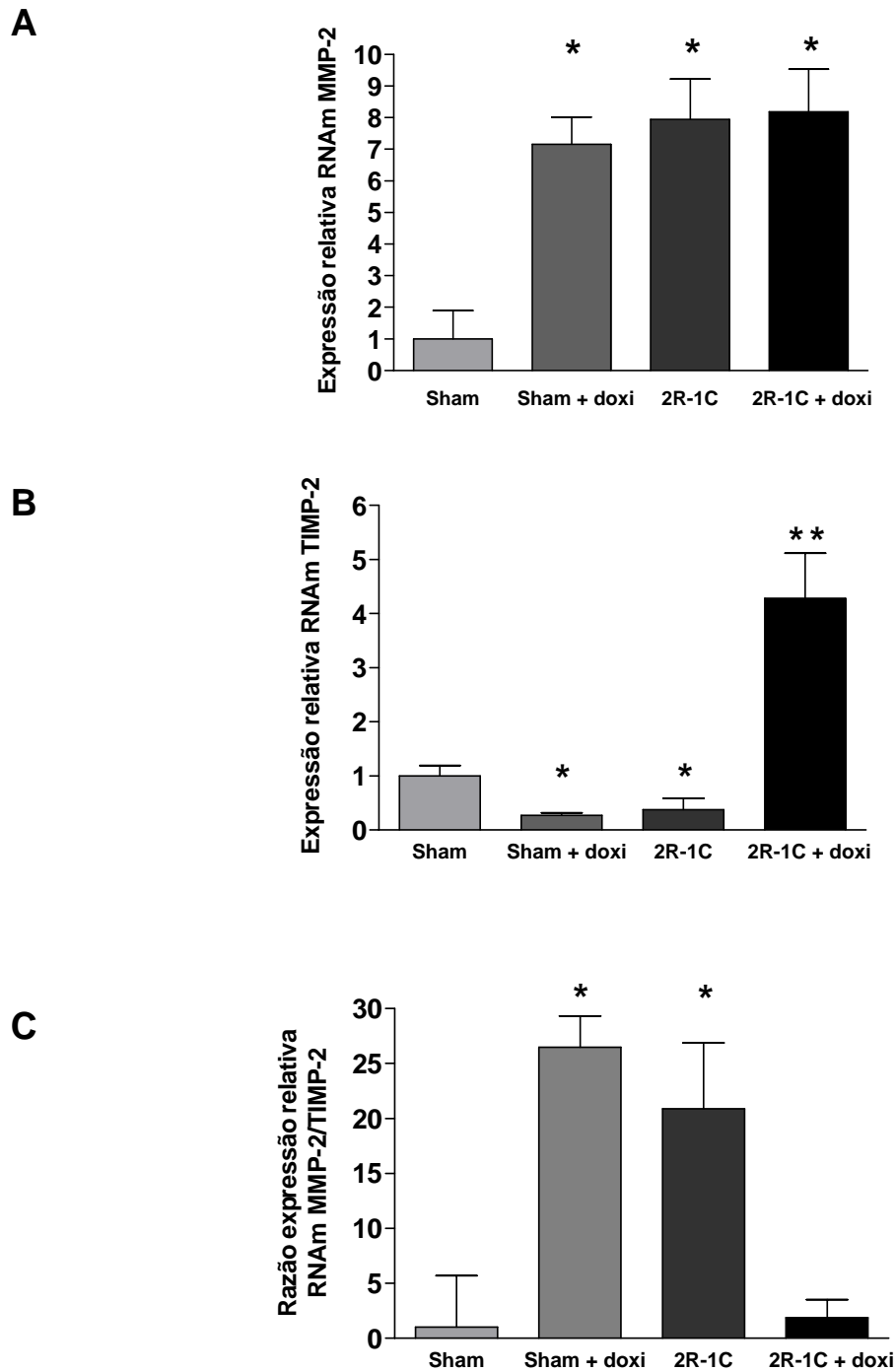
**Figura 14:** Efeito da doxiciclina sobre a atividade específica da MMP-2. Representação gráfica da atividade, determinada por espectrofluorimetria. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM (pools de aorta de 3-4 animais). \*  $p < 0,05$  versus os controles e 2R-1C + doxi.

## **7- Efeito da doxíciclina sobre a expressão gênica do RNAm da MMP-2 e do TIMP-2 em ratos 2R-1C.**

Além da atividade, avaliou-se também a expressão gênica do RNAm da MMP-2 e de seu inibidor TIMP-2, em extratos de aorta, por Real-Time RT-PCR. Foi observado um aumento significativo da expressão do RNAm da MMP-2 nas aortas dos ratos 2R-1C, quando comparados com os controles (Figura 15A;  $p < 0,01$ ); o que foi similar aos resultados de atividade observados anteriormente. O contrário ocorreu para expressão do TIMP-2. Houve uma diminuição significativa de sua expressão nas aortas dos animais hipertensos em relação aos controles (Figura 15B;  $p < 0,05$ ).

Interessantemente, o tratamento com a doxíciclina aumentou a expressão da MMP-2 nas aortas dos animais Sham + doxi quando comparados ao grupo Sham (Figura 15A;  $p < 0,01$ ). Este aumento pode ter ocorrido por adaptação do organismo frente à inibição destas enzimas em situações fisiológicas. Já em relação aos animais hipertensos, o tratamento com a doxíciclina não alterou a expressão da MMP-2 em relação aos 2R-1C. Entretanto, aumentou significativamente a expressão gênica do TIMP-2 nestes animais (Figura 15B;  $p < 0,01$ ). Este efeito sobre o TIMP-2 não foi observado nos animais controles.

Com base nestes resultados, a razão MMP-2/TIMP-2 foi significativamente menor nos animais 2R-1C + doxi quando comparados aos seus controles hipertensos; e significativamente maior nos animais Sham + doxi em relação ao grupo Sham (Figura 15C;  $p < 0,01$ ).



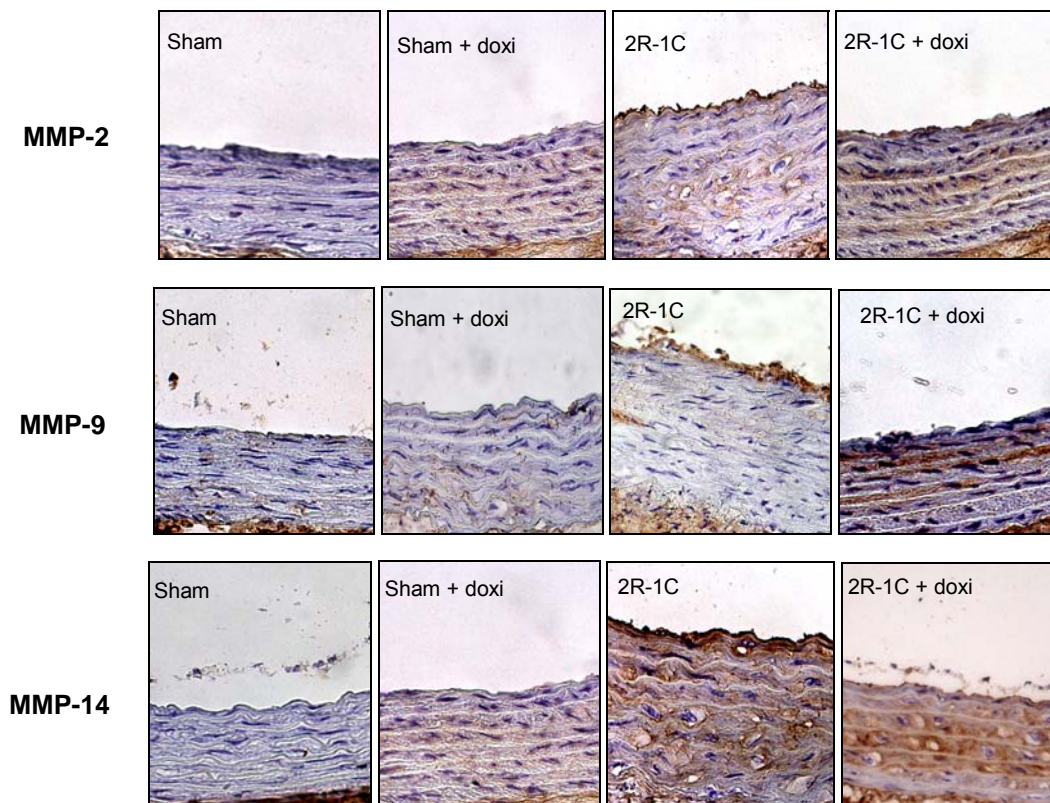
**Figura 15:** Efeito da doxíciclina sobre a expressão gênica do RNAm da MMP-2 e do TIMP-2. (A) Representação gráfica das concentrações do RNAm da MMP-2 e (B) do TIMP-2, determinadas por Real-Time RT-PCR. (C) Representação gráfica da razão MMP-2/TIMP-2. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM ( $n = 5-6$  por grupo). \*  $p < 0,01$  versus grupo Sham; e \*\* $p < 0,01$  versus os outros três grupos.

## 8- Efeito da doxiciclina sobre a expressão da MMP-2, 9 e 14 em ratos 2R-1C.

Para verificar se o aumento da expressão da MMP-2 ocorre em paralelo a outras MMPs, como a MMP-9 e a MMP-14, foi utilizado o método de imunohistoquímica. A MMP-14 foi analisada por ser uma das principais responsáveis pela ativação proteolítica da MMP-2.

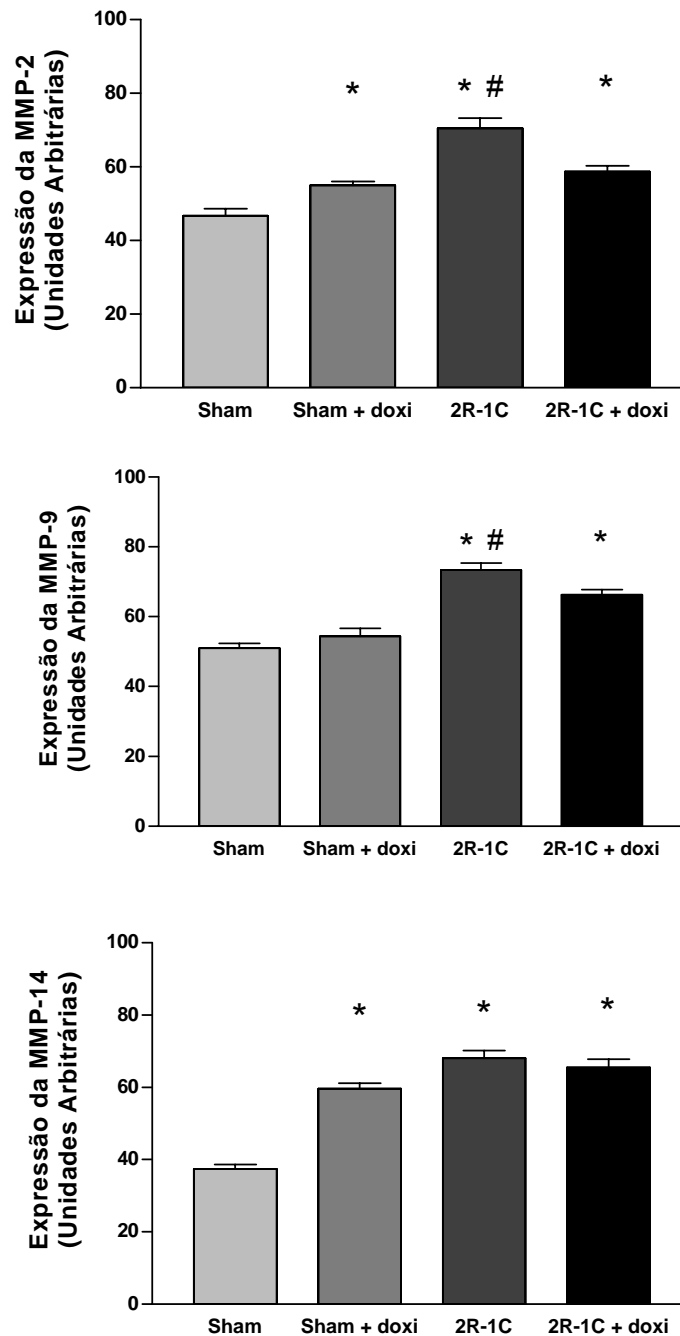
Observa-se pelas figuras abaixo, que houve um aumento significativo da expressão destas três MMPs, na camada média e endotélio, nas aortas dos animais 2R-1C em relação aos controles (Figura 16A e 16B; todos  $p < 0,01$ ). O tratamento com a doxiciclina atenuou esta expressão aumentada da MMP-2 e da MMP-9, mas não da MMP-14 ( $p > 0,05$ ), nestes animais hipertensos ( $p < 0,05$ ); sem produzir efeitos nos controles. Isto sugere que, provavelmente, outros fatores, além da MMP-14, estejam contribuindo para a ativação da MMP-2 nestes animais.

### A





B



**Figura 16:** Efeito da doxíciclina sobre a expressão da MMP-2, 9 e 14. (A) Imagens ilustrativas, em 400x, da expressão das três MMPs (em marrom) na camada média e endotélio das aortas, referentes aos quatro grupos experimentais. (B) Quantificação da intensidade de cor, na média e endotélio, das três MMPs. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM (n = 4 por grupo). \*p<0,01 versus os controles; e # p< 0,05 versus 2R-1C + doxi.

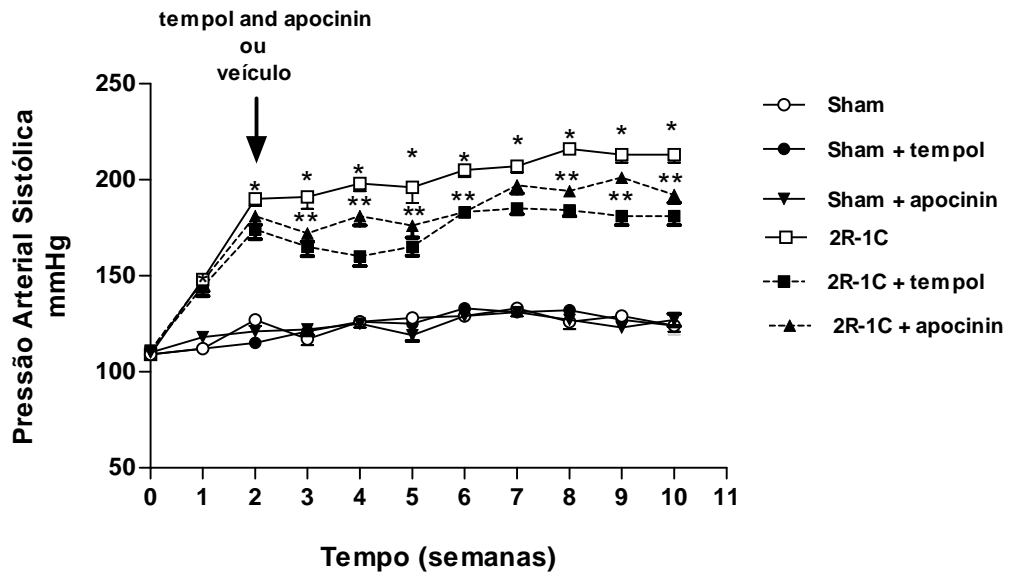
## **Protocolo 2: Efeitos vasculares do tratamento de ratos 2R-1C com antioxidantes.**

### **1- Efeito dos Antioxidantes sobre pressão arterial e peso corporal em ratos 2R-1C.**

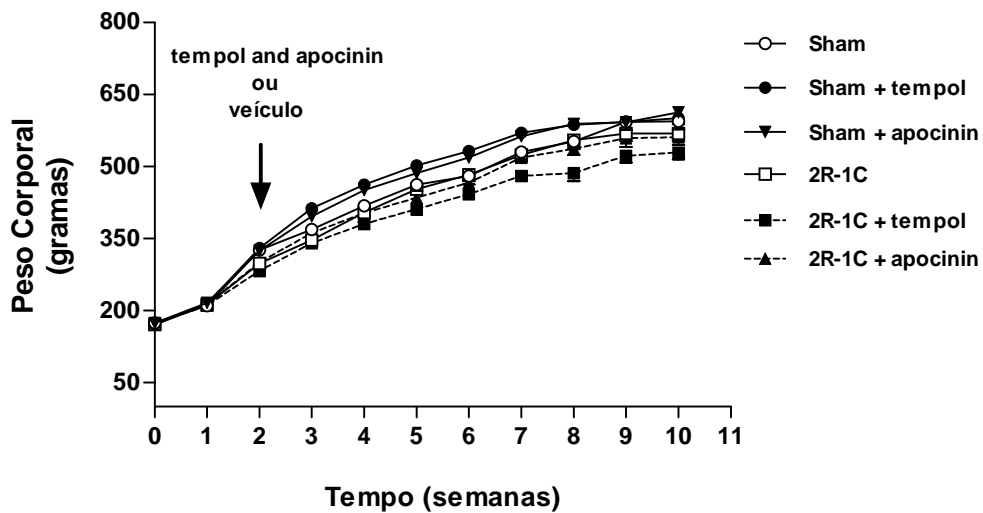
Os valores basais de pressão arterial e peso corporal foram similares entre os animais dos seis grupos experimentais (Figura 17A e 17B). Entretanto, logo na primeira semana após a cirurgia, foi observado um aumento significativo da pressão arterial nos ratos do grupo 2R-1C quando comparados com os controles (Sham e Sham + antioxidantes;  $p < 0,01$ ). Este aumento da pressão continuou constante durante todo o período de estudo. Como podemos observar pelo gráfico 12A, a partir da primeira semana de tratamento, ambos os antioxidantes atenuaram este aumento da pressão nos animais hipertensos (Figura 17A;  $p < 0,05$ ), sem alterá-la nos animais controles. Aparentemente, o tempol foi mais eficiente que o apocinin em atenuar estas ações nos animais 2R-1C.

Em relação ao peso corporal, não houve diferenças significativas entre os animais dos seis grupos experimentais (Figura 17B).

A



B



**Figura 17:** Efeito dos antioxidantes sobre a pressão arterial e o peso corporal. Evolução da pressão arterial sistólica, em mmHg (A), e do peso corporal, em gramas (B) durante oito semanas de tratamento. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM ( $n = 20$  por grupo). \*  $p < 0,01$  e \*\*  $p < 0,05$  versus os três grupos controles e 2R-1C, respectivamente.

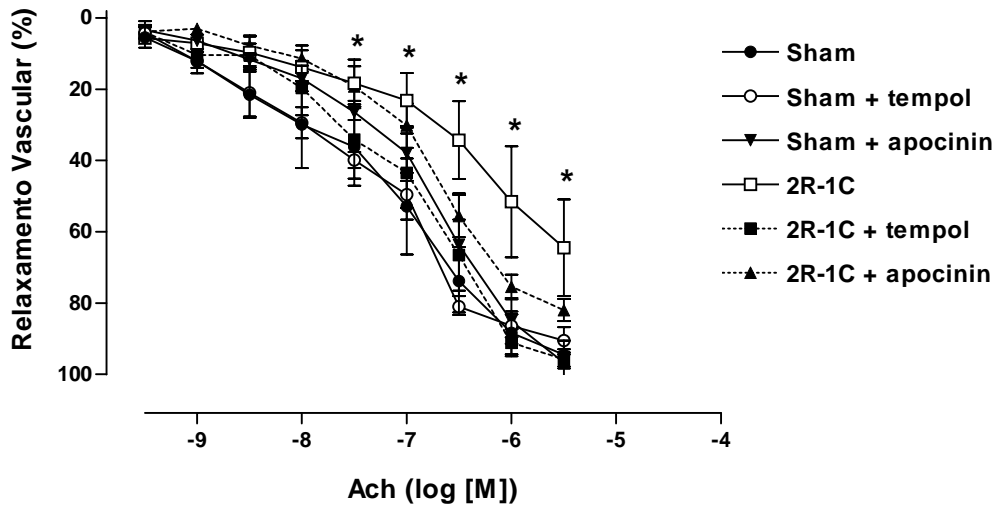
## **2- Efeito dos antioxidantes sobre a função endotelial em ratos hipertensos 2R-1C.**

A atenuação da pressão arterial, pelos antioxidantes, pode estar relacionada diretamente aos efeitos destas drogas sobre EROs e a disfunção endotelial. Para testar esta hipótese, o relaxamento vascular, dependente e independente do endotélio, foi analisado em um sistema de banho para órgãos isolados, na presença de concentrações cumulativas de Ach ( $10^{-11}$ - $10^{-5}$  mol/L) e de NPS ( $10^{-11}$ - $10^{-6}$  mol/L), respectivamente (Figura 18A e 18B).

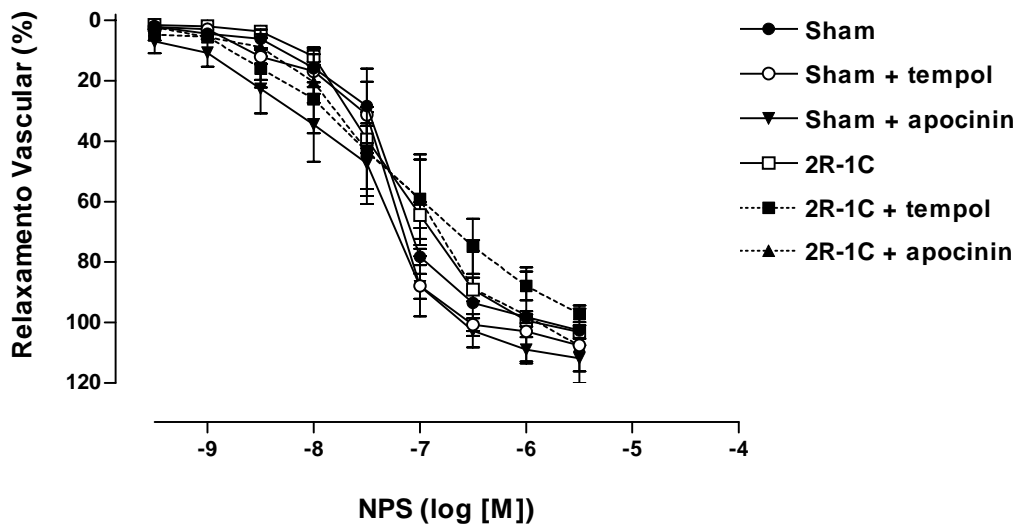
Como pode ser observado na figura 18A, o relaxamento dependente do endotélio, induzido pela Ach, foi menor nas aortas dos ratos hipertensos, quando comparado aos animais controles (Figura 18A;  $p < 0,05$ ). O tratamento com ambos antioxidantes atenuou este comprometimento endotelial nos animais hipertensos; observado por uma melhora no relaxamento dependente do endotélio pela acetilcolina (Figura 18A;  $p < 0,05$ ). Entretanto, não houve diferença estatística entre os ratos 2R-1C + apocinin e seus controles hipertensos ( $p > 0,05$ ).

Em relação ao relaxamento independente do endotélio, induzido pelo NPS, não houve diferenças significativas entre os animais dos seis grupos experimentais (Figura 18B).

A



B



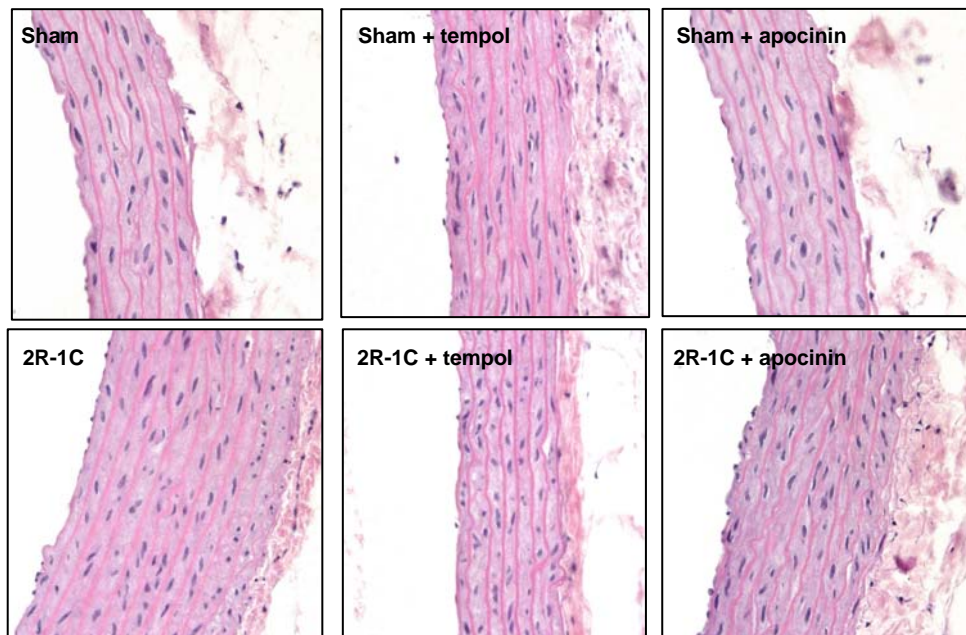
**Figura 18:** Efeito dos antioxidantes sobre o relaxamento vascular. Os relaxamentos, dependente (A) e independente (B) do endotélio, foram analisados utilizando concentrações cumulativas de Ach e NPS, respectivamente. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM (n = 6 por grupo). \* $p < 0,05$  versus os três grupos controles e 2R-1C + tempol.

### 3- Efeito dos antioxidantes sobre o remodelamento vascular em ratos 2R-1C.

Como vimos anteriormente, o aumento da razão M/L, do CSA e da espessura da camada média da aorta são os principais parâmetros relacionados ao remodelamento vascular crônico em ratos 2R-1C. Estas alterações podem ser visualizadas na figura 12 abaixo. Neste caso, apenas o tratamento com o tempol foi capaz de prevenir as alterações estruturais observadas nestes animais (Figura 19A e 19B;  $p < 0,05$ ).

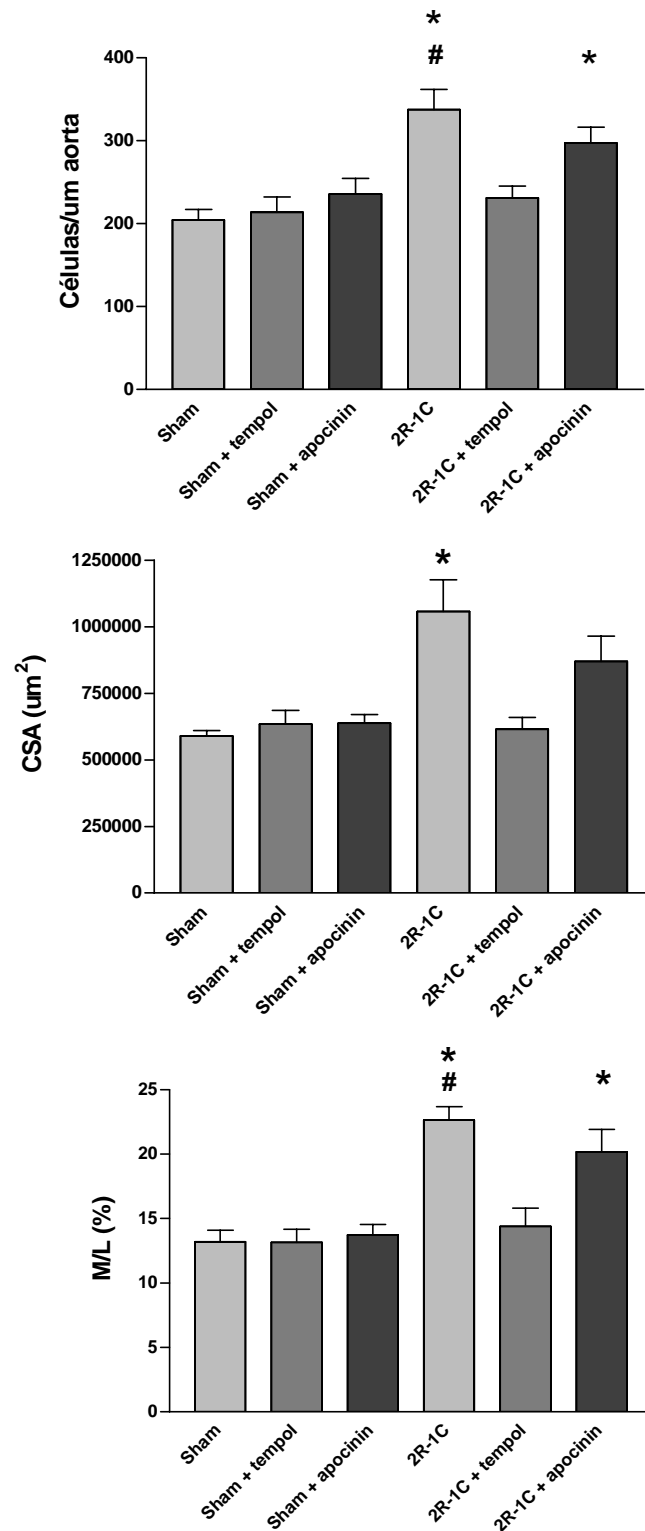
Esta hipertrofia vascular ocorreu em paralelo a um aumento da proliferação de células musculares lisas nas aortas dos animais 2R-1C (Figura 19A e 19B;  $p < 0,01$ ). Novamente, apenas o tratamento com o tempol preveniu estas alterações nestes animais ( $p < 0,01$ ), sem produzir efeitos similares nos controles ( $p > 0,05$ ).

**A**



**Figura 19:** Efeito dos antioxidantes sobre alterações estruturais da aorta associadas à hipertensão. (A) Imagens ilustrativas, em 400x, da quantidade de núcleos na camada média das aortas referentes aos seis grupos experimentais.

B



**Figura 19:** Efeito dos antioxidantes sobre alterações estruturais da aorta associadas à hipertensão. (B) Gráficos relacionados ao número de células musculares lisas por  $\mu\text{m}$  de aorta, área de secção transversal do corte (CSA) e razão média/lúmen (M/L). Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM ( $n = 6$  por grupo). \*  $p < 0,05$  versus os três grupos controles, e #  $p < 0,01$  versus 2R-1C + tempol.

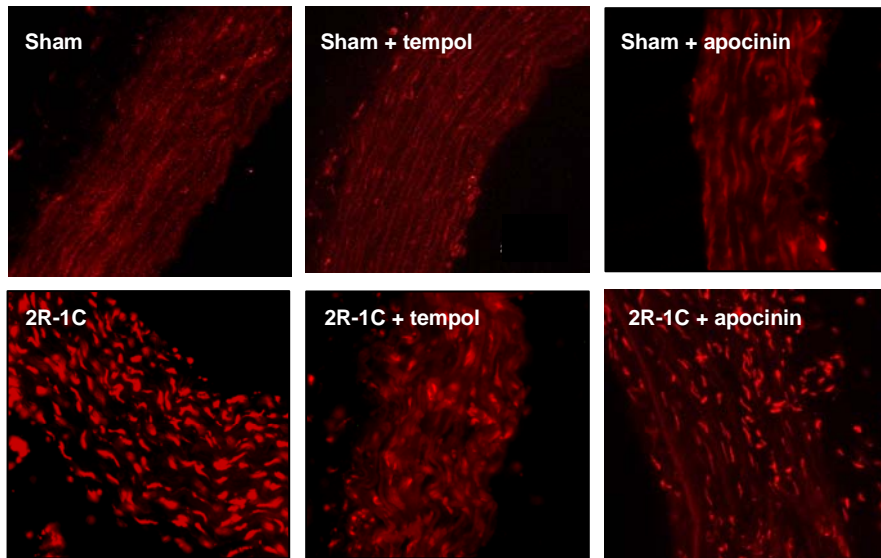
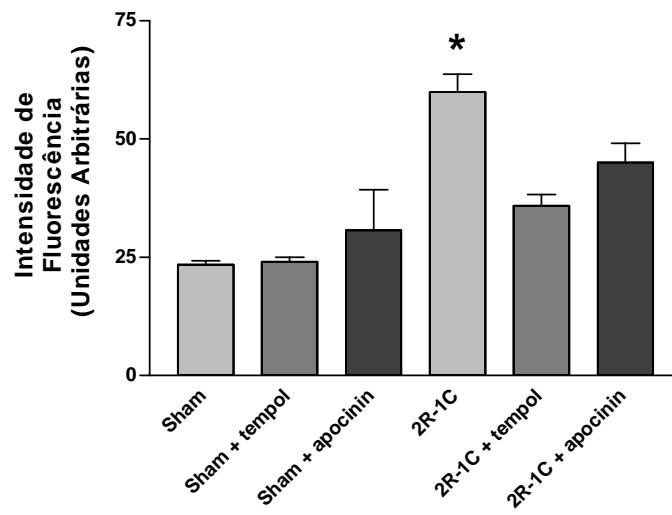
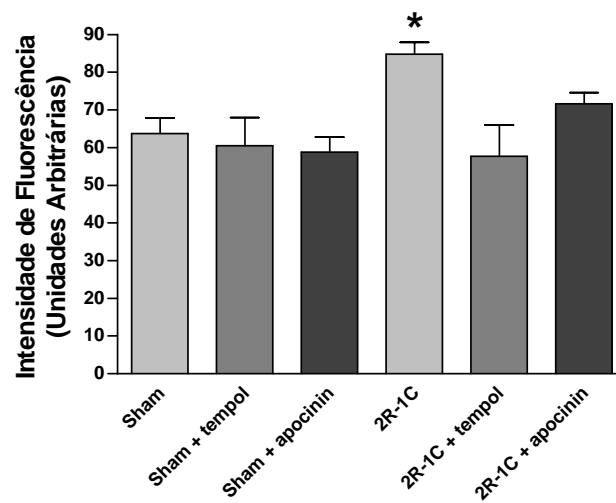
#### **4- Efeito dos antioxidantes sobre as concentrações vasculares e sistêmicas de EROs em ratos 2R-1C.**

A atenuação da pressão arterial e das alterações vasculares, observadas anteriormente, podem estar relacionadas aos efeitos dos antioxidantes sobre as concentrações vasculares e sistêmicas das EROs. Sua produção vascular foi analisada tanto na camada média da aorta, por microscopia de fluorescência, quanto nas células endoteliais, por citometria de fluxo.

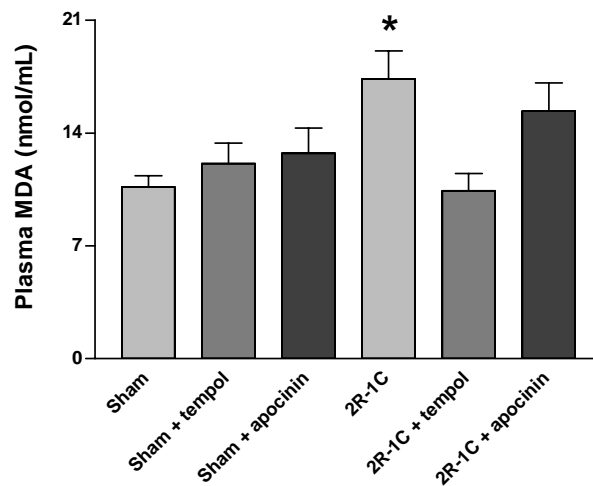
Foi observado um aumento significativo das concentrações das EROs, na média e no endotélio, das aortas dos animais hipertensos em relação aos controles (Figura 20A, 20B e 20C; todos  $p < 0,05$ ). O tratamento com ambos antioxidantes atenuou estas concentrações elevadas nestes animais ( $p < 0,05$ ), sem alterá-las nos animais controles. Aparentemente, o tempol foi mais eficiente que o apocinin em atenuar estas ações nos animais 2R-1C, em ambas as células.

O estresse oxidativo também foi analisado no plasma pela quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, como descrito anteriormente. O gráfico 15D abaixo mostra um aumento significativo das concentrações de MDA no plasma dos animais 2R-1C quando comparados com os controles (Figura 20D;  $p < 0,05$ ). Entretanto, neste caso, o tratamento com tempol, mas não com apocinin, reverteu estas concentrações plasmáticas elevadas nos animais hipertensos ( $p < 0,05$ ), sem alterá-las nos animais controles.



**A****B****C**

D

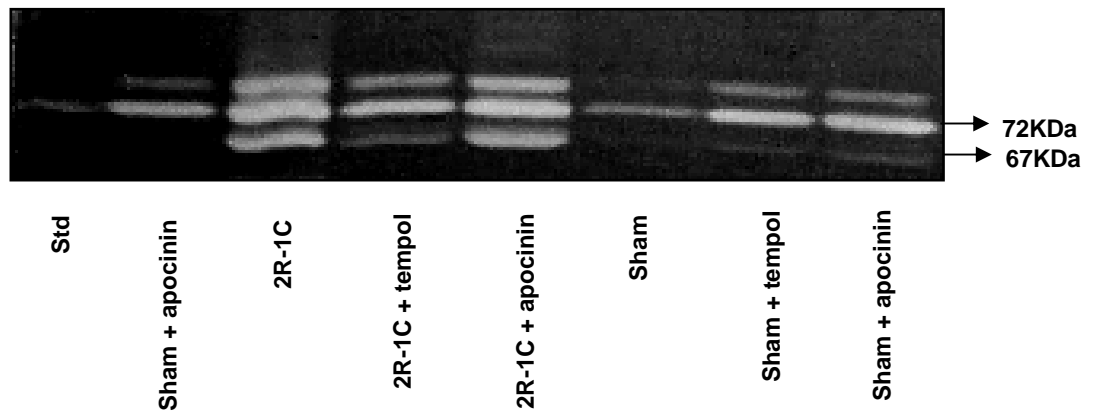


**Figura 20:** Efeito dos antioxidantes sobre as concentrações vasculares e sistêmicas das EROs associadas à hipertensão. (A) Imagens ilustrativas, em 400x, da concentração vascular de EROs na camada média das aortas, referentes aos seis grupos experimentais. A fluorescência vermelha representa os produtos da reação do DHE com o  $\cdot\text{O}_2^-$ . (B) Quantificação da intensidade de fluorescência presente na camada média das aortas. (C) Quantificação da intensidade de fluorescência nas células endoteliais, por citometria de fluxo. (D) Concentrações plasmáticas de TBARS, expressas na forma de MDA. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM (n = 5-12 por grupo). \*  $p < 0,05$  versus todos os seis grupos; e (D) \* $p < 0,05$  versus Sham e 2R-1C + tempol.

## **5- Efeito dos antioxidantes sobre a atividade e expressão da MMP-2 em ratos 2R-1C.**

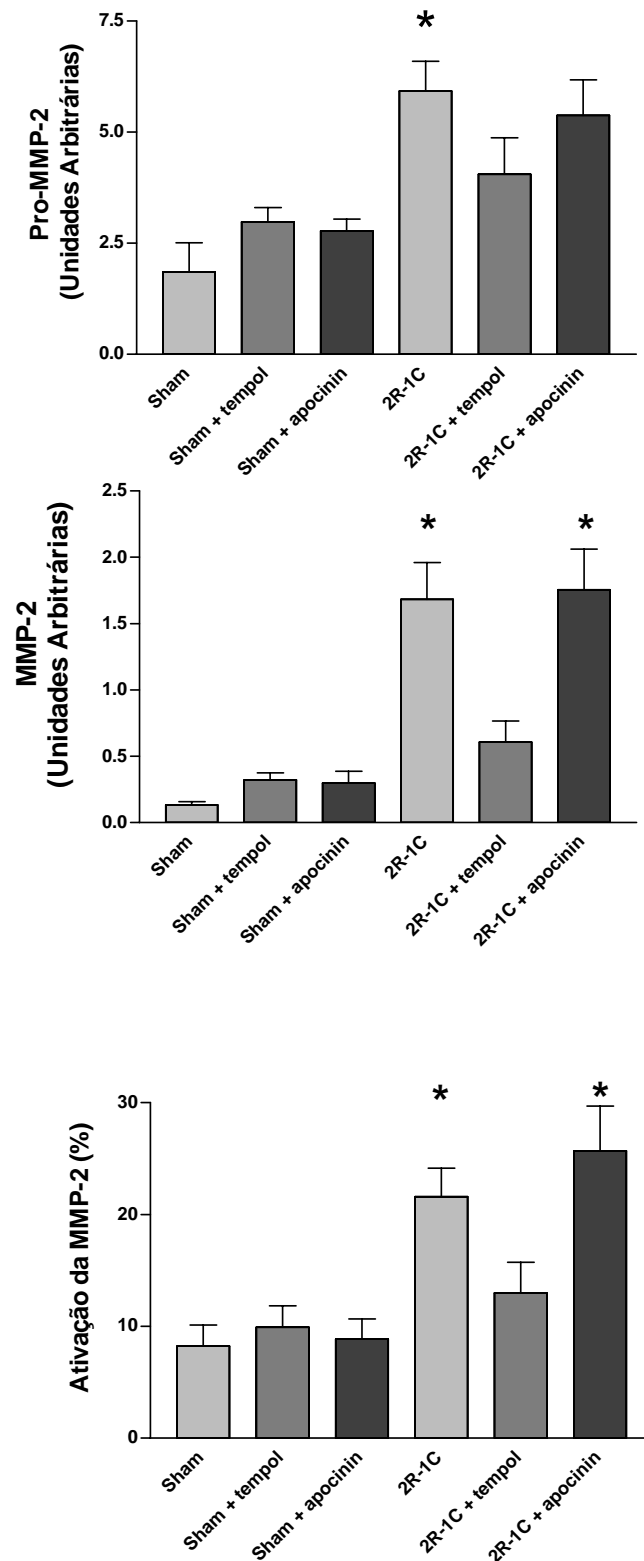
Com objetivo de verificar se as EROs podem ter alguma participação no aumento da atividade e expressão da MMP-2, observado na hipertensão renovascular, foi utilizado, inicialmente, o método convencional de zimografia em gel. A Figura 21A abaixo mostra um gel representativo dos extratos de aorta dos animais, dos seis grupos experimentais. Observa-se as bandas referentes à pro-MMP-2 (72 KDa) e à MMP-2 ativa (67 KDa).

Como pode ser observado, ocorreu um aumento significativo das concentrações vasculares de ambas as formas da MMP-2, além de um aumento da porcentagem de sua ativação, nos animais hipertensos em relação aos controles (Figura 21B;  $p < 0,05$ ). O tratamento com o tempol, mas não com o apocinin, reverteu completamente o aumento da ativação enzimática da MMP-2 nos animais hipertensos, assim como suas concentrações vasculares (Figura 21B;  $p < 0,05$ ); o que já não foi observado para os grupos controles ( $p > 0,05$ ).

**A**

**Figura 21:** (A) Gel representativo dos extratos de aorta referentes aos animais dos seis grupos experimentais. As formas pro e ativa da MMP-2 estão identificadas no gel pelas bandas de 72 e 67 KDa, respectivamente.

B



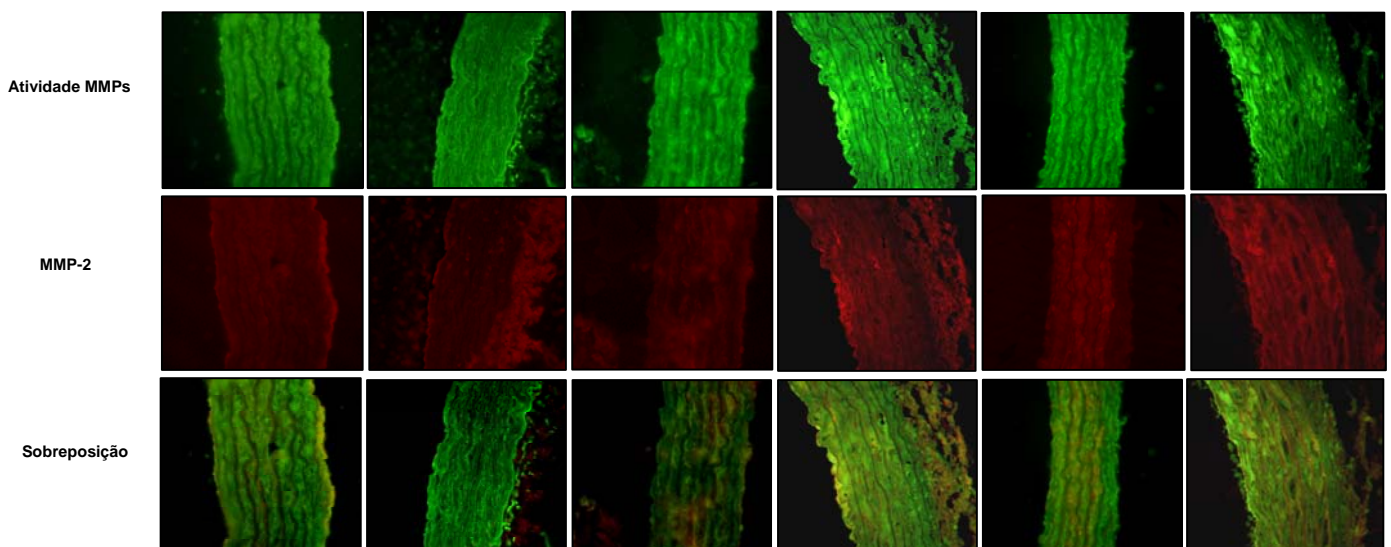
**Figura 21:** (B) Concentrações vasculares da pro-MMP-2 e MMP-2 ativa, e porcentagem de ativação da MMP-2 nos extratos de aorta referentes aos seis grupos experimentais. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM (n = 7-12 por grupo). \*  $p < 0,05$  versus os três grupos controles e 2R-1C + tempol.

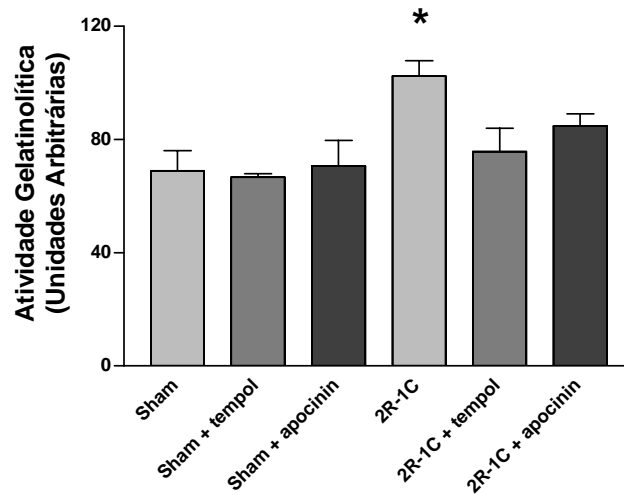
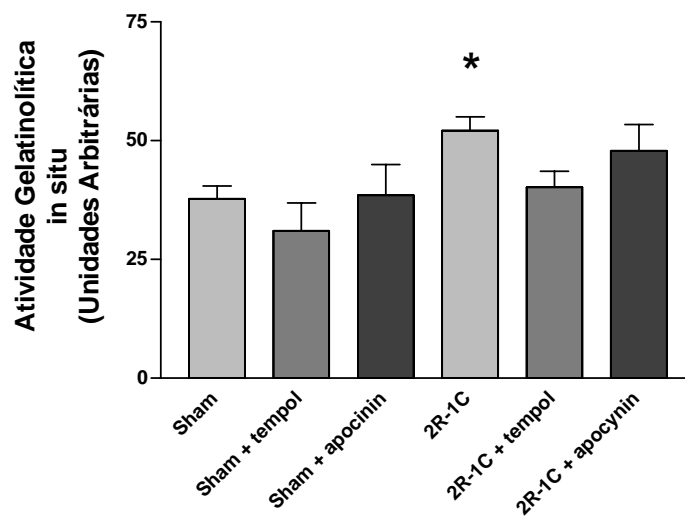
Além da determinação da quantidade de proteína ativa no gel, foi avaliado também a atividade gelatinolítica total destas MMPs, em extratos de aorta e *in situ*, nos animais referentes aos seis grupos experimentais.

Foi observado um aumento significativo da atividade gelatinolítica total destas MMPs, tanto nos extratos quanto na camada média e endotélio, nas aortas dos ratos hipertensos em relação aos controles (Figura 22A, 22B e 22C;  $p < 0,05$ ); similar ao que ocorreu com a quantidade de proteína ativa na zimografia. O tratamento com os antioxidantes atenuou esta atividade elevada nos animais hipertensos (Figura 22A, 22B e 22C;  $p < 0,05$ ), embora não haja diferença estatística para os ratos 2R-1C+ apocinin ( $p > 0,05$ ) em ambos os experimentos.

Como pode ser observado na figura, houve uma sobreposição desta atividade gelatinolítica com a expressão da MMP-2 nos tecidos. Isto sugere que grande parte da atividade gelatinolítica observada nos animais hipertensos pode decorrer da atividade da MMP-2.

## A



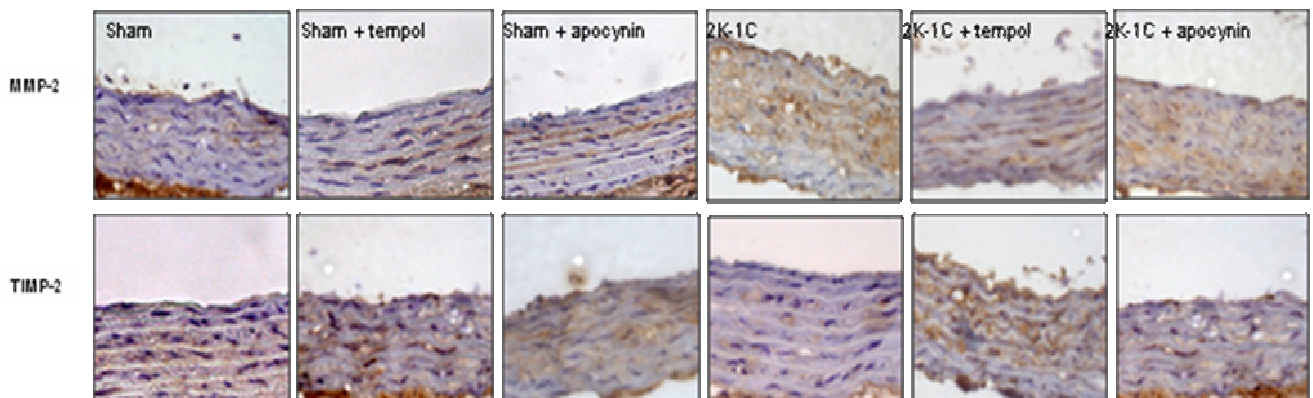
**B****C**

**Figura 22:** Efeito dos antioxidantes sobre a atividade gelatinolítica total e expressão da MMP-2. (A) Imagens ilustrativas, em 400x, da atividade gelatinolítica total, da expressão da MMP-2 e sobreposição de ambas, na camada média e endotélio, das aortas referentes aos seis grupos experimentais. A fluorescência verde reflete a atividade enzimática via degradação da gelatina (fluoróforo); enquanto que a vermelha indica a presença da MMP-2. (B) Atividade gelatinolítica total em extratos de aorta. (C) Quantificação da intensidade de fluorescência *in situ*, na camada média e endotélio das aortas. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM (n = 4-8 por grupo). \* $p < 0,05$  versus os três grupos controles e 2R-1C + tempol.

A expressão da MMP-2 também foi avaliada pelo método de imunohistoquímica. Observa-se pela figura abaixo, que houve um aumento significativo da expressão da MMP-2, na camada média e endotélio, nas aortas dos animais 2R-1C em relação aos controles (Figura 23A e 23B;  $p < 0,05$ ). Novamente, o tratamento com o tempol, mas não com o apocinin, preveniu esta expressão elevada nos animais hipertensos ( $p < 0,05$ ), sem alterá-la nos animais controles ( $p > 0,05$ ).

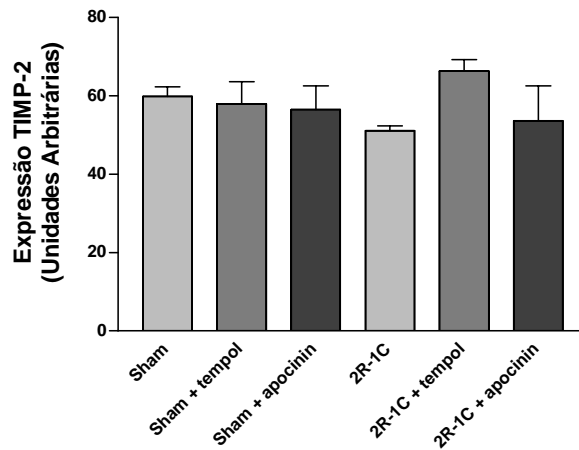
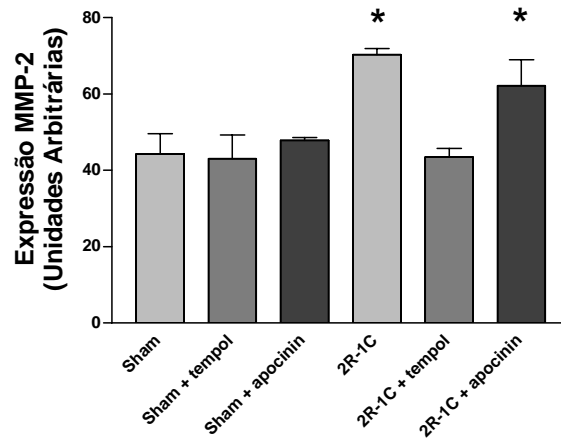
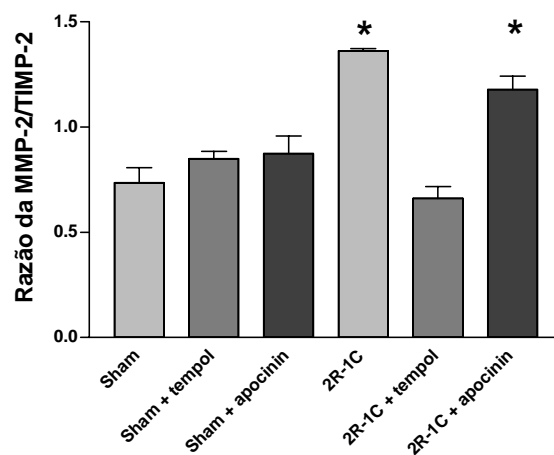
Estas alterações de expressão não foram observadas para o TIMP-2. O gráfico 23B mostra que não houve diferenças significativas entre os animais dos seis grupos experimentais ( $p > 0,05$ ). Entretanto, a razão da MMP-2/TIMP-2 foi maior para os animais hipertensos quando comparada aos animais controles (Figura 23C;  $p < 0,05$ ). Enquanto que o tempol reverteu completamente este índice elevado nos ratos 2R-1C, nenhuma alteração foi observada com o apocinin ( $p > 0,05$ ).

A



**Figura 23:** Efeito dos antioxidantes sobre a expressão da MMP-2 e do TIMP-2. (A) Imagens ilustrativas, em 400x, da expressão da MMP-2 e TIMP-2 (em marrom) na camada média e endotélio das aortas, referentes aos seis grupos experimentais.



**B****C**

**Figura 23:** (B) Representação gráfica da expressão da MMP-2 e do TIMP-2 na camada média e endotélio das aortas. (C) Representação gráfica da Razão MMP-2/TIMP-2. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM (n = 4-5 por grupo). \* $p < 0,05$  versus os três grupos controles e 2R-1C + tempol.

## Discussão

A hipertensão arterial está associada a várias alterações estruturais e funcionais no aparelho cardiovascular que são importantes para sua manutenção e/ou para o desenvolvimento e progressão de outras doenças cardiovasculares. Neste estudo, foi avaliada a possível participação das MMPs, especialmente da MMP-2, nas alterações vasculares associadas ao modelo experimental de hipertensão 2R-1C. Este foi o primeiro estudo a mostrar um aumento da expressão do RNAm e da atividade da MMP-2 neste modelo experimental, associado à disfunção endotelial, hipertrofia da aorta e aumento da deposição vascular de colágeno e elastina. Estas ações foram evidenciadas pelo tratamento com doses sub-antimicrobianas de doxiciclina, inibidor não específico das MMPs. Estudos mostraram que esta dose (30mg/kg/dia) diminui a atividade das MMPs de forma independente de seus efeitos antibióticos (Golub et al., 1998; Lee et al., 2004).

Como descrito anteriormente, metaloproteinases são endopeptidases cálcio-dependentes, contendo zinco, presentes na matriz extracelular de vários tecidos, incluindo musculatura lisa vascular, endotélio e miocárdio. Elas são as principais responsáveis pela degradação de várias proteínas da MEC, participando ativamente de processos fisiológicos de remodelamento tecidual (Page-McCaw et al., 2007). Entretanto, um desequilíbrio na sua regulação pode resultar em aumentos significativos de suas atividades, o que contribui para o desenvolvimento e/ou progressão de várias doenças cardiovasculares, inclusive a hipertensão (Berk et al., 2007; Donnelly et al., 2003; Lopez et al., 2004; Spinale, 2007; Vanhoutte et al., 2006).

Neste contexto, é interessante notar que o aumento da expressão e atividade da MMP-2, observado nos animais hipertensos, ocorreu de forma proporcional à redução da expressão gênica do TIMP-2. Como os TIMPs são um dos responsáveis pela regulação das MMPs, é possível que este desequilíbrio favoreça o aumento da atividade da MMP-2 observado nestes animais. Pelos resultados de zimografia *in situ* foi possível observar que esta atividade aumentada ocorreu principalmente na camada média e endotélio das aortas.

Entretanto, além da MMP-2, observamos também um aumento significativo da expressão da MMP-9 nestes animais hipertensos. Isto sugere que esta enzima também pode participar das alterações vasculares observadas neste modelo experimental, mesmo havendo a necessidade de realizar mais experimentos para confirmar esta hipótese. O tratamento com a doxiciclina atenuou de forma significativa todas estas alterações nos ratos hipertensos, o que pode ter contribuído para o menor aumento da pressão arterial observado nestes animais.

De forma similar aos nossos resultados, estudos prévios realizados em modelos animais de hipertensão também mostraram um aumento significativo desta expressão e atividade enzimática, tanto no plasma quanto em tecidos cardíacos e vasculares (Bouvet et al., 2005; Camp et al., 2004; Flamant et al., 2007; Martinez et al., 2006; Watts et al., 2007; Yasmin et al., 2005). Entretanto, diferente do que foi observado no nosso estudo, estes resultados mostraram apenas ações das MMPs em relação ao remodelamento vascular (Bouvet et al., 2005; Flamant et al., 2007; Watts et al., 2007).

Além disso, aumentos na expressão e atividade destas MMPs também foram observados na aterosclerose, em aneurismas de aorta e restenoses coronarianas

(Barbour et al., 2007; Batchelor et al., 1998; Galis and Khatri, 2002; Garcia-Touchard et al., 2005; Newby, 2005).

Como descrito anteriormente, um aumento na atividade das MMPs pode contribuir de forma significativa para o processo de remodelamento tecidual crônico associado à hipertensão arterial. Nosso estudo mostrou que, em paralelo à atenuação da atividade e expressão das MMPs, o tratamento com a doxiciclina reverteu completamente as alterações estruturais hipertróficas observadas nas aortas dos animais hipertensos. Isto foi evidenciado por menores aumentos do CSA e da razão M/L. Da mesma maneira, estudos prévios, em outros modelos animais de hipertensão, mostraram que a MMP-2, além de participar do remodelamento hipertrófico (Bouvet et al., 2005; Watts et al., 2007), também pode participar, transitoriamente, do remodelamento eutrófico associado às artérias de resistência (Bouvet et al., 2005). Ambos podem contribuir para manutenção da hipertensão arterial observada e/ou para o desenvolvimento de outras doenças cardiovasculares associadas.

Grande parte do espessamento da camada média observado nas aortas dos ratos 2R-1C pode ter ocorrido como consequência de uma hiperplasia das células musculares lisas. Isto porque, proporcionalmente ao aumento do CSA, houve também um aumento da proliferação celular e da deposição de novas fibras de colágeno e elastina. O tratamento com a doxiciclina preveniu completamente estas alterações nos animais hipertensos, sugerindo a importante participação das MMPs neste tipo de alteração estrutural. No entanto, não se pode descartar a hipótese da ocorrência de uma hipertrofia celular, já que não foi analisado o tamanho das células musculares lisas nestes animais. Embora estas alterações já tenham sido evidenciadas em outros modelos animais de hipertensão (Hu et al., 2008; Pauletto et

al., 1994; Vasdev et al., 2003), este foi o primeiro estudo que mostrou uma atenuação completa destes parâmetros hipertróficos na presença de um inibidor de MMPs.

Como descrito na introdução, vários mecanismos foram propostos para explicar estas ações das MMPs no remodelamento vascular crônico. Por degradarem algumas proteínas da membrana basal, as gelatinases podem promover interação de outras proteínas da MEC com as integrinas. Isto pode resultar na ativação de algumas vias de sinalização intracelular, como as FAK quinases, que são responsáveis por processos de migração, proliferação (Newby, 2006) e hipertrofia celular (Intengan and Schiffrin, 2000; Lehoux et al., 2006; Lehoux and Tedgui, 1998). Estas ações podem contribuir significativamente para o espessamento da camada média das artérias observado durante a fase crônica da hipertensão. Além disso, estas MMPs também podem alterar diretamente a conformação fenotípica destas células, o que pode levar a migração celular e a uma nova síntese de proteínas da MEC (Hu et al., 2008; Newby and Zaltsman, 2000; Newby, 2006).

Isto pode explicar, pelo menos em parte, porque o aumento da atividade da MMP-2 ocorreu de forma proporcional à proliferação celular e ao aumento da deposição de colágeno e elastina nos animais hipertensos. Também pode explicar porque a doxíciclina preveniu ambos estes aumentos nestes animais. Concordando com nossos resultados, estudos prévios em modelos animais de injúria vascular mostraram que o tratamento com a doxíciclina, na dose de 30mg/kg/dia, diminuiu as concentrações elevadas de colágeno e elastina, o que foi associado a uma redução do remodelamento constritivo crônico das artérias de grande calibre (Bendeck et al., 2002; Courtman et al., 2004).

Além de participar destes processos crônicos de remodelamento tecidual, a MMP-2, especificamente, também pode regular o tônus vascular, por clivar alguns peptídeos vasoativos. Estudos mostraram que elas podem clivar a big ET-1 em metabólitos com ações vasoconstritoras ainda mais intensas (ET<sub>1-32</sub>, ou Med ET-1) (Fernandez-Patron et al., 1999). Além disso, podem clivar o CGRP, potente vasodilatador arterial, em produtos de degradação sem ação vasodilatadora (Fernandez-Patron et al., 2000). Por fim, podem clivar a AM, peptídeo vasodilatador, em produtos de degradação com ações vasoconstritoras (Martinez et al., 2004). Estas alterações mediadas pela MMP-2 podem estar relacionadas com a disfunção endotelial observada na clínica (Panza et al., 1995) e em vários modelos animais de hipertensão arterial. De acordo com estes estudos, nossos resultados mostraram que o tratamento com a doxiciclina reverteu totalmente este comprometimento endotelial nos animais hipertensos, sem produzir nenhuma ação nos controles. Estes efeitos foram evidenciados por uma melhora do relaxamento dependente do endotélio pela acetilcolina. Como a doxiciclina preveniu o aumento da atividade da MMP-2 nestes animais, estes resultados sugerem que esta enzima pode participar do processo de disfunção vascular associado a este modelo de hipertensão. Por outro lado, o relaxamento independente do endotélio, induzido pelo NPS, foi similar em todos os grupos experimentais. Entretanto, ainda não há estudos mostrando uma relação direta entre a atuação da MMP-2 sobre estes peptídeos (big ET-1, CGRP e AM) e o desenvolvimento e/ou progressão de doenças cardiovasculares como a hipertensão.

De uma forma geral, a atenuação das alterações vasculares pela doxiciclina pode estar diretamente relacionada ao menor aumento da pressão arterial observado nos animais hipertensos tratados. É importante notar que as ações desta droga sobre o

sistema vascular vão muito além dos seus efeitos anti-hipertensivos. Isto porque, mesmo não atenuando totalmente o aumento da pressão arterial, ela preveniu completamente as alterações estruturais e funcionais observadas nos animais hipertensos. Isto sugere fortemente que estas MMPs possam contribuir de forma significativa para o desenvolvimento e/ou progressão da hipertensão renovascular.

Esta atenuação da hipertensão arterial pode ter contribuído para o maior ganho de peso observado nos animais hipertensos tratados com a doxiciclina.

Como pode ser observado nos resultados bioquímicos, um enfoque maior foi dado à atividade da MMP-2 nos vasos. Para avaliar os efeitos da doxiciclina sobre esta atividade específica foi utilizado o método de captura de anticorpo. Diferente da zimografia convencional e da zimografia *in situ*, este método determina a atividade *in vivo* da MMP-2. Desta maneira, foi observado que o tratamento com a doxiciclina atenuou completamente o aumento da atividade desta enzima nos animais hipertensos. Isto ocorreu em paralelo à sua menor expressão na camada média e no endotélio, como evidenciado pelos resultados de imunohistoquímica. Entretanto, estes efeitos não foram observados na zimografia convencional. O tratamento com a doxiciclina não alterou de forma significativa estas concentrações enzimáticas elevadas nos animais hipertensos. Provavelmente, isto pode ter ocorrido por problemas inerentes a esta técnica. Pode ocorrer dissociação da doxiciclina do sítio ativo das MMPs durante o processo de eletroforese (devido as condições redutoras do gel), o que pode levar a um resultado falso-negativo. Além disso, esta técnica não representa a atividade enzimática *in vivo*, por isto a necessidade de se utilizar outros métodos paralelos.

Entretanto, além da MMP-2, a MMP-9 também apresentou expressão elevada nas aortas dos animais hipertensos, o que foi constatado pela análise dos resultados de imunohistoquímica e também pelo gel de zimografia. Houve formação de bandas de 87 KDa referentes à MMP-9 apenas nos extratos de aorta dos animais hipertensos (2R-1C e 2R-1C + doxi), sendo que a intensidade destas foram maiores para os animais 2R-1C. Como descrito anteriormente, estes resultados sugerem que a MMP-9 também possa ter participação importante neste quadro hipertensivo (Flamant et al., 2007; Salguero et al., 2008; Watts et al., 2007). Porém, mais estudos precisam ser realizados para dar suporte a esta hipótese.

De forma geral, a doxiciclina se liga diretamente *ao zinco e ao cálcio* do sítio catalítico das MMPs diminuindo sua atividade (Garcia et al., 2005; Golub et al., 1998). Além disso, de acordo com resultados prévios, esta ligação pode interferir também nos processos de transcrição, diminuindo a expressão do RNAm desta enzima (Jonat et al., 1996). Interessantemente, nossos resultados mostraram que o tratamento com a doxiciclina aumentou a expressão do RNAm da MMP-2 nos animais controles. Este aumento pode ter ocorrido por adaptação do organismo frente à inibição destas enzimas em situações fisiológicas. Entretanto, embora isto tenha ocorrido, não houve alteração da *atividade* desta enzima nestes animais. Já em relação aos hipertensos, o tratamento com a doxiciclina não alterou a expressão da MMP-2 em relação aos 2R-1C. Entretanto, aumentou significativamente a expressão gênica do TIMP-2 nestes animais. Estas ações podem ser importantes em situações patológicas, já que o TIMP-2 pode inibir a atividade da MMP-2 *in vivo* (Visse and Nagase, 2003). No entanto, esta regulação não é um processo tão simples. É importante ressaltar que dependendo das concentrações do TIMP-2 no organismo, ele pode também ativar a MMP-2. Além disso, outros TIMPs, como o



TIMP-4, por exemplo, podem contribuir para a inibição endógena desta enzima (English et al., 2006).

Embora a MMP-2 seja uma enzima constitutiva, sua ativação pode ser regulada por vários fatores. A MT-MMP1, ou MMP-14, é uma das principais responsáveis por sua ativação proteolítica *in vivo* (Visse and Nagase, 2003). Entretanto, nossos resultados mostraram que, embora tenha atenuado a expressão e atividade da MMP-2, o tratamento com a doxíciclina não alterou a expressão elevada da MMP-14 nos animais hipertensos. Isto sugere que, provavelmente, outros fatores, além desta enzima, estejam contribuindo para a ativação da MMP-2 nestes animais. Dentro deste contexto, as EROs podem exercer uma participação fundamental nesta ativação.

Em relação a isto, este foi o primeiro estudo que observou que o tratamento com drogas antioxidantes, principalmente o tempol, atenuou as alterações vasculares associadas à hipertensão *em paralelo* a redução do estresse oxidativo e da atividade e expressão da MMP-2.

Como descrito anteriormente, um aumento das concentrações das EROs pode levar a várias das alterações vasculares observadas na hipertensão. Dentre elas, pode-se destacar: a disfunção endotelial, o aumento da contratilidade vascular, a proliferação e hipertrofia de células musculares lisas, a peroxidação lipídica e o aumento da atividade de algumas MMPs (Cai, 2000; Heistad, 2005; Irani, et al., 2000).

De acordo com isto, nossos resultados mostraram que o tratamento crônico com o tempol preveniu completamente as alterações funcionais e estruturais da aorta, observadas nos animais hipertensos, em paralelo a uma diminuição das concentrações elevadas de EROs. Já o tratamento com o apocinin produziu efeitos

vasculares e antioxidantes menos expressivos. Como esta droga inibe a NADPH oxidase vascular, possivelmente outras enzimas pro-oxidantes estejam ativadas neste modelo experimental, contribuindo para a produção elevada das EROs. No entanto, este estudo não avaliou a atividade enzimática destas enzimas. Além disso, diferenças na eficácia destas drogas também foram observadas em outros modelos animais de hipertensão (Park et al., 2002; Rugale et al., 2007; Salguero et al., 2008; Sousa et al., 2008). Isto pode estar associado à diversidade de modelos experimentais utilizados, às doses de drogas administradas e ao tempo de tratamento.

As EROs também são muito importantes na ativação de algumas MMPs, especialmente da MMP-2 (Castier et al., 2005; Luchtefeld et al., 2005; Rajagopalan et al., 1996). Elas podem reagir com o resíduo de cisteína, presente no pró-peptídeo desta enzima, promovendo a ruptura do grupamento tiol com o zinco, o que resulta na sua ativação (Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990). Baseado nisto, alguns estudos *in vitro* mostraram que as EROs podem aumentar a atividade e expressão da MMP-2, após estiramento mecânico das células musculares lisas. Estas ações foram dependentes do aumento da ativação de enzimas pro-oxidantes como a NADPH oxidase vascular e a xantina oxidase (Rajagopalan et al., 1996; Grote et al., 2003; Valentin et al., 2005).

Em relação ao nosso estudo, foi observado que o tratamento com os antioxidantes, principalmente com o tempol, atenuou tanto a atividade quanto a expressão elevada da MMP-2 nos animais hipertensos, sem alterá-las nos controles. Estes resultados também foram evidenciados pelos géis de zimografia. Neste caso, o tratamento com o tempol, mas não com o apocinin, também atenuou de forma significativa aumentos na porcentagem da ativação da MMP-2 nos animais hipertensos, sem alterá-la nos

controles. Estes efeitos ocorreram em paralelo a menores concentrações vasculares das EROs nestes animais.

Além disso, houve uma sobreposição da atividade gelatinolítica com a expressão desta enzima na camada média e endotélio das aortas, o que sugere que grande parte da atividade observada nos animais hipertensos pode ser decorrente do aumento da MMP-2. Em conjunto, estes resultados mostraram que, possivelmente, um aumento nas concentrações destas EROs possa contribuir para o aumento da ativação da MMP-2 observada neste modelo experimental.

De acordo com isto, outros estudos, realizados em nosso laboratório, mostraram que o tratamento com a lercanidipina, que é um bloqueador de canal de cálcio, também reduziu o estresse oxidativo em animais 2R-1C em paralelo à atenuação da atividade da MMP-2 (Martinez et al., 2008). Além disso, estudos em modelos animais de isquemia cardíaca mostraram que muitas das alterações funcionais e estruturais associadas a esta doença estão relacionadas ao aumento da atividade da MMP-2 pelas EROs (Sawicki et al., 2005; Schulz, 2007; Wang et al., 2002b). Entretanto, este foi o primeiro estudo que observou que o tratamento com drogas antioxidantes preveniu as alterações vasculares associadas à hipertensão em paralelo a uma menor atividade e expressão da MMP-2.

Por outro lado, estas alterações de expressão não foram observadas para o TIMP-2. Não houve diferenças significativas entre os animais dos seis grupos experimentais. Entretanto, a razão da MMP-2/TIMP-2 foi maior para os animais hipertensos quando comparada aos controles. Enquanto que o tempol reverteu completamente este índice elevado nos ratos 2R-1C, nenhuma alteração foi observada com o apocinin. Desta forma, percebe-se que o tempol pode atenuar o aumento da ativação da

MMP-2, induzida pela hipertensão, sem afetar a expressão do seu maior inibidor tecidual endógeno, o TIMP-2. Outros mecanismos também foram propostos para explicar estes resultados. Algumas EROs, em particular o  $\text{OONO}^-$ , pode alterar a estrutura do sítio de ligação dos TIMPs às MMPs, diminuindo sua inibição (Chackraborti S et al. 2004; Donnini et al., 2008; Frears et al., 1996). Isto pode ter contribuído para o aumento da atividade da MMP-2 observado nos animais hipertensos.

Importante notar que a atenuação das alterações vasculares produzidas pelo tempol nos animais hipertensos foi diretamente proporcional a atenuação das concentrações de EROs e da atividade e expressão da MMP-2. Desta maneira, é possível concluir que o tempol diminua o aumento da ativação da MMP-2 contribuindo para menores alterações vasculares observadas neste modelo de hipertensão. Estas ações podem ocorrer independentemente dos seus efeitos anti-hipertensivos, já que ele não atenua totalmente a pressão arterial.

Já o tratamento com o apocinin não alterou a expressão e atividade aumentada da MMP-2 nos animais hipertensos. Isto pode ser explicado baseado no seu mecanismo de ação sobre a NADPH oxidase vascular. Embora existam controvérsias, os produtos de oxidação do apocinin podem reagir com grupamentos tióis, presentes em outras enzimas, inibindo a migração da subunidade  $\text{p47}^{\text{phox}}$  da NADPH oxidase para membrana, o que resulta em sua inibição (Heumuller, 2008; Touyz, 2008; Ximenes et al., 2007; Wang et al., 2008). De acordo com este mecanismo, provavelmente, o apocinin também possa reagir com o grupamento tiol presente no sítio ativo da MMP-2 contribuindo para sua ativação. Isto explicaria a carência de seus efeitos em diminuir a ativação desta enzima nos animais

hipertensos. Entretanto, estudos precisam ser realizados para confirmar esta hipótese.

Existem algumas limitações importantes no nosso estudo que devem ser levadas em consideração. Primeiro, nós utilizamos a aorta para avaliar as alterações relacionadas a aumentos da pressão arterial. Seria ideal realizar experimentos utilizando também as artérias de resistência. Além disso, este modelo experimental não reproduz todas as alterações cardiovasculares observadas na clínica. Seria interessante utilizar vários modelos animais de hipertensão para testar a mesma hipótese. Por fim, nós utilizamos a doxiciclina como inibidor das MMPs. Como ela é uma droga inespecífica, o ideal seria realizar experimentos utilizando inibidores específicos para estas enzimas.

De forma geral, nossos resultados sugerem que as MMPs podem contribuir para o aumento da pressão arterial e para as alterações vasculares observadas neste modelo experimental. Além disso, aumentos nas concentrações de EROs podem estar diretamente relacionados com esta atividade aumentada da MMP-2. Isto pôde ser evidenciado pelo uso da doxiciclina e tempol, respectivamente. Desta maneira, a inibição das MMPs poderia ser um *futuro* alvo terapêutico no tratamento da hipertensão e/ou de outras doenças cardiovasculares associadas. Entretanto, mais estudos precisam ser realizados para confirmar esta hipótese.

## **Conclusões**

1- A análise conjunta destes resultados sugere que as MMPs, especialmente a MMP-2, participem das alterações vasculares associadas ao modelo de hipertensão renovascular 2R-1C.

2- Há fortes evidências de que a redução do estresse oxidativo modula negativamente o aumento da MMP-2 e as alterações vasculares observadas neste modelo experimental.

## Referências Bibliográficas

- Asanuma, K., Magid R, Johnson C, Nerem RM, ZS., G., 2003. Uniaxial strain upregulates matrix-degrading enzymes produced by human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284, H1778-1784. Epub 2003 Jan 1723.
- Barbour, J., Fg, S., Ikonmidis, J.S., 2007. Proteinase systems and thoracic aortic aneurysm progression. *J Surg Res.* 139, 292-307.
- Batchelor, W., R, R., Strauss, B.H., 1998. The extracellular matrix in balloon arterial injury: a novel target for restenosis prevention. *Prog Cardiovasc Dis.* 41, 35-49.
- Bendeck, M., Conte M, Zhang M, Nili N, Strauss BH, SM., F., 2002. Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration, and matrix remodeling after arterial injury. *Am J Pathol.* 160, 1089-1095.
- Berk, B., K, F., Lehoux, S., 2007. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest.* 117, 568-575.
- Beswick, R.A., Dorrance, A.M., Leite, R., Webb, R.C., 2001. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension* 38, 1107-1111.
- Bobik, A., Tkachuk, V., 2003. Metalloproteinases and plasminogen activators in vessel remodeling. *Curr Hypertens Rep.* 5, 466-472.
- Bode, W., Maskos, K., 2003. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol Chem.* 384, 863-872.
- Bouvet, C., Gilbert, L.A., Girardot, D., deBlois, D., Moreau, P., 2005. Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition. *Hypertension* 45, 432-437.
- Brinckerhoff, C., Matrisian, L.M., 2002. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3, 207-214.
- Cai, H., 2005. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res.* 68, 26-36.
- Cai, H., Griending, K.K., Harrison, D.G., 2003. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 24, 471-478.
- Cai, H., Harrison, DG. 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 87(10):840-4.
- Camp, T.M., Tyagi, S.C., Aru, G.M., Hayden, M.R., Mehta, J.L., Tyagi, S.C., 2004. Doxycycline ameliorates ischemic and border-zone remodeling and endothelial dysfunction after myocardial infarction in rats. *J Heart Lung Transplant* 23, 729-736.

- Castier, Y., Brandes, R.P., Leseche, G., Tedgui, A., Lehoux, S., 2005. p47phox-dependent NADPH oxidase regulates flow-induced vascular remodeling. *Circ Res* 97, 533-540.
- Castro, M., E, R., Rr, R., S, N., Lm, B., Tanus-Santos, J.E., 2004. Atorvastatin enhances sildenafil-induced vasodilation through nitric oxide-mediated mechanisms. *Eur J Pharmacol*. 498, 189-194.
- Cau, S.B., Dias-Junior, C.A., Montenegro, M.F., de Nucci, G., Antunes, E., Tanus-Santos, J.E., 2008. Dose-dependent beneficial hemodynamic effects of BAY 41-2272 in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. *Eur J Pharmacol* 581, 132-137.
- Chakraborti S, Mandal A, Das S, Chakraborti T.2004. Inhibition of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger by peroxynitrite in microsomes of pulmonary smooth muscle: role of matrix metalloproteinase-2. *Biochim Biophys Acta* 1671,70-78.
- Chen, X., Rm, T., Jb, P., Schiffrin, E.L., 2001. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension* 38, 606-611.
- Chesler, N., Ku DN, ZS., G., 1999. Transmural pressure induces matrix-degrading activity in porcine arteries ex vivo. *Am J Physiol*. 277, H2002-2009.
- Chobanian, Gl, B., Hr, B., Wc, C., La, G., Jr, I.J., Dw, J., Bj, M., S, O., Jr, W.J., Roccella, E.J., 2003a. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 291, 2560-2572.
- Chobanian, Gl, B., Wc, C., La, G., Jr, I.J., Dw, J., Bj, M., S, O., Jr, W.J., Roccella, E.J., 2003b. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 42, 1206-1252.
- Chow, A.K., Cena, J., Schulz, R., 2007. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol* 152, 189-205.
- Cifuentes, M., Pagano, P.J., 2006. Targeting reactive oxygen species in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 15, 179-186.
- Courtman, D., Franco CD, Meng Q, MP., B., 2004. Inward remodeling of the rabbit aorta is blocked by the matrix metalloproteinase inhibitor doxycycline. *J Vasc Res*. 41, 157-165.
- Dajnowiec, D., Langille, B.L., 2007. Arterial adaptations to chronic changes in haemodynamic function: coupling vasomotor tone to structural remodelling. *Clin Sci (Lond)*. 113, 15-23.
- Dao, H.H., Lemay, J., de Champlain, J., deBlois, D., Moreau, P., 2001. Norepinephrine-induced aortic hyperplasia and extracellular matrix deposition are endothelin-dependent. *J Hypertens* 19, 1965-1973.
- Deschamps, A., Spinale, F.G., 2006. Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc Res*. 69, 666-676



- Dobrian, A., Sd, S., Prewitt, R.L., 2001. Role of angiotensin II and free radicals in blood pressure regulation in a rat model of renal hypertension. *Hypertension* 38, 361-366.
  
- Donnelly, R., Collinson DJ, G., M., 2003. Hypertension, matrix metalloproteinases and target organ damage. *J Hypertens.* 21, 1627-1630.
  
- Donnini S, Monti M, Roncone R, Morbidelli L, Rocchigiani M, Oliviero S, Casella L, Giachetti A, Schulz R, Ziche M. 2008. Peroxynitrite inactivates human-tissue inhibitor of metalloproteinase-4. *FEBS Lett.* 582,1135-1140.
  
- English, J., Kassiri Z, Koskivirta I, Atkinson SJ, Di Grappa M, Soloway PD, Nagase H, Vuorio E, Murphy G, R., K., 2006. Individual Timp deficiencies differentially impact pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem.* 281, 10337-10346. Epub 12006 Feb 10339.
  
- Escobales, Crespo, M.J., 2005. Oxidative-nitrosative stress in hypertension. *Curr Vasc Pharmacol.* 3, 231-246.
  
- Escolar, J., Tejero C, Escolar MA, Montalvo F, G., 1997a. Architecture, elastic fiber, and collagen in the distal air portion of the lung of the 18-month-old rat. *Anat Rec.* 248, 63-69.
  
- Escolar, J., Tejero C, Escolar MA, Montalvo F, R., G., 1997b. Methodological contributions for the morphometric study of the lung: approximation to the ideal sample size and quantification of collagen fiber. *Anat Rec.* 247, 501-511.
  
- Faia, K., Davis Wp , Marone Aj , Foxall, T.L., 2002. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in hamster aortic atherosclerosis: correlation with in-situ zymography. *Atherosclerosis.* 160, 325-337.
  
- Fernandes, D.C., Wosniak, J., Jr., Pescatore, L.A., Bertoline, M.A., Liberman, M., Laurindo, F.R., Santos, C.X., 2007. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C413-422.
  
- Fernandez-Patron, C., Radomski, M.W., Davidge, S.T., 1999. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res* 85, 906-911.
  
- Fernandez-Patron, C., Stewart, K.G., Zhang, Y., Koivunen, E., Radomski, M.W., Davidge, S.T., 2000. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. *Circ Res* 87, 670-676.
  
- Ferroni, S, B., V, P., Davi, G., 2006. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 16, 222-233.
  
- Flamant, M., Placier, S., Dubroca, C., Esposito, B., Lopes, I., Chatziantoniou, C., Tedgui, A., Dussaule, J.C., Lehoux, S., 2007. Role of matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling. *Hypertension* 50, 212-218.

- Fortuno, G, S.J., Mu, M., Fau, D.J., Zalba, G., 2005. Oxidative stress and vascular remodelling. *Exp Physiol.* 90, 457-462.
  
- Freeman, B.A., Crapo, J.D., 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47, 412-426.
  
- Frears ER, Zhang Z, Blake DR, O'Connell JP, Winyard PG. 1996. Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by peroxynitrite. *FEBS Lett.* 381,21-24.
  
- Freitas, F, R.d.C., J, M.N., Pk, V., R, S.P., R, M.G., S, A.d.L., Bulgarelli Bestetti, R., 2001. Prevalence of hypertension in the urban population of Catanduva, in the State of São Paulo, Brazil. *Arq Bras Cardiol* 77, 9-21.
  
- Galis, Z., Gk, S., Libby, P., 1995. Microscopic localization of active proteases by in situ zymography: detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue. *FASEB J.* 9, 974-980.
  
- Galis, Z.S., Khatri, J.J., 2002. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 90, 251-262.
  
- Garcia-Touchard, A., Td, H., G, S., Lg, S., A, M., C, C., Schwartz, R.S., 2005. Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25, 1119-1127.
  
- Garcia, R., Dp, P., Cr, G., Kv, G., Jr, W.V., Villarreal, F.J., 2005. Molecular interactions between matrilysin and the matrix metalloproteinase inhibitor doxycycline investigated by deuterium exchange mass spectrometry. *Mol Pharmacol.* 67, 1128-1136.
  
- Gerlach, R.F., Demacq, C., Jung, K., Tanus-Santos, J.E., 2007. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clin Biochem* 40, 119-123.
  
- Gerlach, R.F., Uzuelli, J.A., Souza-Tarla, C.D., Tanus-Santos, J.E., 2005. Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Anal Biochem* 344, 147-149.
  
- Goldblatt, H., 1958. Experimental renal hypertension; mechanism of production and maintenance. *circulation* 17, 642-647.
  
- Golub, L., Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, T., S., 1998. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res.* 12, 12-26.
  
- Griendling, B, L., Alexander, R.W., 1996. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 36, 281-306.
  
- Griendling, D, S., Ushio-Fukai, M., 2000. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* 86, 494-501.

- Griendling, K.K., FitzGerald, G.A., 2003. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation* 108, 2034-2040.
  
- Grote, K., Flach, I., Luchtefeld, M., Akin, E., Holland, S.M., Drexler, H., Schieffer, B., 2003. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ Res* 92, e80-86.
  
- Hao, L., Nishimura, T., Wo, H., Fernandez-Patron, C., 2006. Vascular responses to alpha1-adrenergic receptors in small rat mesenteric arteries depend on mitochondrial reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 819-825.
  
- Heistad, DD. 2005. Oxidative stress and vascular disease: 2005 Duff lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26,689-95.
  
- Heumuller S, Wind S, Barbosa-Sicard E, Schmidt HH, Busse R, Schroder K, Brandes RP. 2008. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension.* 51, 211-217.
  
- Hu, J., A, A., F.T., Mw, M., Jd, H., Wilson, E., 2008. Time courses of growth and remodeling of porcine aortic media during hypertension: a quantitative immunohistochemical examination. *J Histochem Cytochem.* 56, 359-370.
  
- Humphrey, J.D., 2008. Mechanisms of arterial remodeling in hypertension: coupled roles of wall shear and intramural stress. *Hypertension* 52, 195-200.
  
- Intengan, H., Schiffrin, E.L., 2000. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension* 36, 312-318.
  
- Intengan, H., Schiffrin, E.L., 2001. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 38, 581-587.
  
- Johnson, C., Galis, Z.S., 2004. Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24, 54-60.
  
- Irani K. 2000. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res.* 87, 179-83.
  
- Jonat, C., Chung FZ, VM., B., 1996. Transcriptional downregulation of stromelysin by tetracycline. *J Cell Biochem.* 60, 341-347.
  
- Keaney, J.F., Jr., 2005. Oxidative stress and the vascular wall: NADPH oxidases take center stage. *Circulation* 112, 2585-2588.

- Lalu, M., Cena J , Chowdhury R , Lam A , Schulz, R., 2006. Matrix metalloproteinases contribute to endotoxin and interleukin-1beta induced vascular dysfunction. *Br J Pharmacol.* 149, 31-42.
  
- Landmesser, U., Harrison, D.G., 2002. Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension* 40, 511-515.
  
- Landmesser, U., Harrison, D.G., 2003. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* 111, 1201-1209.
  
- Lassegue, RE, C., 2003. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 285, R277-297.
  
- Lassegue, B., Griendling, K.K., 2004. Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens* 17, 852-860.
  
- Lee, H., Golub, L.M., 2004. Subantimicrobial dose doxycycline efficacy as a matrix metalloproteinase inhibitor in chronic periodontitis patients is enhanced when combined with a non-steroidal anti-inflammatory drug. *J Periodontol.* 75, 453-463.
  
- Lehoux, S., Tedgui, A., 2006. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med.* 259, 381-392.
  
- Lehoux, S., Lemarie, C.A., Esposito, B., Lijnen, H.R., Tedgui, A., 2004. Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. *Circulation* 109, 1041-1047.
  
- Lehoux, S., Tedgui, A., 1998. Signal transduction of mechanical stresses in the vascular wall. *Hypertension* 32, 338-345.
  
- Lerman, L., Ka, N., Rodriguez-, Jd, K., Rs, S., C, N., Romero, J.C., 2001. Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension. *Hypertension* 37, 541-546.
  
- Lerman, L.O., Chade, A.R., Sica, V., Napoli, C., 2005. Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med* 146, 160-173.
  
- Levy, B.I., 2005. How to explain the differences between renin angiotensin system modulators. *Am J Hypertens.* 18, 134S-141S.
  
- Lopez, B., A, G., Diez, J., 2004. Role of matrix metalloproteinases in hypertension-associated cardiac fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 13, 197-204.
  
- Luchtefeld, M., Grote, K., Grothusen, C., Bley, S., Bandlow, N., Selle, T., Struber, M., Haverich, A., Bavendiek, U., Drexler, H., Schieffer, B., 2005. Angiotensin II induces MMP-2 in a p47phox-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 183-188.
  
- Martinez-Maldonado, M., 1991. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension* 17, 707-719.

- Martinez, A., Oh, H.R., Unsworth, E.J., Bregonzio, C., Saavedra, J.M., Stetler-Stevenson, W.G., Cuttitta, F., 2004. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. *Biochem J* 383, 413-418.
  
- Martinez ML, Castro MM, Rizzi E, Fernandes K, Demacq C, Bendhack LM, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. 2008. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-2 activity and reverses vascular dysfunction in renovascular hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 591, 224-30.
  
- Martinez, M.L., Lopes, L.F., Coelho, E.B., Nobre, F., Rocha, J.B., Gerlach, R.F., Tanus-Santos, J.E., 2006. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-9 activity in patients with hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 47, 117-122.
  
- Mayet, J., Hughes, A., 2003. Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. *Heart* 89, 1104-1109.
  
- Mulvany, M.J., 2002. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci.* 17, 105-109.
  
- Nagase, H., R, V., Murphy, G., 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 69, 562-573.
  
- Nagase, H., Woessner, J.F., Jr., 1999. Matrix metalloproteinases. *Biol Chem.* 274, 21491-21494.
  
- Newby, A., Zaltsman, A.B., 2000. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol.* 190, 300-309.
  
- Newby, A.C., 2005. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev.* 85, 1-31.
  
- Newby, A.C., 2006. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res* 69, 614-624.
  
- Okamura T, Miyasaki M, Inagami T, Toda N., 1986. Vascular Renin-Angiotensin System in Two-Kidney, One Clip Hypertensive Rats. *Hypertension.* 8,560-565.
  
- Page-McCaw, A., Aj, E., Werb, Z., 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 221-233.
  
- Panza, J., Aa, Q., Jr, B.J., Epstein, S.E., Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* 323, 22-27.
  
- Park Jb, Touyz Rm, Chen X, Schiffrin EL. 2002. Chronic treatment with a superoxide dismutase mimetic prevents vascular remodeling and progression of hypertension in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 15,78-84.

- Park, J.J., Rm, T., X, C., Schiffrin, E.L., 2002. Chronic treatment with a superoxide dismutase mimetic prevents vascular remodeling and progression of hypertension in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 15, 78-84.
  
- Parks, W., Cl, W., Lopez-Boado, Y.S., 2004. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 4, 617-629.
  
- Pauletto, P., Rappelli, A., et al., 1994. Hyperplastic growth of aortic smooth muscle cells in renovascular hypertensive rabbits is characterized by the expansion of an immature cell phenotype. *Circ Res.* 74, 774-788.
  
- Raffetto, Khalil, R.A., 2008. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 75, 346-359.
  
- Rajagopalan, S., Meng, X.P., Ramasamy, S., Harrison, D.G., Galis, Z.S., 1996. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 98, 2572-2579.
  
- Rao, Berk, B.C., 1992. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res.* 70, 593-599.
  
- Rey, PJ, P., 2002. The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22, 1962-1971.
  
- Rodrigues, G., Cn, L., Rg, L., Cx, S., Rs, L.F.d.S., Bendhack, L.M., 2008. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. *Nitric Oxide.* 18, 176-183.
  
- Rugale C, Delbosc S, Mimran A, Jover B. 2007. Simvastatin reverses target organ damage and oxidative stress in Angiotensin II hypertension: comparison with apocynin, tempol, and hydralazine. *J Cardiovasc Pharmacol.* 50, 293-298.
  
- Sainz, J., Wangenstein, R., Rodriguez Gomez, I., Moreno, J.M., Chamorro, V., Osuna, A., Bueno, P., Vargas, F., 2005. Antioxidant enzymes and effects of tempol on the development of hypertension induced by nitric oxide inhibition. *Am J Hypertens* 18, 871-877.
  
- Salguero, G., Akin, E., Templin, C., Kotlarz, D., Doerries, C., Landmesser, U., Grote, K., Schieffer, B., 2008. Renovascular hypertension by two-kidney one-clip enhances endothelial progenitor cell mobilization in a p47phox-dependent manner. *J Hypertens* 26, 257-268.
  
- Sawicki, G., Leon, H., Sawicka, J., Sariahmetoglu, M., Schulze, C.J., Scott, P.G., Szczesna-Cordary, D., Schulz, R., 2005. Degradation of myosin light chain in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion injury: a new intracellular target for matrix metalloproteinase-2. *Circulation* 112, 544-552.
  
- Schnackenberg, C., Wilcox, C.S., 1999. Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandin f2alpha. *Hypertension* 33, 424-428.

- Schnackenberg, C., Wj, W., Wilcox, C.S., 1998. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension* 32, 59-64.
  
- Schulz, R., 2007. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 211-242.
  
- Seshiah, Ds, W., P, R., L, V., Y, T., Griendling, K.K., 2002. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ. Res.* 91, 406-413.
  
- Sigmon, Beierwaltes, W.H., 1998. Influence of nitric oxide in the chronic phase of two-kidney, one clip renovascular hypertension. *Hypertension* 31, 649-656.
  
- Sousa T, Pinho D, Morato M, Marques-Lopes J, Fernandes E, Afonso J, Oliveira S, Carvalho F, Albino-Teixeira A. 2008. Role of superoxide and hydrogen peroxide in hypertension induced by an antagonist of adenosine receptors. *Eur J Pharmacol.* 588, 267-276.
  
- Souza-Tarla, C.D., Uzuelli, J.A., Machado, A.A., Gerlach, R.F., Tanus-Santos, J.E., 2005. Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Clin Biochem* 38, 410-414.
  
- Spinale, F.G., 2002. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res.* 90, 520-530.
  
- Spinale, F.G., 2007. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 87, 1285-1342.
  
- Taniyama, Y., Griendling, K.K., 2003. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 42, 1075-1081.
  
- Touyz, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, MT, Q., 2002. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res.* 90, 1205-1213.
  
- Touyz, Schiffrin, E.L., 2004a. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol.* 122, 339-352.
  
- Touyz, R.M., 2004a. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res.* 37, 1263-1273.
  
- Touyz, R.M., 2004b. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 44, 248-252.
  
- Touyz, R.M., Schiffrin, E.L., 2004b. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 122, 339-352.
  
- Touyz, R.M., 2008. Apocynin, NADPH oxidase, and vascular cells: a complex matter. 51, 172-4.

- Ulker, S., Pp, M., Bayraktutan, U., 2003. Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities. *Hypertension* 41, 534-539.
- Valentin, F., Ji, B., P, K., E, T., Atkinson, J., 2005. Oxidative stress activates MMP-2 in cultured human coronary smooth muscle cells. *Fundam Clin Pharmacol.* 19, 661-667.
- Van Wart, H.E., Birkedal-Hansen, H., 1990. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5578-5582.
- Vanhoutte, D., M, S., Y, P., Heymans, S., 2006. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovasc Res.* 69, 604-613.
- Vasdev, S., Gadag, V., 2003. Salt-induced hypertension in WKY rats: prevention by alpha-lipoic acid supplementation. *Mol Cell Biochem.* 254, 319-326.
- Verheyen, A., Minten J, Cornelissen F, Rombauts W, H., D.G., 1987. Determination of areal densities of blood vessel wall components in histological sections by means of image analysis. *J Microsc.* 146, 201-208.
- Viel, E.C., Benkirane, K., Javeshghani, D., Touyz, R.M., Schiffrin, E.L., 2008. Xanthine Oxidase and Mitochondria Contribute to Vascular Superoxide Anion Generation in DOCA-Salt Hypertensive Rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*
- Visse, R., Nagase, H., 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92, 827-839.
- Ximenes VF, Kanegae MP, Rissato SR, Galhiane MS. 2007. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition. *Arch Biochem Biophys.* 457, 134-141.
- Wang Q, Smith RE, Luchtefeld R, Sun AY, Simonyi A, Luo R, Sun GY. 2008. Bioavailability of apocynin through its conversion to glycoconjugate but not to diapocynin. *Phytomedicine.* 15,496-503.
- Wang, W., Sawicki, G., Schulz, R., 2002a. Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2. *Cardiovasc Res* 53, 165-174.
- Wang, W., Schulze, C.J., Suarez-Pinzon, W.L., Dyck, J.R., Sawicki, G., Schulz, R., 2002b. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 106, 1543-1549.
- Wassmann S., Nickenig, G., 2001. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension* 37, 1450-1457.



- Watts, S.W., Rondelli, C., Thakali, K., Li, X., Uhal, B., Pervaiz, M.H., Watson, R.E., Fink, G.D., 2007. Morphological and biochemical characterization of remodeling in aorta and vena cava of DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H2438-2448.
- Weir, Dzau, V.J., 1999. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens.* 12, 205S-213S.
- Welch, 2008. Angiotensin II-dependent superoxide: effects on hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension* 52, 51-56.
- Willis, A., D., P.-P., Be, S., Gahtan, V., 2004. Vascular smooth muscle cell migration: current research and clinical implications. *Vasc Endovascular Surg.* 38, 11-23.
- Yasmin, McEniery, C.M., Wallace, S., Dakham, Z., Pulsalkar, P., Maki-Petaja, K., Ashby, M.J., Cockcroft, J.R., Wilkinson, I.B., 2005. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 372.
- Zalba, G., Diez, J., 2001. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 38, 1395-1399.
- Zimmet, Hare, J.M., 2006. Nitroso-redox interactions in the cardiovascular system. 1531-44 114, 1531-1544.

## Apêndice

1- Artigo publicado na revista ***Atherosclerosis*** 198 (2008) 320-331.

2- Artigo submetido para revista ***Free Radical and Biology Medicine*** (08/2008).

# Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats

Michele M. Castro<sup>a</sup>, Elen Rizzi<sup>a</sup>, Livia Figueiredo-Lopes<sup>a</sup>, Karla Fernandes<sup>a</sup>,  
Lusiane M. Bendhack<sup>b</sup>, Dimitrius Leonardo Pitol<sup>c</sup>,  
Raquel F. Gerlach<sup>c</sup>, Jose E. Tanus-Santos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto, Brazil

<sup>c</sup> Department of Morphology, Estomatology and Physiology, Dental School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil

Received 27 March 2007; received in revised form 8 October 2007; accepted 16 October 2007  
Available online 3 December 2007

## Abstract

Altered activity of matrix metalloproteinases (MMPs) is implicated in the vascular remodeling of hypertension. We examined whether increased MMP-2 expression/activity plays a role in the vascular remodeling and dysfunction found in the two-kidney, one-clip (2K-1C) hypertension. Sham operated or 2K-1C hypertension rats were treated with doxycycline 30 mg/(kg day) (or vehicle). Systolic blood pressure was monitored weekly. After 8 weeks of treatment, aortic rings were isolated to assess endothelium-dependent and independent relaxations. Quantitative morphometry of structural changes, collagen, and elastin contents in the aortic wall were studied in hematoxylin/eosin, Sirius Red, and Orceine stained aortic sections, respectively. Aortic MMP-2 levels were determined by gelatin zymography and aortic MMP-2 proteolytic activity was measured using DQ gelatin as the substrate after MMP-2 was captured by a specific antibody and immobilized on a microplate. Aortic MMP-2/tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 mRNA levels were determined by real time RT-PCR. Doxycycline attenuated 2K-1C hypertension ( $215 \pm 8$  mmHg *versus*  $167 \pm 13$  mmHg in 2K-1C rats and 2K-1C + doxy rats, respectively;  $P < 0.01$ ) and prevented the 35% reduction in endothelium-dependent vasorelaxation found in 2K-1C rats. Doxycycline prevented the increases in media thickness, and was associated with lower media/lumen and cross-sectional areas (all  $P < 0.01$ ). Doxycycline also prevented excessive collagen and elastin deposition in the vascular wall. Increased MMP-2 and Pro-MMP-2 levels and MMP-2 activity were found in the aortas of 2K-1C rats (all  $P < 0.05$ ). A 21-fold increase ( $P < 0.001$ ) in the ratio of MMP-2/TIMP-2 mRNA expression was found in the 2K-1C group, whereas this ratio remained unaltered in 2K-1C + doxy rats. Our results suggest that MMP-2 plays a role in 2K-1C hypertension and its structural and functional vascular changes, which were attenuated by doxycycline.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** 2K-1C hypertension; Doxycycline; Metalloproteinases; Renovascular hypertension; Vascular dysfunction

## 1. Introduction

Hypertension is a major health problem associated with structural and functional modifications of the vasculature. Recent studies have suggested that altered expression and

activity of key members of a group of zinc-dependent endopeptidases called matrix metalloproteinases (MMPs) may be implicated in the vascular remodeling of many cardiovascular conditions including hypertension [1]. Indeed, MMPs play an important role in monocyte invasion and in vascular smooth muscle cell migration [2], thereby contributing to the progress of many commonly found vascular lesions [1,3], especially those involving increased degradation

\* Corresponding author. Tel.: +55 16 3602 3163; fax: +55 16 3633 2301.  
E-mail address: tanus@fmrp.usp.br (J.E. Tanus-Santos).

of extracellular matrix components and accelerated tissue remodeling [4]. Moreover, clinical and experimental studies have reported increased expression and activity of MMPs, especially MMP-2 (72-kDa gelatinase A) and MMP-9 (92-kDa gelatinase B) in the plasma and vascular tissues of hypertensive patients, and in animal models of hypertension [5,6]. In addition to its involvement in vascular remodeling, recent evidence indicates that MMP-2 also modulates vascular contractility. For example, this enzyme contributes to the vasoconstrictor effects of big endothelin-1 (ET-1) by cleaving this peptide to a potent vasoconstrictor, ET-1[1–32] [7]. MMP-2 also cleaves the vasodilatory CGRP (calcitonin gene-related peptide) [8] and adrenomedullin [9], thereby promoting vasoconstriction. Taken together, these previous studies indicate that MMP-2 may have a key pathological role in the vascular alterations induced by hypertension.

Two-kidney, one clip (2K-1C) hypertension is an animal model of renovascular hypertension associated with increased plasma renin activity and systemic/tissue angiotensin II levels, and thereby enhanced oxidative stress [10]. These alterations, combined with the increased transmural pressure, are potent stimuli for the induction of MMP-2 and MMP-9 expression and degrading activities [1,11] and may drive the vascular remodeling found in this model [12]. This hypothesis, however, has not been previously examined, although increased MMP-2 expression and activity were shown in the aorta of DOCA-salt hypertensive rats [13], and in the aorta of rats treated with a nitric oxide synthesis inhibitor [6].

In the present study, we hypothesized that increased MMP-2 expression/activity would play a role in the vascular remodeling and dysfunction found in the 2K-1C hypertension model. We examined how the non-selective MMP inhibitor doxycycline [14] affected the changes in arterial blood pressure, aortic remodeling, vascular reactivity, and MMP-2 expression/activity found in the 2K-1C hypertension model. We also examined the expression of the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and treatments

This study complied with international guidelines of the European Community for the use of experimental animal and was approved by our institutional ethics committee. Male Wistar rats (180–200 g) obtained from the colony at University of São Paulo (Ribeirão Preto Campus) were maintained on a 12-h light/dark cycle at a room temperature (22–25 °C) with free access to standard rat chow and water.

2K-1C hypertension was induced by clipping the right renal artery with a silver clip (0.2 mm internal gap). Sham-operated rats underwent the same surgical procedure (under

general anesthesia with ketamine 100 mg/kg and xylazine 10 mg/kg i.p.), except for the placement of the renal artery clip. Animals were randomly assigned to one of four experimental groups as follows: (1) 2K-1C hypertension group that received water (2K-1C); (2) 2K-1C hypertension group that received doxycycline (2K-1C + doxy), a non-selective MMP inhibitor; (3) Sham-operated group that received water (Sham) and Sham-operated group that received doxycycline (Sham + doxy). Doxycycline was given by gavage (30 mg/(kg day), p.o.). This dose has previously been shown to block MMP activity *in vivo* [6,15,16]. Treatment with doxycycline was started 2 weeks after 2K-1C hypertension was induced and maintained for additional 8 weeks. Body weight and tail systolic blood pressure (SBP) were assessed weekly throughout the experiment period. The SBP was measured by tail-cuff plethysmography in conscious rats.

### 2.2. Aortic ring preparations and tension recording

After 8 weeks of treatment with doxycycline (or vehicle), the animals were killed by decapitation and the thoracic aorta was isolated and cleaned of connective tissue and fat. Aortic rings, 4 mm in length, were cut and mounted for isometric tension recording. The rings were placed in bath chambers (10 mL) for isolated organs containing modified Krebs salt solution (KSS) of the following composition (mM): NaCl 130, CaCl<sub>2</sub> 1.6, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, KCl 4.7, NaHCO<sub>3</sub> 14.9, glucose 5.5, which was maintained at 37 °C, pH 7.4, and bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> [17]. The system was connected to an isometric force displacement transducer (Letica Scientific Instruments, Barcelona, Spain) and the responses were recorded on a computer system using the Chart V4.04, PowerLab ADInstruments (2000) Program. The aortic rings were submitted to a tension of 1.5 g during 60-min equilibration period and were considered to have an intact functional endothelium when acetylcholine (10<sup>-6</sup> M) produced a relaxation of more than 80%. Relaxation was calculated as a percentage of the contraction induced by phenylephrine (10<sup>-4</sup> M). To assess endothelium-dependent and endothelium-independent relaxations, aortic rings precontracted with phenylephrine (10<sup>-4</sup> M) were used to construct cumulative concentration-response curves to acetylcholine (10<sup>-11</sup> to 10<sup>-5</sup> M) and sodium nitroprusside (10<sup>-11</sup> to 10<sup>-6</sup> M), respectively.

### 2.3. Vascular structure and composition of the vascular wall

After 8 weeks of treatment with doxycycline (or vehicle), the rats were killed by decapitation. Their thoracic aorta were harvested, cleaned of connective tissue, and immediately fixed in 4% phosphate-buffered paraformaldehyde, pH 7.4, and embedded in paraffin blocks. Four micrometers thick slices were stained with hematoxylin and eosin (H&E), Orceine and Sirius Red. Media cross-sectional area (CSA)

was calculated by subtracting the lumen internal area ( $A_i$ ) from the external area ( $A_e$ ), which were measured in tissue sections ( $50\times$ ) [12]. The external diameter (ED) and the internal diameter (ID) were calculated as the square root of  $4A_e/\pi$  and  $4A_i/\pi$ , respectively. Media thickness ( $M$ ) was calculated as  $(ED-ID)/2$ . Finally,  $M$  to lumen diameter ( $M/L$ ) was also calculated [12]. The number of vascular smooth muscle cells (VSMCs) in the aortic wall was measured by the three-dimensional dissector method on two consecutive sections, as previously described [12]. This method is independent of nuclei orientation, form, and size. Sirius Red and Orceine staining were used to determine the collagen and elastin contents in the aortic wall, respectively [12]. Stained sections were examined with light microscopy and the image was captured at X400, as previously described [12]. The collagen and elastin contents in the media were evaluated by using ImageJ Program (NIH-National Institute of Health) as previously described [18–20].

#### 2.4. Measurement of aortic MMP-2 levels by gelatin zymography

Tissues were homogenized in buffer containing 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1 mmol/L 1,10-phenanthroline and 1 mmol/L PMSF, 1 mM NEM, and 10 mM  $CaCl_2$ . Briefly, tissue extracts normalized for protein concentration were subjected to electrophoresis on 12% SDS-PAGE co-polymerized with gelatin (1%) as the substrate. After electrophoresis, the gel was incubated for 1 h at room temperature in a 2% Triton X-100 solution, washed two times with water and incubated at 37 °C for 16 h in Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 10 mmol/L  $CaCl_2$ . The gels were fixed with 30% methanol and 10% acetic acid, stained with 0.05% Coomassie Brilliant Blue G-250, and then destained with 30% methanol and 10% acetic acid. Gelatinolytic activities were detected as unstained bands against the background of Coomassie blue-stained gelatin, assayed by densitometry using a Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290 (Kodak, Rochester, NY) [21,22]. Intergel analysis was possible after normalization of gelatinolytic activity with an internal standard (culture medium conditioned by fibroblasts). The pro and active forms of MMP-2 were identified as bands at 72 and 67 kDa, respectively [23–25], which were inhibited by phenanthroline and not by other proteinase inhibitors, and were further identified by immunoprecipitation with specific antibodies. Drugs and reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

#### 2.5. Measurement of aortic MMP-2 activity by antibody capture assay

MMP-2 activities in the aortic homogenates were measured using an antibody capture assay. Protein content of aortic homogenates were determined by the Bradford method (Sigma) and confirmed by the NanoOrange method (Molecu-

lar Probes, Oregon, USA). Briefly, MMP-2 was captured by a specific antibody directed to residues 468–483 of MMP-2 hinge domain, at 1  $\mu$ g/mL (MAB3308, Chemicon, USA) that had been immobilized on a microplate. Sixty micrograms of freshly prepared aortic extract were used in each well and all determinations were done in duplicate. Proteolytic activity was measured using DQ Gelatin as the substrate (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA) at a concentration of 5  $\mu$ g/mL in Tris- $CaCl_2$  Buffer (Tris at 50 mM,  $CaCl_2$  at 10 mM,  $ZnCl_2$  at 1  $\mu$ M). This activity was evaluated in a microplate spectrofluorometer (at  $\lambda_{excitation}$  495,  $\lambda_{emission}$  515 nm; Gemini EM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) after 30 min of incubation at 37 °C because maximal “dequenching” of the substrate happened at that time. A standard curve of gelatinolytic activity was prepared as recommended by the manufacturer of the Gelatinolytic Activity Kit (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA). Vehicle alone, phenanthroline at 1 mM, and Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) at 1 mM were used to confirm the specific activity of the captured protein. While phenanthroline fully inhibited captured MMP-2 activity, PMSF did not inhibit the degradation of the substrate (data not shown).

#### 2.6. Quantitative RT-PCR (MMP-2 and TIMP-2)

MMP-2 and TIMP-2 mRNA levels were determined using real time RT-PCR. Total RNA from the arterial samples was isolated by using the TRIZOL reagent (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, USA) according to manufacturer's instructions and was reverse-transcribed using Superscript II RT (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY). Quantitative real time RT-PCR technique was performed in a Chromo 4 Detector (Bio-Rad Laboratories, USA) using the SYBR-green fluorescence quantification system to quantify amplicons. The standard PCR conditions were 95 °C for 2 min, then 50 cycles at 95 °C (10 s), 58 °C (30 s), and 72 °C (30 s), followed by the melting curve analysis. The housekeeping gene beta-actin (ACTB) was used for internal normalization. The sequences of primers were designed using nucleotide sequences present in the GenBank database. The primer pairs were as follows: ACTB, ID 81822, forward: 5'-TCTGTGTGGATTGGTGGCTCT-3'; reverse: 3'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCT-5', 83 bp; MMP-2, ID 81686, forward: 5'-GTGCCAAGGTGGAATCAGAG-3', reverse: 3'-AAGGTTGAAGGAAACGAGCGA-5', 100 bp; and TIMP-2, ID 29543, forward: 5'-CTACATCTCCTCCCCG-GATGA-3', reverse: 5'-GGTGCCCATGATGCTCTTC-3', 68 bp. PCR conditions were optimized with regard to efficiency of amplification of target genes and housekeeping gene control. The threshold baseline was determined based on negative controls. The mean Ct values from triplicate measurements were used to assess the expression of the target gene with normalization to the housekeeping gene and using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formula, in accordance with the user's bulletin.

## 2.7. Statistical analysis

The results are expressed as means  $\pm$  S.E.M. The between groups comparisons were assessed by two-way analysis of variance (SigmaStat for Windows, Jadel Scientific, USA) or by one-way ANOVA followed by the Tukey test. A probability value  $<0.05$  was considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Treatment with doxycycline ameliorates 2K-1C hypertension

Baseline SBP and body weight were similar in the four experimental groups (Fig. 1A and B). While no significant changes in SBP were seen in Sham and Sham+doxy groups, SBP started to increase in 2K-1C group after the first week of the renal artery surgery, and additional increases in SBP were found until the end of study period (Fig. 1A). However, significantly lower increases in SBP were seen in 2K-1C+doxy group (Fig. 1A;  $*P < 0.01$ ), thus indicating that treatment with doxycycline precluded further increases in SBP. Moreover, rats in the 2K-1C group gained less weight than Sham operated animals (Fig. 1B,  $P < 0.01$ ), and treatment with doxycycline restored weight gain (Fig. 1B).

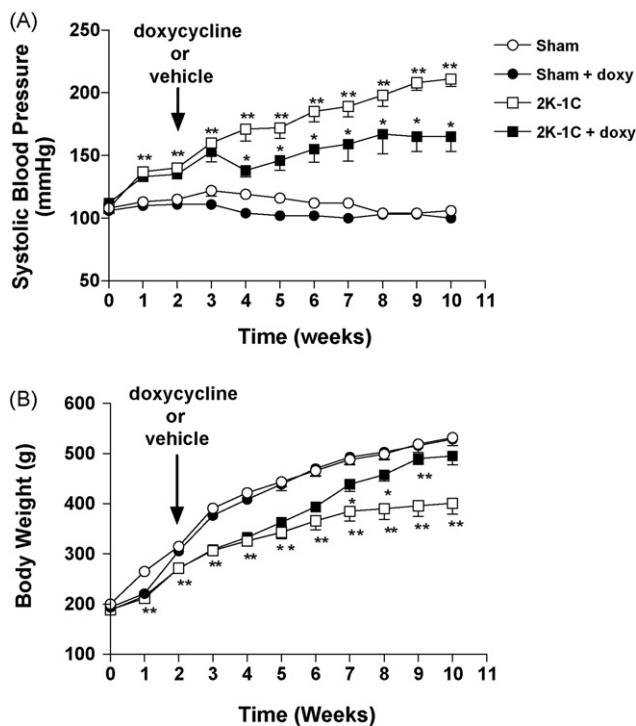


Fig. 1. Systolic blood pressure (mmHg) measured by tail-cuff method (panel A), and body weight (panel B) in the four experimental groups during the study period. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M.; ( $n = 17$  per group)  $*P < 0.01$  versus 2K-1C group;  $**P < 0.001$  versus Sham group.

### 3.2. Treatment with doxycycline reversed the impaired vasorelaxation associated with 2K-1C hypertension

The attenuation of 2K-1C hypertension by doxycycline could be related to doxycycline-induced improvement of vasorelaxation. To test this hypothesis, the rat aortic rings were isolated and their functional performance was assessed in organ chamber experiments ( $n = 5$ , per group). Fig. 2A and B shows, respectively, endothelial cell-dependent, and endothelial cell independent vasorelaxation induced by acetylcholine (Ach;  $10^{-11}$  to  $10^{-5}$  M), and sodium nitroprusside (SNP;  $10^{-11}$  to  $10^{-6}$  M). Of note, 2K-1C hypertension was associated with significant impairment of the Ach response ( $P < 0.05$ ; Fig. 2A and Table 1), although no significant alterations were seen in the response to SNP (Fig. 2B and Table 1). Treatment with doxycycline reversed the impaired vasorelaxation to Ach associated with 2K-1C hypertension (Fig. 2A and Table 1).

The aortic rings from 2K-1C+doxy rats are apparently more sensitive to low concentrations of acetylcholine, as

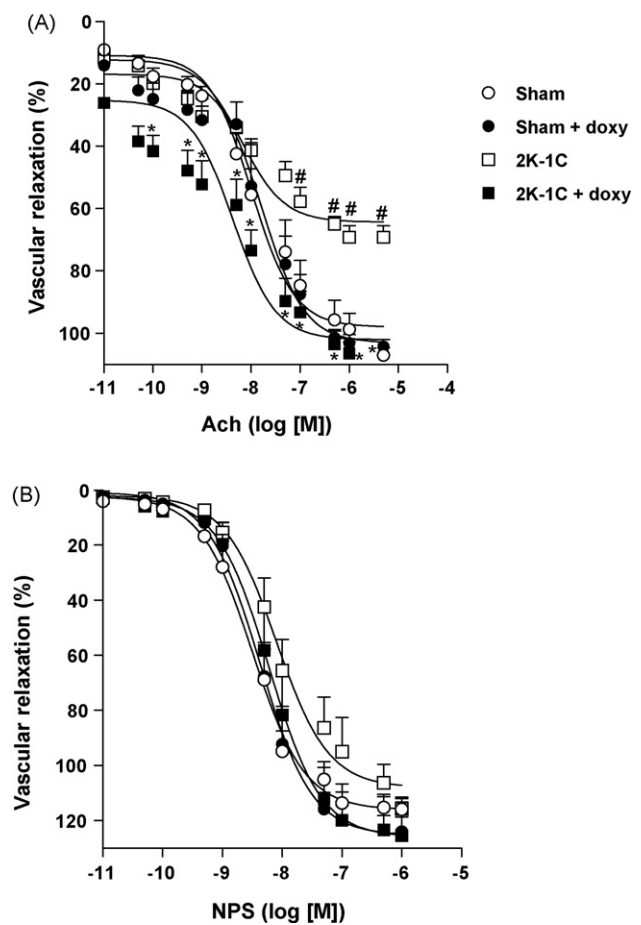


Fig. 2. Endothelial cell-dependent vasorelaxation induced by Ach (panel A), and endothelial cell-independent relaxation induced by sodium nitroprusside (panel B) in rat aortic rings preparations. Vascular responses were studied after preconstruction with phenylephrine ( $10^{-4}$  M). Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5$  per group).  $*P < 0.05$  versus 2K-1C group;  $#P < 0.05$  versus Sham group.

Table 1

Values of  $pD_2$  and  $E_{max}$  for endothelial cell-dependent vasorelaxation induced by Ach, and endothelial cell-independent relaxation induced by sodium nitroprusside (NPS) in rat aortic rings preparations

	Sham	Sham + doxy	2K1C	2K1C + doxy
$pD_2$ Ach	$7.9 \pm 0.3$	$7.8 \pm 0.2$	$8.6 \pm 0.3$	$8.2 \pm 0.3$
$pD_2$ NPS	$8.5 \pm 0.2$	$8.3 \pm 0.1$	$7.9 \pm 0.3$	$8.2 \pm 0.2$
$E_{max}$ Ach	$107.1 \pm 2.3$	$104.3 \pm 2.3$	$69.3 \pm 3.7^{\#}$	$126.8 \pm 16.8^*$
$E_{max}$ NPS	$115.9 \pm 3.8$	$124.0 \pm 5.2$	$115.8 \pm 4.3$	$125.5 \pm 12.2$
<i>n</i>	5	5	5	5

Control rats received water. Values are the mean  $\pm$  S.E.M.  $^{\#}P < 0.05$  versus Sham group;  $^*P < 0.01$  versus 2K-1C group.

suggested by fact that the acetylcholine-induced relaxation curve for the 2K-1C + doxy group starts at approximately 20% relaxation (Fig. 2). Although we do not have a precise explanation for this finding, it does not significantly affect the comparisons made in Table 1, especially those related to  $E_{max}$ .

### 3.3. Treatment with doxycycline prevented the alterations in the vascular structure associated with 2K-1C hypertension

Hypertension is associated with structural alterations of conduit arteries, and arterial wall hypertrophy is a major feature of these changes [26]. Fig. 3A show that rats in the 2K-1C group presented aortic medial thickening compared with those from Sham or Sham + doxy groups (both  $P < 0.01$ ; Fig. 1A), without any significant reduction in the internal lumen diameter, thus resulting in significant increases in the media to lumen ( $M/L$ ) ratio (Fig. 3A,  $P < 0.001$ ). In addition, aortic cross-sectional area (CSA) increased by approximately 50% in 2K-1C group compared with Sham or Sham + doxy groups (Fig. 3B,  $P < 0.01$ ).

Interestingly, treatment with doxycycline prevented the increases in media thickness and was associated with lower  $M/L$  ratio and CSA as compared with 2K-1C group (both  $P < 0.01$ ; Fig. 3A and B), thus suggesting that treatment with doxycycline significantly attenuated aortic hypertrophic remodeling associated with 2K-1C hypertension. Correspondingly, cell counting showed a 43% increase in the number of vascular smooth muscle cells (VSMC) in the aortic wall of 2K-1C group compared with the Sham group ( $P < 0.05$ ; Fig. 4A and B). Treatment with doxycycline completely prevented the hyperplasia found in the 2K-1C group (Fig. 4A and B).

Another characteristic feature of hypertensive vascular remodeling is excessive collagen and elastin deposition in the vascular wall [26]. Indeed, Figs. 5 and 6 show that 2K-1C hypertension was associated with significant increases in total collagen fiber and elastin lamellae content per cross-sectional area (CSA) as compared with the Sham or Sham + doxy groups (both  $P < 0.05$ ; Figs. 5 and 6 Figs. 5A, 5B, 6A, and 6B), although their relative proportions in the media and the collagen/elastin ratio did

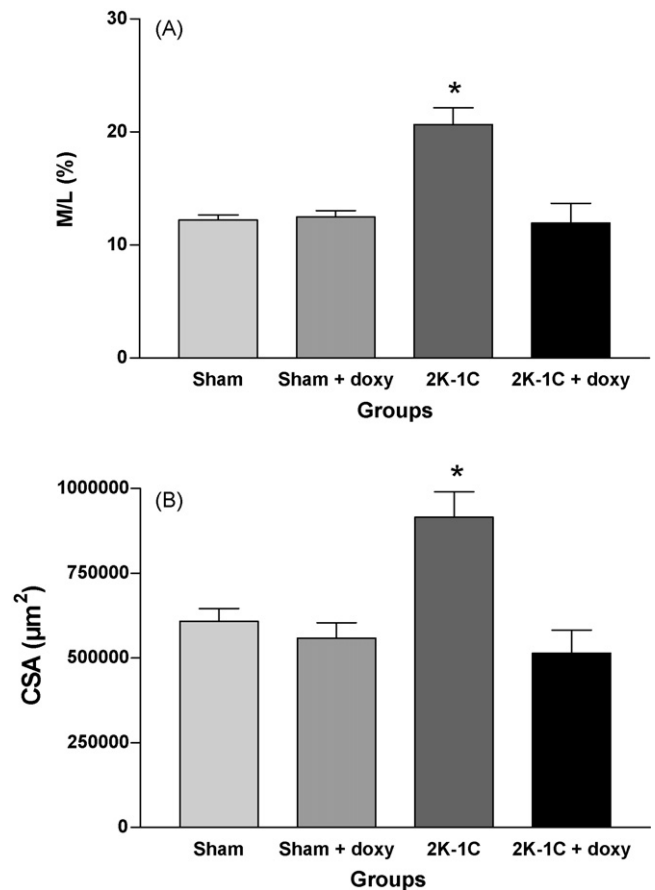


Fig. 3. Effect of doxycycline on the structural modifications induced in the aortas by 2K-1C hypertension. Panel A shows the values for media to lumen ratio ( $M/L$ ). Panel B shows the values for thoracic aorta medial cross-sectional area (CSA). Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5$  per group).  $^*P < 0.01$  versus control groups and the 2K-1C + doxy group.

not differ significantly among the study groups. Interestingly, treatment with doxycycline was associated with lower collagen and elastin contents (70% and 55% lower, respectively) per cross-sectional area in the 2K-1C + doxy group as compared with those in the 2K-1C group (both  $P < 0.05$ ; Figs. 5 and 6).

### 3.4. Increased aortic Pro-MMP-2 and MMP-2 levels assessed by gelatin zymography in 2K-1C hypertension

Gelatin zymograms were used to assess MMP levels in aortic extracts. Fig. 7A shows a representative zymogram of aortic extracts showing pro-MMP-2 and activated MMP-2 bands. Aortas from 2K-1C rats showed higher levels of both forms of MMP-2 compared with those from Sham or Sham + doxy animals (both  $P < 0.05$ ; Fig. 7B and C), thus indicating that 2K-1C hypertension increases aortic MMP-2 concentrations. Treatment with doxycycline was apparently not associated with significant differences in MMP-2 levels in 2K-1C + doxy group compared with the 2K-1C group (Fig. 7). However, it should be clear that gelatin zymogra-

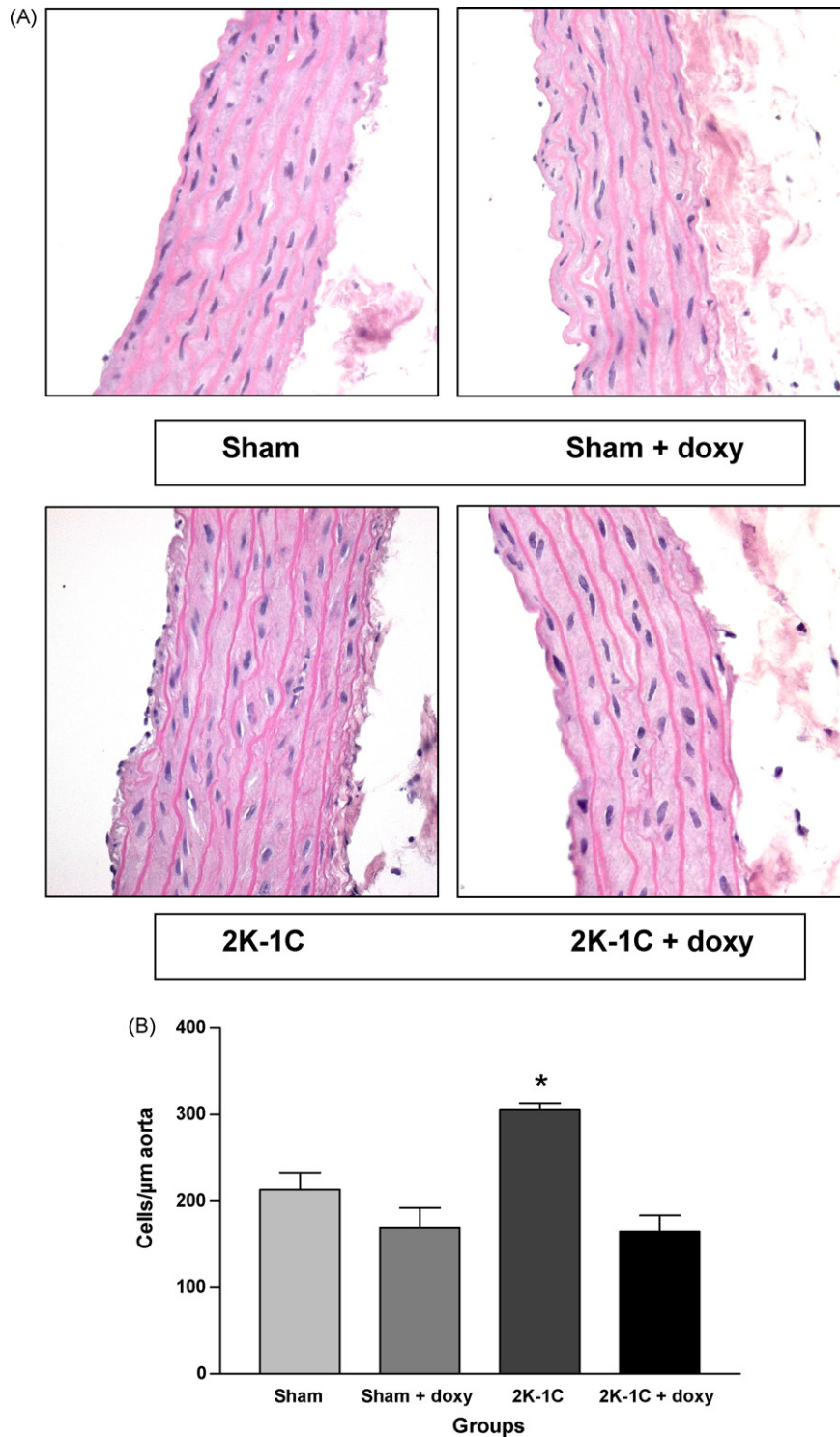


Fig. 4. Effect of doxycycline on vascular smooth cells number per length of aorta. Panel A shows representative photographs of aortic samples (40×) stained by hematoxylin and eosin (H&E). Panel B shows the values for vascular smooth muscle cells number in the aortic media. Data are shown as mean ± S.E.M. ( $n = 5$  per group). \* $P < 0.05$  versus control groups and the 2K-1C + doxy group.

phy separates MMPs from bound inhibitors, therefore the apparently increased MMP-2 levels in 2K-1C + doxy group probably does not reflect increased MMP-2 activity *in vivo* because doxycycline inhibits this enzyme.

Interestingly, we were able to detect bands corresponding to MMP-9 (at 87 kDa; Fig. 7A) in gelatin zymograms of aortic extracts from 2K-1C rats, but not from control groups. While this band was also found in gelatin zymograms of



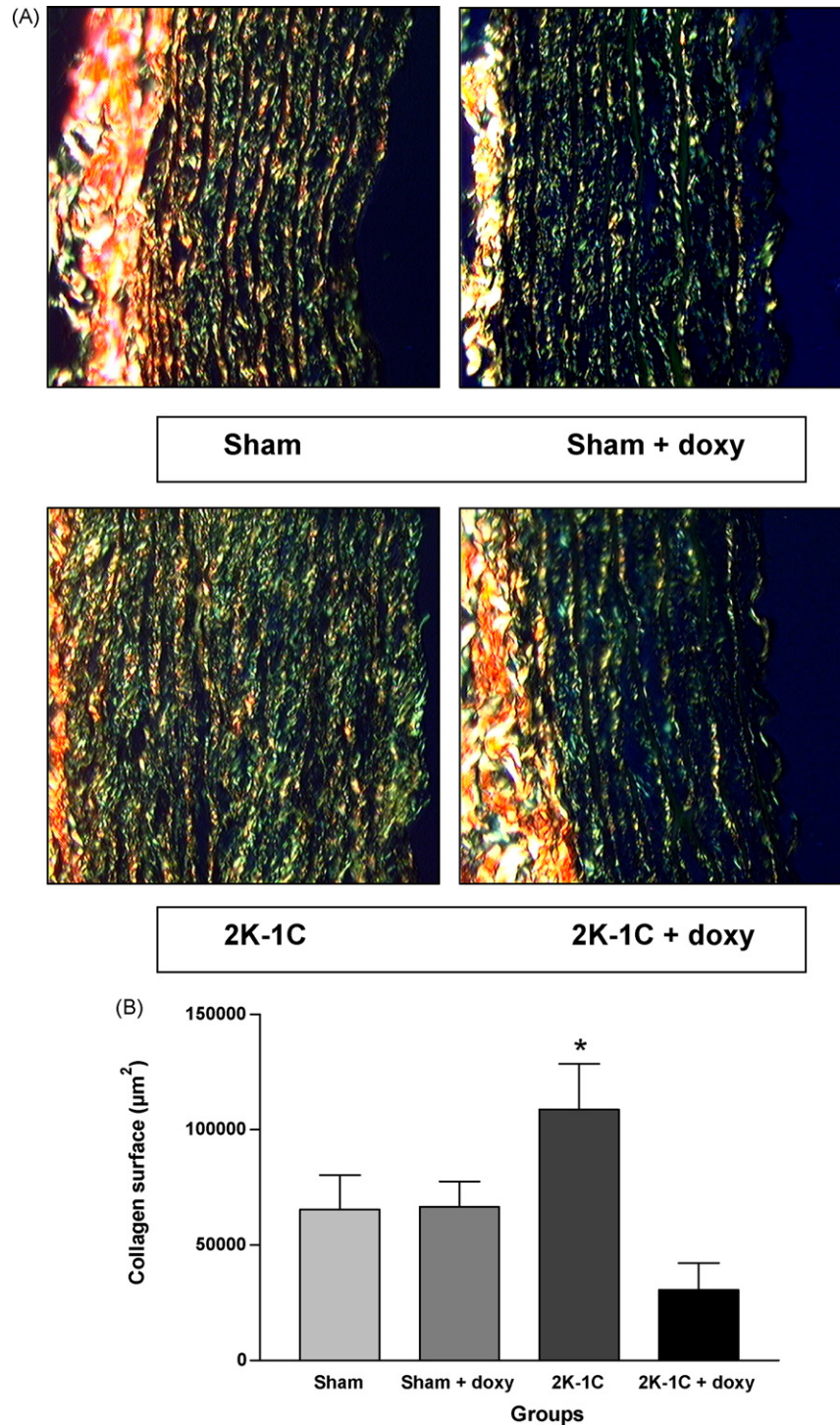


Fig. 5. Effect of doxycycline on collagen content in the aortic media. Panel A shows representative photographs of aortic samples (400 $\times$ ) stained by Sirius Red. Panel B shows the values for surface area of collagen in the aortic media. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n=5$  per group). \* $P<0.05$  versus control groups and the 2K-1C + doxy group.

aortic extracts from 2K-1C + doxy group, the aorta from 2K-1C rats apparently showed much higher pro-MMP-9 levels than those found in the 2K-1C group (Fig. 7A). These results (data not shown) need further validation, however, because our gelatin zymograms were not optimized to assess MMP-9 levels in aortic extracts.

*3.5. Increased aortic MMP-2 activities assessed by antibody capture assay in 2K-1C hypertension were inhibited by treatment with doxycycline*

Gelatin zymograms separate MMPs from TIMPs and therefore cannot determine net MMP activity. Therefore, we

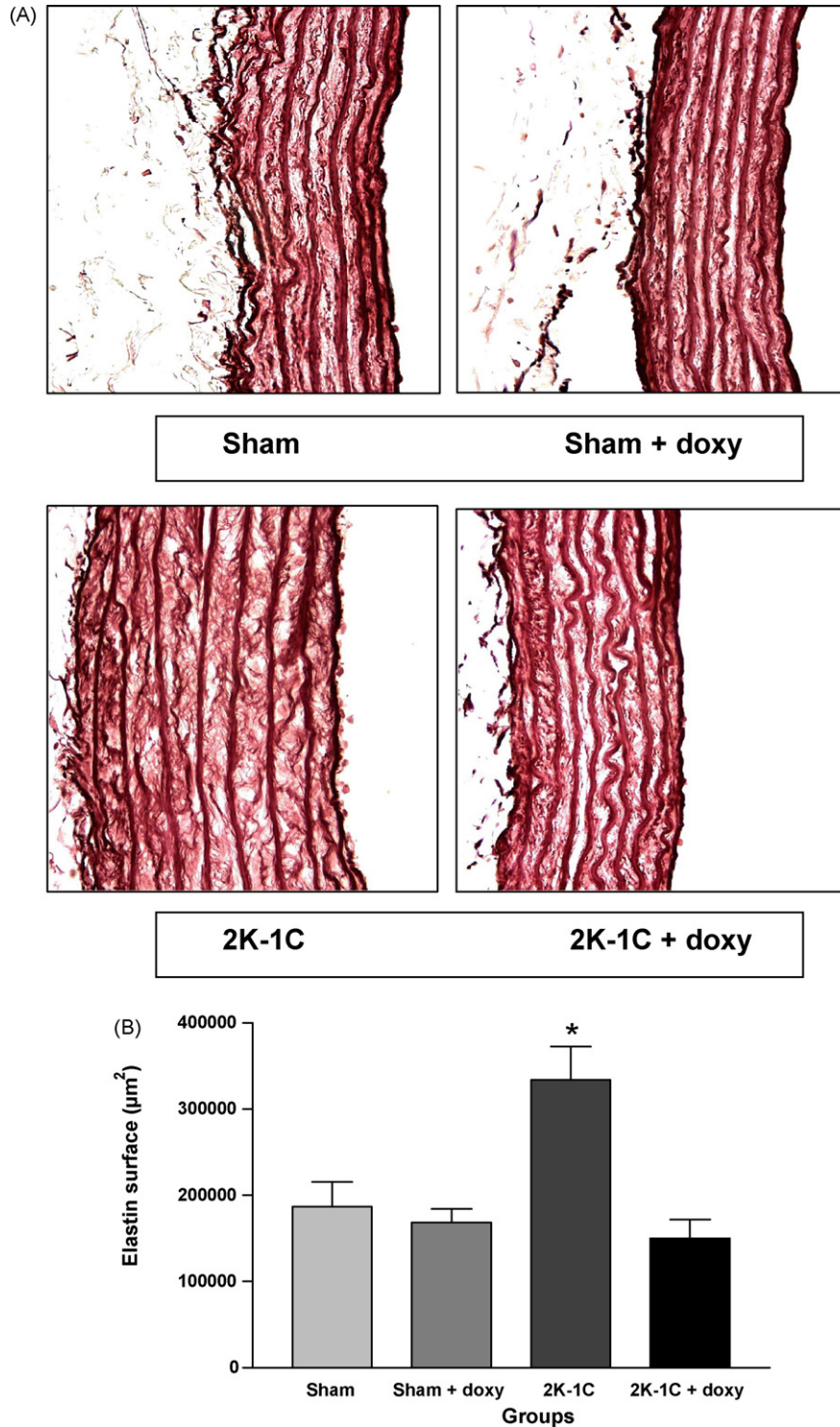


Fig. 6. Effect of doxycycline on elastin content in the aortic media. Panel A shows representative photographs of aortic samples (400 $\times$ ) stained by Orcein. Panel B shows the values for surface area of elastin in the aortic media. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n=5$  per group). \* $P<0.05$  versus control groups and the 2K-1C+doxy group.

assessed net MMP-2 activity in the aorta using an antibody capture assay, which evaluates net MMP-2 proteolytic activity.

MMP-2 activity was significantly increased in 2K-1C rats compared with the control groups (both  $P<0.05$ ; Fig. 8).

Treatment with doxycycline, however, was associated with significantly lower MMP-2 activities in 2K-1C + doxy group compared with those found in 2K-1C rats ( $P<0.05$ ; Fig. 8), although doxycycline did not modify MMP-2 activity in sham rats.

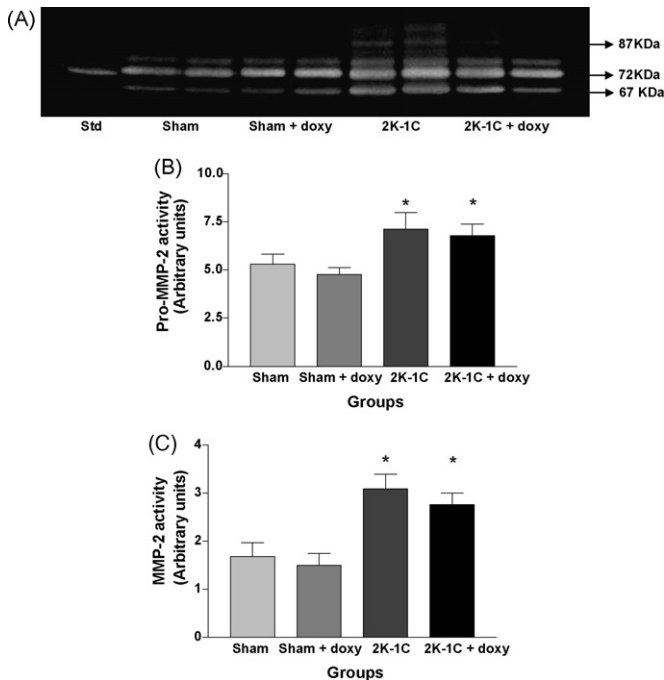


Fig. 7. Panel A shows a representative SDS-PAGE gelatin zymogram of aortic samples. Pro and active form of MMP-2 were identified as bands at 72 kDa and 67 kDa, respectively. Pro-MMP-9 was identified as a band at 87 kDa. Std: internal standard. Panel B shows the values for Pro-MMP-2 and MMP-2 activities in the aortas. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n=9-15$  per group). \* $P < 0.01$  versus Sham group and Sham + doxy groups.

### 3.6. Increased MMP-2 mRNA expression in 2K-1C hypertension

We evaluated the mRNA expression of both MMP-2 and TIMP-2 in thoracic aorta by using quantitative real time RT-PCR. Significantly higher MMP-2 and lower TIMP-2 mRNA levels were found in rats with 2K-1C hypertension and in Sham rats treated with doxycycline as compared

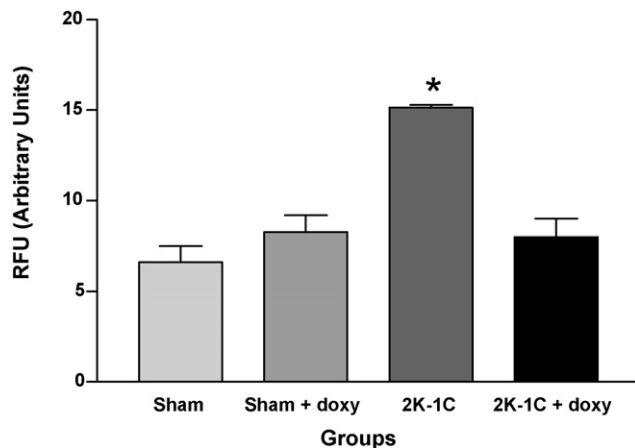


Fig. 8. Effect of doxycycline on net MMP-2 activity the aortic extracts by antibody capture method. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. of three different determinations (pools of 3–4 animals); RFU: relative fluorescence unit. \* $P < 0.05$  versus control groups and the 2K-1C + doxy group.

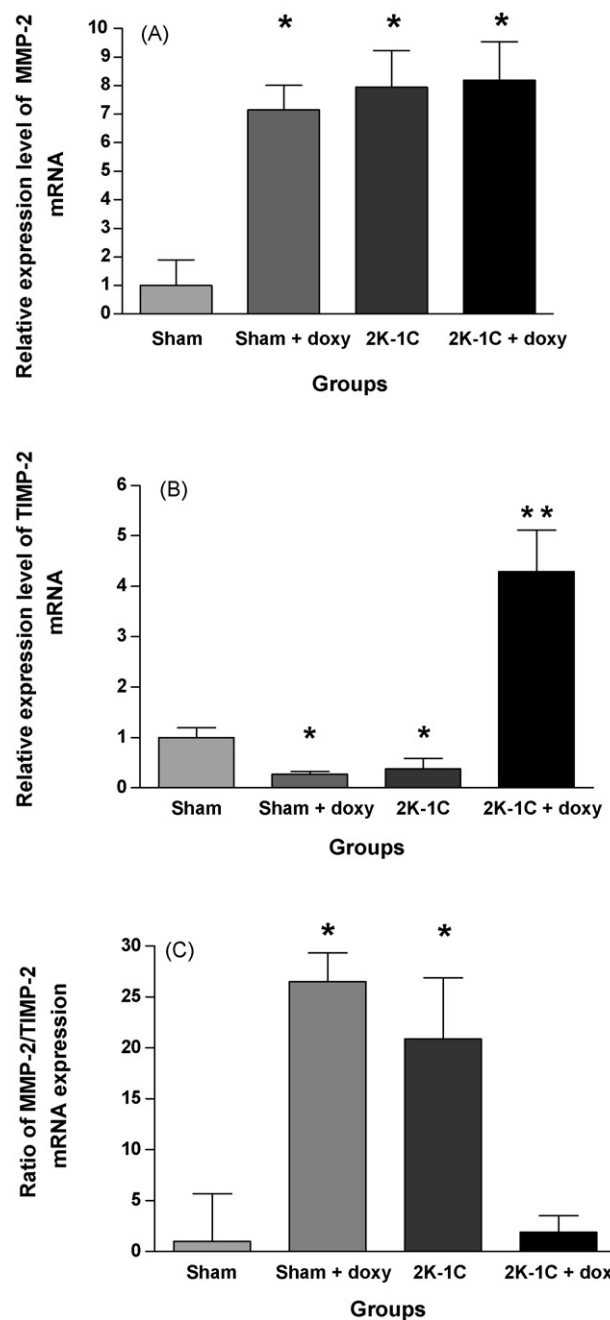


Fig. 9. Effect of doxycycline on MMP-2 and TIMP-2 mRNA expression in the aorta. The levels of MMP-2 (panel A) and TIMP-2 (panel B) mRNA were quantified by real time RT-PCR. The results are presented as the expression of the individual mRNAs with normalization to the housekeeping gene ACTB by using the Ct method. Panel C shows the MMP-2/TIMP-2 mRNA ratio. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n=5-6$  per group). \* $P < 0.01$  versus Sham group. \*\* $P < 0.01$  versus the other three groups.

with the Sham group (both  $P < 0.01$ ; Fig. 9A and B). However, treatment of hypertensive rats with doxycycline was associated with higher MMP-2 and TIMP-2 mRNA levels than those found in the Sham group (both  $P < 0.01$ ; Fig. 9A and B). Interestingly, the ratio of MMP-2/TIMP-2 mRNA expression showed enormous increases in rats with 2K-1C

hypertension and in Sham rats treated with doxycycline as compared with the Sham group (both  $P < 0.01$ ; Fig. 9C), but remained unaltered in 2K-1C + doxy group (Fig. 9C).

#### 4. Discussion

Hypertension is associated with well known structural and functional alterations in both resistance and conduit arteries, which may be the result of long-lasting hypertension and may also be the cause of maintained hypertension [26]. In the present study, we examined the possible role of MMP-2 in the vascular alterations induced by hypertension in the 2K-1C model. To our knowledge, this is the first study showing increased aortic MMP-2 level and activity (both mRNA and enzyme activity) in this model of hypertension, which appears to be associated with impaired endothelial-dependent vasorelaxation, arterial wall hypertrophy, and excessive collagen and elastin in the arterial wall.

Interestingly, while the structural and functional alterations usually found in the 2K-1C hypertension model were completely prevented by the non-selective MMP inhibitor doxycycline [14,27] used in the present study, arterial blood pressure did not completely return to control levels. While these findings suggest that MMPs play a partial role in the development of 2K-1C hypertension, they suggest that inhibiting MMPs may completely blunt the development of the structural and vascular changes associated with 2K-1C hypertension, independently of the possible antihypertensive effects produced by doxycycline. It is possible that doxycycline produced antihypertensive effects through mechanisms other than reversing the vascular alterations induced by 2K-1C hypertension.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are essential for vascular smooth muscle cell migration and tissue remodeling in both physiological and pathological conditions [1,28–30]. In the present study, the increased MMP-2 and decreased TIMP-2 mRNA levels in rats with 2K-1C hypertension are particularly important. They indicate an increased expression of MMP-2 mRNA in a context of decreased expression of the inhibitory TIMP-2 mRNA, thus revealing a major increase in the net levels of MMP-2 expression in the aortas from rats with 2K-1C hypertension. Consistent with these results, we found increased MMP-2 activity in rats with 2K-1C hypertension.

Although other MMPs may also be involved, the increased MMP-2 expression and activity in the aorta from hypertensive rats may have caused the structural alterations found in the present study, and are consistent with the suggestion that MMPs play a key role in the vascular remodeling associated with hypertension, as it has previously been shown in other animal models of hypertension [6,31,32]. In agreement with our findings, while MMP-2 expression and activity was increased in aorta of DOCA-salt hypertensive rats compared with controls, MMP-9 was weakly expressed in this vessel [31]. Moreover, MMP-2 also plays a role in the

hypertension and vascular remodeling found after chronic inhibition of nitric oxide synthesis [6]. These previous results [6,31,32] support our findings that vascular remodeling in hypertensive rats is associated with altered MMP activity, especially MMP-2. The role of MMP-9, however, requires further investigation. In fact, a recent study showed that angiotensin II-induced hypertension was associated with increased MMP-9 activity in conductance vessels, and the absence of MMP-9 activity increases vessel stiffness, thus suggesting that MMP-9 activation improves vessel compliance [32].

Vascular remodeling is an adaptive response to elevation of arterial pressure to reduce the vascular wall tension. As we have found in the present study, this process leads to increased medial cross-sectional areas (CSA) and thickness of conduit arteries, which are partly due to changes in smooth muscle cells and extracellular matrix components [26]. The increased number of cells per length of aorta in 2K-1C rats suggests that cellular hyperplasia rather than hypertrophy explains the increased CSA. While these findings are in good agreement with previous reports [12,33], no previous study has shown that treatment with doxycycline prevents the alterations found in 2K-1C rats.

Our results indicate a direct association between MMP-2 activity and increased collagen and elastin contents in the aorta of 2K-1C rats. Both proteins increased proportionally to the increases in aortic CSA, without changes in their proportions, and these alterations were prevented by treatment of 2K-1C rats with doxycycline. In agreement with these findings, treatment with doxycycline decreased elastin and collagen contents in the aorta of rabbits after double balloon injury [34]. These findings could be explained by the fact that MMPs promote changes of VSMCs from an inactive phenotype to cells which are capable of migrating and proliferating [35]. This could lead to increased synthesis of vascular collagen and elastin [35], which may have been inhibited by doxycycline.

Increased expression and activity of several MMPs, especially MMP-2 and MMP-9, were reported in diseased human arteries [5,36,37], and also in association with arterial morphological changes in experimental models of atherosclerosis and restenosis [38,39]. Giving support to our findings, previous studies found that increased mechanical stretch and strain, which are major stimuli for wall hypertrophy of conduit arteries in hypertension, upregulate MMP-2 expression and activity in VSMCs [11,40–42]. Together, these studies strongly suggest that MMP-2 is actively involved in the vascular remodeling associated with hypertension. Consistent with this suggestion, we found that treatment with doxycycline ameliorated the hypertension and reversed the vascular remodeling associated with 2K-1C hypertension.

Evidence is accumulating for the significance of MMP-2 in modulating vascular contractility [7–9]. Therefore, it is possible that increased MMP-2 expression and activity leads to less vasodilation or increased vasoconstriction, thereby

contributing to endothelial dysfunction and increased vascular resistance in hypertension [10,43]. In line with this suggestion, we found that treatment with the non-specific MMP inhibitor doxycycline reversed the impairment in Ach-induced, endothelium-dependent responses found in 2K-1C rats. We also found that treatment of 2K-1C rats with doxycycline was associated with lower increases in arterial pressure, which may reflect an improvement of endothelial dysfunction in hypertensive rats. Interestingly, doxycycline produced similar improvements of endocardial endothelial response to acetylcholine in a previous study [44]. Therefore, although we have not examined the mechanisms by which doxycycline produced favorable vascular effects, it is highly probable that such mechanisms involve MMP-2 inhibition. Indeed, this drug affects MMPs by binding directly the Zn<sup>2+</sup> or Ca<sup>2+</sup> ions associated with MMPs, thus inhibiting enzyme activity, or by inhibiting their mRNA transcription [45].

Treatment with doxycycline increased MMP-2 mRNA expression in Sham + doxy rats. This effect could be an adaptive response to MMP inhibition. While the expression of MMP-2 may have increased in this group, as suggested by the increased levels of MMP-2 mRNA and decreased levels of TIMP-2 mRNA, no significant effects on MMP-2 activity were found, as revealed by similar MMP-2 activity in this group of rats compared with sham animals. Interestingly, while treatment of 2K-1C rats with doxycycline did not decrease MMP-2 mRNA expression, it did increase the mRNA expression of the endogenous MMP-2 inhibitor (TIMP-2). This finding is in agreement with previous studies showing that changes in TIMP levels are important under pathological conditions because TIMPs directly downregulate MMP activity [46]. However, the regulation of MMP activity is very complex. In this regard, other TIMPs (particularly TIMP-4) also regulate MMP-2 activity [47]. Moreover, TIMP-2 plays a dual role in regulating the processing of pro-MMP-2, so that low TIMP-2 levels are required to cleave pro-MMP-2 and high TIMP-2 levels inhibit MMP-2 [47]. The complexity of MMP-2 regulation highlights the need for specific activity assays, as we have used in the present study.

Some limitations of our study should be taken into consideration. Firstly, we have examined aortas, which have little impact on systemic blood pressure. Further studies should be carried out in resistance arteries. Secondly, the 2K-1C model of hypertension may not reproduce all the alterations seen in clinical hypertension. It would be interesting to examine the hypothesis of the present study in other animal models of hypertension. Finally, we used doxycycline as an MMP inhibitor in the present study. This is a non-specific inhibitor that has various non-MMP effects. A future study with a more specific inhibitor should be considered.

In conclusion, our results suggest that MMPs play an important role in the development of 2K-1C hypertension, and in the structural and functional vascular changes associated with this model of hypertension, which were prevented,

at least in part, by doxycycline. Our findings suggest that inhibition of MMP-2 may be a promising therapeutic aim in the therapy or prevention of the alterations caused by hypertension.

## Acknowledgements

This study was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil).

## References

- [1] Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002;90:251–62.
- [2] Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res* 2006;69:614–24.
- [3] Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res* 1995;77:863–8.
- [4] Nagase H, Woessner Jr JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491–4.
- [5] Yasmin, McEniery CM, Wallace S, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:372.
- [6] Bouvet C, Gilbert LA, Girardot D, deBlois D, Moreau P. Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition. *Hypertension* 2005;45:432–7.
- [7] Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res* 1999;85:906–11.
- [8] Fernandez-Patron C, Stewart KG, Zhang Y, et al. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. *Circ Res* 2000;87:670–6.
- [9] Martinez A, Oh HR, Unsworth EJ, et al. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. *Biochem J* 2004;383:413–8.
- [10] Lerman LO, Chade AR, Sica V, Napoli C. Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med* 2005;146:160–73.
- [11] Lehoux S, Lemarie CA, Esposito B, Lijnen HR, Tedgui A. Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodelling. *Circulation* 2004;109:1041–7.
- [12] Dao HH, Lemay J, de Champlain J, deBlois D, Moreau P. Norepinephrine-induced aortic hyperplasia and extracellular matrix deposition are endothelin-dependent. *J Hypertens* 2001;19:1965–73.
- [13] Watts SW, Rondelli C, Thakali K, et al. Morphologic and biochemical characterization of remodeling in aorta and vena cava of DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol* 2007;292:H2438–48.
- [14] Golub LM, Lee HM, Ryan ME, et al. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res* 1998;12:12–26.
- [15] Pyo R, Lee JK, Shipley JM, et al. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2000;105:1641–9.
- [16] Palei ACT, Zanetti RAG, Fortuna GM, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Hemodynamic benefits of matrix metalloproteinase-9 inhibition by doxycycline during experimental acute pulmonary embolism. *Angiology* 2005;56:611–7.

- [17] Castro MM, Rizzi E, Rascado RR, et al. Atorvastatin enhances sildenafil-induced vasodilation through nitric oxide-mediated mechanisms. *Eur J Pharmacol* 2004;498:189–94.
- [18] Escolar JD, Tejero C, Escolar MA, Montalvo F, Garisa R. Architecture, elastic fiber, and collagen in the distal air portion of the lung of the 18-month-old rat. *Anat Rec* 1997;248:63–9.
- [19] Escolar JD, Tejero C, Escolar MA, Montalvo F, Garisa R. Methodological contributions for the morphometric study of the lung: approximation to the ideal sample size and quantification of collagen fiber. *Anat Rec* 1997;247:501–11.
- [20] Verheyen A, Minten J, Cornelissen F, Rombauts W, De Geest H. Determination of areal densities of blood vessel wall components in histological sections by means of image analysis. *J Microsc* 1987;146:201–8.
- [21] Souza-Costa DC, Figueiredo-Lopes L, Alves-Filho JC, et al. Protective effects of atorvastatin in rat models of acute pulmonary embolism: involvement of matrix metalloproteinase-9. *Crit Care Med* 2007;35:239–45.
- [22] Souza-Costa DC, Zerbini T, Palei AC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. L-arginine attenuates acute pulmonary embolism-induced increases in lung matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9. *Chest* 2005;128:3705–10.
- [23] Souza-Tarla CD, Uzuelli JA, Machado AA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Clin Biochem* 2005;38:410–4.
- [24] Gerlach RF, Uzuelli JA, Souza-Tarla CD, Tanus-Santos JE. Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Anal Biochem* 2005;344:147–9.
- [25] Gerlach RF, Demacq C, Jung K, Tanus-Santos JE. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clin Biochem* 2007;40:119–23.
- [26] Arribas SM, Hinek A, Gonzalez MC. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacol Ther* 2006;111:771–91.
- [27] Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:178–93.
- [28] Garcia-Touchard A, Henry TD, Sangiorgi G, et al. Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1119–27.
- [29] Fortuna GM, Figueiredo-Lopes L, Dias-Junior CAC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. A role for matrix metalloproteinase-9 in the hemodynamic changes following acute pulmonary embolism. *Int J Cardiol* 2007;114:22–7.
- [30] Martinez ML, Lopes LF, Coelho EB, et al. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-9 activity in patients with hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;47:117–22.
- [31] Watts SW, Rondelli C, Thakali K, et al. Morphological and biochemical characterization of remodeling in aorta and vena cava of DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol* 2007;292:H2438–48.
- [32] Flamant M, Placier S, Dubroca C, et al. Role of matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling. *Hypertension* 2007;50:212–8.
- [33] Bendeck MP, Conte M, Zhang M, et al. Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration, and matrix remodeling after arterial injury. *Am J Pathol* 2002;160:1089–95.
- [34] Courtman DW, Franco CD, Meng Q, Bendeck MP. Inward remodeling of the rabbit aorta is blocked by the matrix metalloproteinase inhibitor doxycycline. *J Vasc Res* 2004;41:157–65.
- [35] Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* 2005;85:1–31.
- [36] Li Z, Li L, Zielke HR, et al. Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1996;148:121–8.
- [37] Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;94:2493–503.
- [38] Galis ZS, Sukhova GK, Kranzhofer R, Clark S, Libby P. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:402–6.
- [39] Zaltsman AB, Newby AC. Increased secretion of gelatinases A and B from the aortas of cholesterol fed rabbits: relationship to lesion severity. *Atherosclerosis* 1997;130:61–70.
- [40] Grote K, Flach I, Luchtfeld M, et al. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ Res* 2003;92:e80–6.
- [41] Asanuma K, Magid R, Johnson C, et al. Uniaxial strain upregulates matrix-degrading enzymes produced by human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 2003;284:H1778–84.
- [42] Chesler NC, Ku DN, Galis ZS. Transmural pressure induces matrix-degrading activity in porcine arteries ex vivo. *Am J Physiol* 1999;277:H2002–9.
- [43] Moreau P, Schiffrin EL. Role of endothelins in animal models of hypertension: focus on cardiovascular protection. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:511–21.
- [44] Camp TM, Tyagi SC, Aru GM, et al. Doxycycline ameliorates ischemic and border-zone remodeling and endothelial dysfunction after myocardial infarction in rats. *J Heart Lung Transplant* 2004;23:729–36.
- [45] Jonat C, Chung FZ, Baragi VM. Transcriptional downregulation of stromelysin by tetracycline. *J Cell Biochem* 1996;60:341–7.
- [46] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827–39.
- [47] English JL, Kassiri Z, Koskivirta I, et al. Individual timp deficiencies differentially impact pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem* 2006;281:10337–46.

# Antioxidant Treatment Reduces Matrix Metalloproteinase-2-Induced Vascular Changes in Renovascular Hypertension

Michele M. Castro<sup>a</sup>, Elen Rizzi<sup>a</sup>, Gerson J. Rodrigues<sup>a</sup>, Carla S. Ceron<sup>a</sup>,  
Lusiane M. Bendhack<sup>b</sup>, Raquel F. Gerlach<sup>c</sup>, Jose E. Tanus-Santos<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto,

<sup>b</sup> Laboratory of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto

<sup>c</sup> Department of Morphology, Estomatology and Physiology, Dental School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes, 3900; Ribeirao Preto, SP, Brazil, 14049-900

**\* Corresponding author:**

Jose Eduardo Tanus-Santos, MD, PhD.  
Department of Pharmacology  
Faculty of Medicine of Ribeirao Preto  
University of Sao Paulo  
Av. Bandeirantes, 3900  
14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil  
FAX: +55 16 3633 2301  
Phone: +55 16 3602 3163  
E-mail: [tanus@fmrp.usp.br](mailto:tanus@fmrp.usp.br)

**Running title:** antioxidants and metalloproteinases

**Acknowledgements:** This study was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil). We gratefully acknowledge the excellent technical support of Mayara Santos Gomes.

## **Antioxidant Treatment Reduces Matrix Metalloproteinase-2-Induced Vascular Changes in Renovascular Hypertension**

**Abstract:** Mounting evidence indicates that structural and functional vascular changes associated with two-kidney, one-clip (2K-1C) hypertension result, at least in part, from altered activity of matrix metalloproteinases (MMPs). Because MMPs are upregulated by increased formation of reactive oxygen species (ROS), we hypothesized that antioxidant approaches could attenuate the increases in MMP-2 expression/activity and the vascular dysfunction and remodeling associated with 2K-1C hypertension. Sham operated or 2K-1C hypertensive rats were treated with tempol 18 mg/kg/day or apocynin 25 mg/kg/day (or vehicle). Systolic blood pressure was monitored weekly. After eight weeks of treatment, aortic rings were isolated to assess endothelium-dependent and independent relaxations. Quantitative morphometry of structural changes in the aortic wall were studied in hematoxylin/eosin sections. Aortic and systemic ROS levels were measured by using dihydroethidine (DHE) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs), respectively. Aortic MMP-2 levels and activity were determined by gelatin and *in situ* zymography, fluorimetry and immunohistochemistry. Tempol and apocynin attenuated 2K-1C hypertension ( $181\pm 20.8$  and  $192\pm 17.6$  mmHg, respectively, *versus*  $213\pm 18$  mmHg in hypertensive controls; both  $P<0.05$ ) and prevented the reduction in endothelium-dependent vasorelaxation found in 2K-1C rats. Tempol, but not apocynin ( $P>0.05$ ), prevented the vascular remodeling found in 2K-1C rats (all  $P<0.01$ ). Tempol was more effective than apocynin in attenuating hypertension-induced increases in oxidative stress (both  $P<0.05$ ), MMP-2 levels, and MMP-2 activity in hypertensive rats (all  $P<0.05$ ). Our results suggest that antioxidant



approaches decrease MMP-2 upregulation and attenuate the vascular dysfunction and remodeling during 2K-1C hypertension.

**Key words:** reactive oxygen species, metalloproteinases, vascular dysfunction, 2K-1C hypertension, antioxidants.

## Introduction

Hypertension is accompanied by enhanced stress of the vessel wall, which promotes vascular remodeling and increases vascular resistance. Recent studies indicated that a group of zinc-endopeptidases called matrix metalloproteinases (MMPs) play an important role in vascular dysfunction and tissue remodeling in many cardiovascular conditions including hypertension [1-3]. Increased MMPs activation promotes excessive degradation of extracellular matrix components, vascular smooth muscle cell migration and proliferation, and monocyte invasion [4, 5], thus contributing to hypertensive structural alterations. MMP-2, specifically, can also modulate vascular contractility via proteolysis of vasoactive peptides such as big endothelin-1 (ET-1)[6], CGRP (calcitonin gene-related peptide)[7], and adrenomedullin[8]. In fact, clinical and experimental studies have found increased expression and activity of MMP-2 (72-kDa gelatinase A) and MMP-9 (92-kDa gelatinase B) in plasma and vascular tissues of hypertensive patients [9, 10] and animal models of hypertension [11-15]. We have recently found evidence suggesting that MMP-2 plays a role in structural and functional vascular changes associated with two-kidney, one clip (2K-1C) hypertension. These vascular changes were attenuated by doxycycline, a non specific MMP inhibitor [16].

Recent studies suggest that MMPs-mediated vascular remodeling and dysfunction could result from increased oxidative stress [17-19]. Increased concentrations of reactive oxygen species (ROS) have been consistently implicated as a major cause of the vascular changes associated with clinical and experimental hypertension [20, 21]. Indeed, the most important source of

ROS in blood vessels is a superoxide producing NAD(P)H oxidase, which is upregulated in many hypertensive conditions [22]. Activation of this enzyme, especially by angiotensin II, leads to functional and structural alterations in the vascular wall, thus resulting in endothelial dysfunction, increased contractility, vascular hypertrophy, and increased deposition of extracellular matrix proteins [23-25]. ROS also react with thiol-groups (which preserve MMPs latency [26]), thus activating MMPs. In fact, it has been shown that ROS enhance the expression and activity of MMPs, especially MMP-2, via xanthine oxidase [19, 27], and via mechanical stretch-induced vascular NADPH oxidase [28]. In addition to hypertension, ROS-induced MMP-2 activation has been reported to play a role in other pathophysiological cardiovascular conditions [29-32].

Although increased oxidative stress and upregulation of MMPs (especially MMP-2) have been reported in animal models of hypertension, no previous study has examined whether antioxidants could prevent the increases in vascular MMPs levels, and the vascular dysfunction and remodeling associated with hypertension. To test this hypothesis, we used tempol (a general ROS scavenger) and apocynin (a NADPH oxidase inhibitor) as antioxidants therapy in 2K-1C hypertension model, which is associated with increased systemic and tissue angiotensin II levels, enhanced oxidative stress [33], and vascular dysfunction and remodeling [16].

## **Methods**

### ***Animals and Treatments***

The study complied with guidelines of the Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, and the animals were handled according to the guiding principles published by the National Institutes of Health. Male Wistar rats (180-200 g) obtained from the colony at University of São Paulo were maintained on 12-h light/dark cycle at 25°C with free access to rat chow and water.

2K-1C hypertension was induced by clipping the left renal artery with a silver clip (0.2 mm). Sham-operated rats underwent the same surgical procedure (anesthesia with ketamine 100 mg/kg and xylazine 10 mg/kg i.p.), except for the clip placement. Animals were randomly assigned to one of six groups: 2K-1C and Sham groups that received water; 2K-1C and Sham groups that received tempol 18 mg/kg/day (4-hydroxy-tempo; Sigma); and 2K-1C and Sham groups that received apocynin 25 mg/kg/day (4-hydroxy-3-methoxyacetophenone; Sigma) by gavage [34, 35]. Treatment was started two weeks after surgery and maintained for eight weeks. Body weight and tail systolic blood pressure (SBP) were assessed weekly by tail-cuff plethysmography.

### ***Vascular Reactivity***

To assess endothelium-dependent and independent relaxations, aortic rings precontracted with phenylephrine ( $10^{-7}$  M) were used to construct cumulative concentration-response curves to acetylcholine ( $10^{-11}$ - $10^{-5}$ M) and sodium nitroprusside ( $10^{-11}$ - $10^{-6}$ M; denuded arteries), respectively.

### ***Morphometric Analysis of the Vascular Wall***

Media cross-sectional area (CSA) and media to lumen diameter (M/L) were assessed as previously described [36]. Number of vascular smooth muscle cells (VSMCs) in the aortic wall was measured by the tri-dimensional dissector method [36]. Structural analyses were evaluated by using ImageJ Program (NIH - National Institute of Health).

### ***Assessment of Vascular ROS and Lipid Peroxide Levels in Plasma***

To evaluate *in situ* production of ROS, frozen tissue sections were incubated at 25°C, with dihydroethidium (DHE) 10 µmol/L, for 30 minutes [37, 38]. Sections were examined with fluorescence microscopy. The intensity of the fluorescent was evaluated with ImageJ Program.

Vascular ROS were also analyzed in endothelial cells by flow cytometry. Cells were loaded with DHE 50 µmol/L during 20 min [39]. 2-Hydroxyethidium and ethidium were monitored by fluorescence detection (excitation 490 and emission 590 nm). Cytofluorographic analysis was performed by using a FACScan (Becton-Dickinson, San Jose- CA), and fluorescence intensity was measured using CellQuest 1.2 software (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

Plasma lipid peroxide levels were determined by measuring thiobarbituric acid reactive substances using a fluorometric method (excitation 515 and emission 553 nm) as previously described [40]. Lipoperoxide levels were expressed in malondialdehyde (MDA) (nmol/ml).

### ***Measurement of Aortic MMP-2 Levels by Gelatin Zymography***

Gelatin zymography was performed as previously described [41-43]. Tissue extracts were subjected to electrophoresis on 12% SDS-PAGE co-polymerized with gelatin (1%). Gelatinolytic activities were detected as unstained bands against the background of Coomassie blue-stained gelatin, assayed by densitometry using a Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290 (Kodak, Rochester, NY).

### ***Gelatinolytic Activity Assay and In-situ zymography***

Net MMP activities in the aortic homogenates were measured using a Gelatinolytic Activity Kit (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA). Proteolytic activity was measured using DQ Gelatin 5 µg/mL (Molecular Probes, USA) in Tris-CaCl<sub>2</sub> Buffer. This activity was evaluated in a microplate spectrofluorometer (excitation 495 and emission 515 nm; Gemini EM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) after 30 min of incubation at 37<sup>0</sup>C.

MMP activity was also measured *in situ* (media and endothelium) by using DQ Gelatin. Proteolytic activity was detected as bright green fluorescence and was evaluated by using ImageJ Program. MMPs activity was also co-localized with MMP-2 expression by immunofluorescence. Sections were incubated with primary mouse anti-human monoclonal antibody [(MMP-2 (1:1000), MAB3308, Chemicon, USA)] for 1 hour. Red fluorescence was visualized by the addition of the rhodamine conjugated as secondary antibody (1:200; AP160P, Chemicon, USA).

### ***Semiquantification of MMP-2 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP)-2 by Immunohistochemistry***

To measure MMP-2 and TIMP-2 levels, frozen aortic sections were analyzed using specific antibodies (MAB3308 and MAB13446, Chemicon, USA, respectively), and an Anti-Mouse Poly Horseradish peroxidase (HRP) Immunohistochemistry (IHC) Detection Kit (Chemicon, USA). Staining was visualized by the addition of the 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) chromogen-buffer.

### ***Statistical analysis***

Results are expressed as means  $\pm$  S.E.M. Between groups comparisons were assessed by two-way analysis of variance (SigmaStat for Windows, Jadel Scientific, USA) or by one-way ANOVA followed by the Tukey test. Probability value  $<0.05$  was considered significant.

## **Results**

### ***Effects of Antioxidants on SBP Levels in 2K-1C rats***

Baseline SBP and body weight were similar in the six experimental groups (Figs. 1A and 1B). While no significant changes in SBP were seen in Sham and Sham + antioxidants groups, SBP started to increase in 2K-1C group after the first week of the renal artery surgery with progressive increases until the end of study period (Fig. 1A). Treatment with tempol was more effective than apocynin in attenuating the increases in SBP in hypertensive rats throughout the treatment (final blood pressure:  $213 \pm 18.2$  mmHg,  $181 \pm 20.8$  mmHg, and  $192 \pm 17.6$  mmHg, respectively, in 2K-1C, 2K-1C + tempol, and 2K-1C + apocynin

groups; both  $P < 0.05$ ; Fig. 1A). No significant differences in body weight were observed among the experimental groups (Figure 1B).

### ***Effects of Antioxidants on Vascular Function and Remodeling in 2K-1C rats***

The attenuation of SBP could be related to antioxidant-induced improvement of vasorelaxation. To test this hypothesis, the rat aortic rings were isolated and their functional performance was assessed in organ chamber experiments ( $n=6$ , per group). Figures 1C and 1D show, respectively, endothelial cell-dependent, and endothelial cell independent vasorelaxation induced by acetylcholine (Ach;  $10^{-11}$ - $10^{-5}$  M), and sodium nitroprusside (SNP;  $10^{-11}$ - $10^{-6}$ M). 2K-1C hypertension was associated with significant impairment of the Ach response ( $P < 0.05$ ; Fig. 1C), although no significant alterations were seen in the response to SNP (Fig. 1D). Treatment with tempol markedly increased the Ach-induced vasorelaxation in 2K-1C aortic rats ( $P < 0.05$ ), whereas apocynin tended to produce the same effect, although it did not reach statistical significance ( $P > 0.05$ ; Fig. 1C).

Renovascular hypertension was associated with arterial wall hypertrophy, with significant increases in number of VSMCs, increased aortic CSA, and increased M/L ratio. Figures 2A and 2B show that tempol ( $P < 0.05$ ), but not apocynin ( $P > 0.05$ ), prevented the increases in media thickness, and was associated with lower number of VSMC, M/L, and CSA in hypertensive rats (all  $P < 0.01$ ).

### ***Effects of Antioxidants on Systemic and Vascular Production of ROS in 2K-1C rats***



The vascular production of ROS was assessed by fluorescence microscopy and flow cytometry using DHE in isolated aortic segments. We found increased ROS levels in the media and the endothelial cells in of thoracic aorta from 2K-1C rats compared with Sham groups (all  $P < 0.05$ ; Figs. 3A, 3B, and 3C). Treatment of 2K-1C rats with tempol was more effective than with apocynin in attenuating 2K-1C hypertension-induced increases in oxidative stress (both  $P < 0.05$ ; Figs. 3A, 3B, and 3C).

To evaluate systemic oxidative stress, plasma lipid peroxide levels were determined by measuring thiobarbituric acid reactive substances. As shown in Figure 3D, MDA levels were significantly higher in the 2K-1C group compared with Sham groups (all  $P < 0.05$ ). While treatment of 2K-1C rats with tempol was associated with MDA levels that were similar to those found in Sham groups, treatment with apocynin produced no significant effects (Fig. 3D;  $P > 0.05$ ).

#### ***Effects of Antioxidants on MMP-2 Activation and Expression in 2K-1C rats***

Gelatin zymograms were used to assess MMP levels in aortic extracts. Fig. 4A shows a representative zymogram of aortic extracts showing pro-MMP-2 and activated MMP-2 bands. Aortas from 2K-1C rats showed higher levels of both forms of MMP-2 and higher % MMP-2 activation compared with Sham groups (all  $P < 0.05$ ; Fig. 4B). Treatment with tempol, but not apocynin, significantly attenuated 2K-1C hypertension-induced increases in MMP-2 levels and % MMP-2 activation (all  $P < 0.05$ ; Fig. 4B).

To confirm these findings, we assessed net MMP activity in the aorta using a gelatinolytic activity assay, which provides a quantitative determination of total

MMP activity in tissue homogenates. Total MMPs activity was significantly higher in 2K-1C rats compared with the Sham groups (all  $P < 0.05$ ; Fig. 5C). Treatment with both antioxidants was associated with lower MMP activity in 2K-1C hypertensive rats compared with 2K-1C group, although statistical significance was not achieved in 2K-1C + apocynin group ( $P > 0.05$ ; Fig. 5C).

To further confirm these findings, *in situ* gelatinolytic activity was also studied. As shown in Figure 5A and 5B, green fluorescence was enhanced in the endothelium and in the media of thoracic aorta from 2K-1C rats compared with those found in Sham groups (all  $P < 0.05$ ). The increased gelatinolytic activity was co-localized with increased aortic MMP-2 expression in 2K-1C rats (Figs. 6A, and 6B). Importantly, treatment with tempol, but not with apocynin, significantly attenuated 2K-1C hypertension-induced increases in aortic MMP-2 activity and expression (all  $P < 0.05$ ; Figs. 5A, 5B, 6A, and 6B).

### ***Effects of Antioxidants on TIMP-2 Expression and Ratio of MMP-2/TIMP-2 in 2K-1C rats***

By using immunohistochemistry, we found further evidence showing increased MMP-2 expression in 2K-1C hypertensive rats compared with Sham groups (Fig. 6A and 6B;  $P < 0.05$ ). This increase in MMP-2 expression in 2K-1C rats was blunted by tempol ( $P < 0.05$ ), but not by apocynin (Figs. 6A and 6B). In addition, while the expression levels of TIMP-2 (a major endogenous inhibitor of MMP-2) was similar among all study groups ( $P > 0.05$ ; Fig. 6A and 6B), the MMP-2/TIMP-2 ratio was significantly higher in rats with 2K-1C hypertension compared with the Sham groups (all  $P < 0.05$ ; Fig. 6C). While treatment with tempol completely

blunted the increase in MMP-2/TIMP-2 ratio found in 2K-1C rats, apocynin produce no such effect ( $P>0.05$ ; Fig. 6C).

## **Discussion**

Hypertension is associated with well known structural and functional alterations in both resistance and conduit arteries, which may result from the interplay of several mechanisms. The major finding of the present study is that antioxidant therapy may prevent functional and structural vascular alterations of hypertension by inhibiting hypertension-induced upregulation of MMP-2 expression and activity. While this is probably the case of antioxidant therapy with tempol, the vascular NAD(P)H oxidase inhibitor (apocynin) produced less clear effects. To our knowledge, this is the first *in vivo* study showing evidence linking increased oxidative stress and upregulation of vascular MMP-2 in hypertension.

Increased concentrations of ROS have been shown to play a role in the vascular changes associated with clinical and experimental hypertension [20, 21, 44]. Consistent with this idea, we found that both drugs used in the present study, especially tempol, produced antioxidant and antihypertensive effects that were associated with improved vasorelaxation and attenuation of the vascular alterations produced by 2K-1C hypertension. However, while tempol completely blunted the increases in vascular and systemic ROS levels, apocynin produced less obvious effects. These findings agree with previous studies showing that tempol and apocynin are not equally effective in producing antihypertensive and vascular protective effects [45-48]. Although the most important source of ROS

in the vasculature is NAD(P)H oxidase, the less evident effects produced by apocynin may reflect differences in models of hypertension, or in doses or treatment time used in different studies. Moreover, increased activity of other pro-oxidants enzymes can enhance ROS production in the 2K-1C hypertension model, thus offering an explanation for the less intense effects produced by apocynin in the present study [45-48].

The increased aortic MMP-2 expression and activity found in the present study confirm previous findings and may underlie the impaired endothelial-dependent vasorelaxation, arterial wall hypertrophy, and excessive collagen and elastin deposition in the 2K-1C hypertensive rats [16]. Interestingly, we found that antioxidant therapy inhibited hypertension-induced upregulation of vascular MMP-2 expression and activity, thus offering a mechanistic insight for the protective effects associated with antioxidant therapy against the alterations induced by hypertension. In fact, increased ROS levels in 2K-1C rats may produce vascular changes that are mediated by MMPs [17-19]. These enzymes are regulated at multiple levels including gene transcription, post-translational activation, and by interaction with their endogenous inhibitors (TIMPs) [49, 50]. Enzymatic activation of MMPs requires removal of their prodomain, which can occur by thiol rupture between cysteinyl sulphhydryl group in the propeptide domain and zinc ion present in their catalytic site. Therefore, in agreement with our findings, MMP activation in 2K-1C rats may result from the reaction of increased amounts of ROS with thiol groups involved in preserving MMPs latency [26]. Further supporting our results, *in vitro* studies have shown that ROS enhance the expression and activity of MMP-2 via increased vascular pro-

oxidant enzymes [19, 27, 28, 51]. Moreover, ROS-induced MMP-2 activation has also been reported to play a role in other cardiovascular conditions [29-32].

The MMP-2/TIMP-2 expression ratio is an indicator of potential gelatinolytic activity in tissues, because TIMP-2 is a major MMP-2 inhibitor. We found that MMP-2/TIMP-2 ratio was 3-fold higher in hypertensive rats compared with tempol-treated hypertensive rats, without significant differences in TIMP-2 expression among groups. These results suggest that tempol blunts 2K-1C hypertension-induced increases in MMP-2 levels without affecting the expression of a major endogenous inhibitor of MMP-2. However, another mechanism that be relevant to the present findings is that ROS, in particular  $\text{OONO}^-$ , may alter the structural and MMP binding characteristics of the cysteine-rich TIMPs, thus reducing their ability to inhibit MMPs and favoring an increase in net MMP activity [52-54], as we have reported here. Therefore, it is possible that tempol inhibited the effects produced by ROS on net MMP-2 activity, thus blunting the development of the structural and vascular changes in 2K-1C hypertension independently of its antihypertensive effect. Together, our findings suggest that effective antioxidant therapy can prevent vascular alterations caused by hypertension.

Apocynin did not attenuate 2K-1C hypertension-induced increases in MMP-2 activity and expression. Curiously, while apocynin apparently produces controversial antioxidant effects by reacting with thiol groups and inhibiting vascular NAD(P)H oxidase complex [55-57], it may have reacted with thiol-groups involved in preserving MMPs latency, thus contributing to MMPs

activation. These opposing effects may offer an explanation for the lack of major effects of apocynin on 2K-1C hypertension-induced increases in MMP-2 levels.

In conclusion, our results suggest that antioxidant drugs can attenuate the vascular dysfunction and remodeling during 2K-1C hypertension by decreasing MMP-2 upregulation. This approach may be a promising therapeutic coadjuvant in the therapy or prevention of the vascular alterations caused by hypertension.

## References

- [1] Galis, Z. S.; Khatri, J. J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* **90**:251-262; 2002.
- [2] Chow, A. K.; Cena, J.; Schulz, R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol* **152**:189-205; 2007.
- [3] Sluijter, J. P.; de Kleijn, D. P.; Pasterkamp, G. Vascular remodeling and protease inhibition--bench to bedside. *Cardiovasc Res* **69**:595-603; 2006.
- [4] Nagase, H.; Woessner, J. J. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. **274**:21491-21494.; 1999.
- [5] Newby, A. C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res* **69**:614-624; 2006.
- [6] Fernandez-Patron, C.; Radomski, M. W.; Davidge, S. T. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res* **85**:906-911; 1999.
- [7] Fernandez-Patron, C.; Stewart, K. G.; Zhang, Y.; Koivunen, E.; Radomski, M. W.; Davidge, S. T. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. *Circ Res* **87**:670-676; 2000.
- [8] Martinez, A.; Oh, H. R.; Unsworth, E. J.; Bregonzio, C.; Saavedra, J. M.;

- Stetler-Stevenson, W. G.; Cuttitta, F. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. *Biochem J* **383**:413-418; 2004.
- [9] Yasmin; McEniery, C. M.; Wallace, S.; Dakham, Z.; Pulsalkar, 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**:372-378; 2005.
- [10] Martinez, M. L.; Lopes, L. F.; Coelho, E. B.; Nobre, F.; Rocha, J. B.; Gerlach, R. F.; Tanus-Santos, J. E. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-9 activity in patients with hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* **47**:117-122; 2006.
- [11] Bouvet, C.; Gilbert, L. A.; Girardot, D.; deBlois, D.; Moreau, P. Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition. *Hypertension* **45**:432-437; 2005.
- [12] Watts, S. W.; Rondelli, C.; Thakali, K.; Li, X.; Uhal, B.; Pervaiz, M. H.; Watson, R. E.; Fink, G. D. Morphological and biochemical characterization of remodeling in aorta and vena cava of DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**:H2438-2448; 2007.
- [13] Lehoux, S.; Lemarie, C. A.; Esposito, B.; Lijnen, H. R.; Tedgui, A. Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. *Circulation* **109**:1041-1047; 2004.
- [14] Flamant, M.; Placier, S.; Dubroca, C.; Esposito, B.; Lopes, I.; Chatziantoniou, C.; Tedgui, A.; Dussaule, J. C.; Lehoux, S. Role of matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling. *Hypertension* **50**:212-218; 2007.
- [15] Camp, T. M.; Tyagi, S. C.; Aru, G. M.; Hayden, M. R.; Mehta, J. L.; Tyagi, S. C. Doxycycline ameliorates ischemic and border-zone remodeling and endothelial dysfunction after myocardial infarction in rats. *J Heart Lung Transplant* **23**:729-736; 2004.
- [16] Castro, M. M.; Rizzi, E.; Figueiredo-Lopes, L.; Fernandes, K.; Bendhack, L. M.; Pitol, D. L.; Gerlach, R. F.; Tanus-Santos, J. E. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis* **198**:320-331;

2008.

- [17] Castier, Y.; Brandes, R. P.; Leseche, G.; Tedgui, A.; Lehoux, S. p47phox-dependent NADPH oxidase regulates flow-induced vascular remodeling. *Circ Res* **97**:533-540; 2005.
- [18] Luchtefeld, M.; Grote, K.; Grothusen, C.; Bley, S.; Bandlow, N.; Selle, T.; Struber, M.; Haverich, A.; Bavendiek, U.; Drexler, H.; Schieffer, B. Angiotensin II induces MMP-2 in a p47phox-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* **328**:183-188; 2005.
- [19] Rajagopalan, S.; Meng, X. P.; Ramasamy, S.; Harrison, D. G.; Galis, Z. S. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* **98**:2572-2579; 1996.
- [20] Touyz, R. M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* **44**:248-252; 2004.
- [21] Griendling, K. K.; FitzGerald, G. A. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation* **108**:2034-2040; 2003.
- [22] Zalba, G.; San Jose, G.; Moreno, M. A.; Fortuno, A.; Beaumont, F. J.; Diez, J. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* **38**:5; 2001.
- [23] Cai, H.; Griendling, K. K.; Harrison, D. G. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* **24**:471-478; 2003.
- [24] Lassegue, B.; Griendling, K. K. Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens* **17**:852-860; 2004.
- [25] Escobales, N.; Crespo, M. J. Oxidative-nitrosative stress in hypertension. *Current Vascular Pharmacology* **3**:231-246; 2005.
- [26] 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:5578-5582; 1990.
- [27] Valentin, F.; Bueb, J. I.; Kieffer, P.; Tschirhart, E.; Atkinson, J. Oxidative stress activates MMP-2 in cultured human coronary smooth muscle cells. *Fundamental and Clinical Pharmacology* **19**:661-667.; 2005.



- [28] 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. *Circ Res* **92**:e80-86; 2003.
- [29] Wang, W.; Sawicki, G.; Schulz, R. Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2. *Cardiovasc Res* **53**:165-174; 2002.
- [30] 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* **112**:544-552; 2005.
- [31] Wang, W.; Schulze, C. J.; Suarez-Pinzon, W. L.; Dyck, J. R.; Sawicki, G.; Schulz, R. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* **106**:1543-1549; 2002.
- [32] Schulz, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**:211-242; 2007.
- [33] Lerman, L. O.; Chade, A. R.; Sica, V.; Napoli, C. Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med* **146**:160-173; 2005.
- [34] Sainz, J.; Wangenstein, R.; Rodriguez Gomez, I.; Moreno, J. M.; Chamorro, V.; Osuna, A.; Bueno, P.; Vargas, F. Antioxidant enzymes and effects of tempol on the development of hypertension induced by nitric oxide inhibition. *Am J Hypertens* **18**:871-877; 2005.
- [35] Beswick, R. A.; Dorrance, A. M.; Leite, R.; Webb, R. C. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension* **38**:1107-1111; 2001.
- [36] Dao, H. H.; Lemay, J.; de Champlain, J.; deBlois, D.; Moreau, P. Norepinephrine-induced aortic hyperplasia and extracellular matrix deposition are endothelin-dependent. *J Hypertens* **19**:1965-1973; 2001.
- [37] Hao, L.; Nishimura, T.; Wo, H.; Fernandez-Patron, C. Vascular responses to alpha1-adrenergic receptors in small rat mesenteric arteries depend on mitochondrial reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**:819-825; 2006.

- [38] Viel, E. C.; Benkirane, K.; Javeshghani, D.; Touyz, R. M.; Schiffrin, E. L. Xanthine Oxidase and Mitochondria Contribute to Vascular Superoxide Anion Generation in DOCA-Salt Hypertensive Rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 2008.
- [39] Fernandes, D. C.; Wosniak, J., Jr.; Pescatore, L. A.; Bertoline, M. A.; Liberman, M.; Laurindo, F. R.; Santos, C. X. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**:C413-422; 2007.
- [40] Cau, S. B.; Dias-Junior, C. A.; Montenegro, M. F.; de Nucci, G.; Antunes, E.; Tanus-Santos, J. E. Dose-dependent beneficial hemodynamic effects of BAY 41-2272 in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. *Eur J Pharmacol* **581**:132-137; 2008.
- [41] Souza-Tarla, C. D.; Uzuelli, J. A.; Machado, A. A.; Gerlach, R. F.; Tanus-Santos, J. E. Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Clin Biochem* **38**:410-414; 2005.
- [42] Gerlach, R. F.; Demacq, C.; Jung, K.; Tanus-Santos, J. E. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clin Biochem* **40**:119-123; 2007.
- [43] Gerlach, R. F.; Uzuelli, J. A.; Souza-Tarla, C. D.; Tanus-Santos, J. E. Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Anal Biochem* **344**:147-149; 2005.
- [44] Rodrigues, G. j.; Lunardi, C. n.; Lima, R. g.; Santos, C. x.; Laurindo, F.; da Silva, R.; Bendhack, L. M. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. *Nitric Oxide* **18**:176-183.; 2008.
- [45] Salguero, G.; Akin, E.; Templin, C.; Kotlarz, D.; Doerries, C.; Landmesser, U.; Grote, K.; Schieffer, B. Renovascular hypertension by two-kidney one-clip enhances endothelial progenitor cell mobilization in a p47phox-dependent manner. *J Hypertens* **26**:257-268; 2008.
- [46] Sousa, T.; Pinho, D.; Morato, M.; Marques-Lopes, J.; Fernandes, E.; Afonso, J.; Oliveira, S.; Carvalho, F.; Albino-Teixeira, A. Role of superoxide and hydrogen peroxide in hypertension induced by an antagonist of adenosine receptors. *Eur J Pharmacol* **588**:267-276; 2008.
- [47] Rugale, C.; Delbosc, S.; Mimran, A.; Jover, B. Simvastatin reverses

target organ damage and oxidative stress in Angiotensin II hypertension: comparison with apocynin, tempol, and hydralazine. *J Cardiovasc Pharmacol* **50**:293-298; 2007.

[48] Park, J. b.; Touyz, R.; Chen, X.; Schiffrin, E. L. Chronic treatment with a superoxide dismutase mimetic prevents vascular remodeling and progression of hypertension in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats.

*American Journal Hypertension* **15**:78-84.; 2002.

[49] Matrisian, L. M. Matrix metalloproteinase gene expression. *Ann N Y Acad Sci* **732**:42-50; 1994.

[50] Murphy, G.; Willenbrock, F.; Crabbe, T.; O'Shea, M.; Ward, R.; Atkinson, S.; O'Connell, J.; Docherty, A. Regulation of matrix metalloproteinase activity.

*Ann. N Y Acad. Sci.* **732**:31-41.; 1994.

[51] Deem, T. I.; Cook-Mills, J. M. Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) activation of endothelial cell matrix metalloproteinases: role of reactive oxygen species. *Blood* **104**:2385-2393.; 2004.

[52] Frears, E. R.; Zhang, Z.; Blake, D. R.; O'Connell, J. P.; Winyard, P. G. Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by peroxynitrite. *FEBS Lett* **381**:21-24; 1996.

[53] Chakraborti, S.; Mandal, A.; Das, S.; Chakraborti, T. Inhibition of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger by peroxynitrite in microsomes of pulmonary smooth muscle: role of matrix metalloproteinase-2. *Biochim Biophys Acta* **1671**:70-78; 2004.

[54] Donnini, S.; Monti, M.; Roncone, R.; Morbidelli, L.; Rocchigiani, M.; Oliviero, S.; Casella, L.; Giachetti, A.; Schulz, R.; Ziche, M. Peroxynitrite inactivates human-tissue inhibitor of metalloproteinase-4. *FEBS Lett* **582**:1135-1140; 2008.

[55] Ximenes, V. F.; Kanegae, M. P.; Rissato, S. R.; Galhiane, M. S. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition. *Arch Biochem Biophys* **457**:134-141; 2007.

[56] Wang, Q.; Smith, R. E.; Luchtefeld, R.; Sun, A. Y.; Simonyi, A.; Luo, R.; Sun, G. Y. Bioavailability of apocynin through its conversion to glycoconjugate but not to diapocynin. *Phytomedicine* **15**:496-503; 2008.

[57] Heumuller, S.; Wind, S.; Barbosa-Sicard, E.; Schmidt, H. H.; Busse, R.; Schroder, K.; Brandes, R. P. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension* **51**:211-217; 2008.

## LEGENDS FOR FIGURES:

**Fig. 1.** Systolic blood pressure (mmHg) measured by tail-cuff method (panel A), and body weight (panel B) in the six experimental groups during the study period (n=20 per group for panels A and B). Endothelial cell-dependent vasorelaxation induced by Ach (panel C), and endothelial cell-independent relaxation induced by sodium nitroprusside (panel D) in rat aortic rings preparations were studied after preconstruction with phenylephrine ( $10^{-7}$  M); (n=6 per group for panels C and D). Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M.

\*  $P < 0.05$  versus Sham groups.

\*\*  $P < 0.05$  versus 2K-1C and Sham groups

**Fig. 2.** Effect of antioxidants on structural modifications induced in the aortas from 2K-1C hypertensive rats. Panel A shows representative photographs of aortic samples (x400) stained by hematoxylin and eosin (H&E). Panel B shows the values for vascular smooth muscle cells number per length of aorta, the values for thoracic aorta medial cross-sectional area (CSA), and the values for media to lumen ratio (M/L). Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. (n=6 per group).

\*  $P < 0.05$  versus Sham groups.

#  $P < 0.01$  versus 2K-1C + tempol group.

**Fig. 3.** Effect of antioxidants on vascular ROS production. Panel A shows representative fluorescence photomicrographs (x400) of cryosections DHE-aortic samples. Red fluorescence represents  $\cdot\text{O}_2^-$  production. Panels B and C show semi-quantification of aortic fluorescence and quantitative analysis of aortic fluorescence by flow cytometry, respectively. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. (n=5 per group). \* P<0.05 versus all the other groups. Panel D shows the effects of antioxidants on plasma ROS concentrations. Thiobarbituric acid reactive substances expressed in terms of malondialdehyde (MDA) in plasma of hypertensive rats. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. (n=12 per group).

\* P<0.05 versus Sham and 2K-1C + tempol groups.

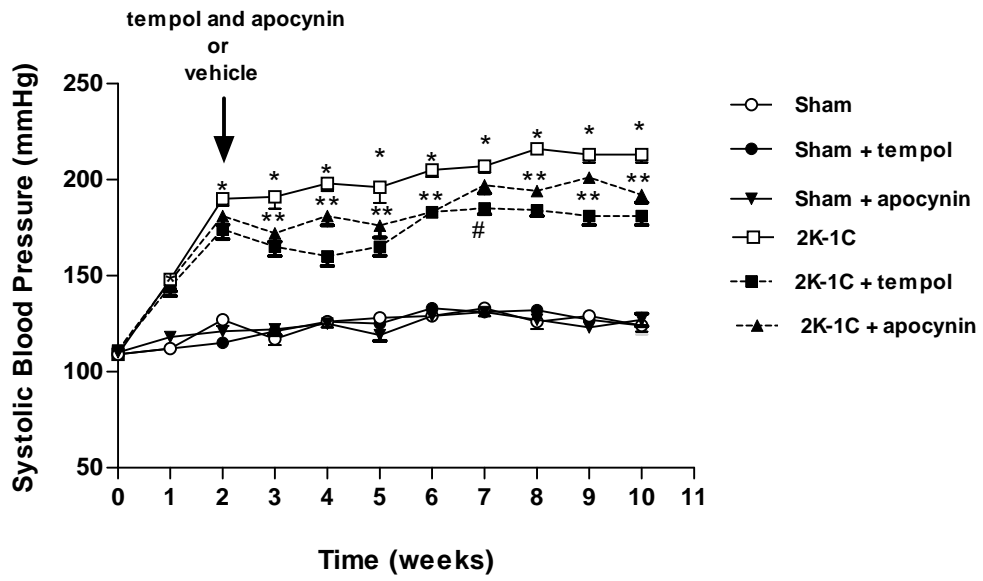
**Fig. 4.** Panel A shows a representative SDS-PAGE gelatin zymogram of aortic samples. Pro and active forms of MMP-2 were identified after electrophoresis on 12% SDS-PAGE. Std: internal standard. Panel B shows the values for Pro-MMP-2, MMP-2 and percentage of MMP-2 activation in the aortas. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. (n=7-12 per group).

\* P<0.05 *versus* Sham groups and 2K-1C + tempol group.

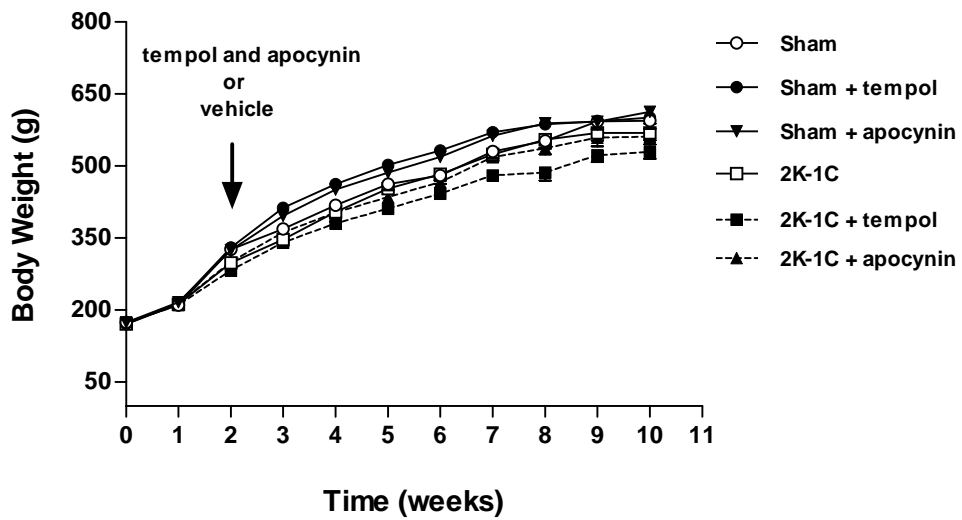
**Fig. 5.** In-situ gelatinase activity and respective MMP-2 immunofluorescence in hypertensive-treated aortas (x400). Panel A shows representative photographs of gelatinase activity, MMP-2 expression, and their co-localization in vessels surface. (B) Quantification of percentage of vessel surface area covered by bright green fluorescence, characterized by gelatinolytic activity. Panel C shows the effects of antioxidants on net activity of MMPs. Phenantroline 1mM and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 1 mM were used to confirm the activity of MMPs in thoracic aorta. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. (n=5-8 per group). \*P<0.05 versus Sham groups and 2K-1C + tempol group.

**Fig. 6.** Panel A shows representative photographs of immunostaining of MMP-2 and TIMP-2 performed in the endothelium and media of hypertensive-treated rats (x400). Quantification of brown staining of MMP-2 and TIMP-2 (B) was performed using 4 to 5 sections per aorta. Panel C shows the MMP-2/TIMP-2 ratio. Values are mean  $\pm$  S.E.M.; (n=4-5 per group). \* P<0.05 *versus* Sham groups and 2K-1C + tempol group.

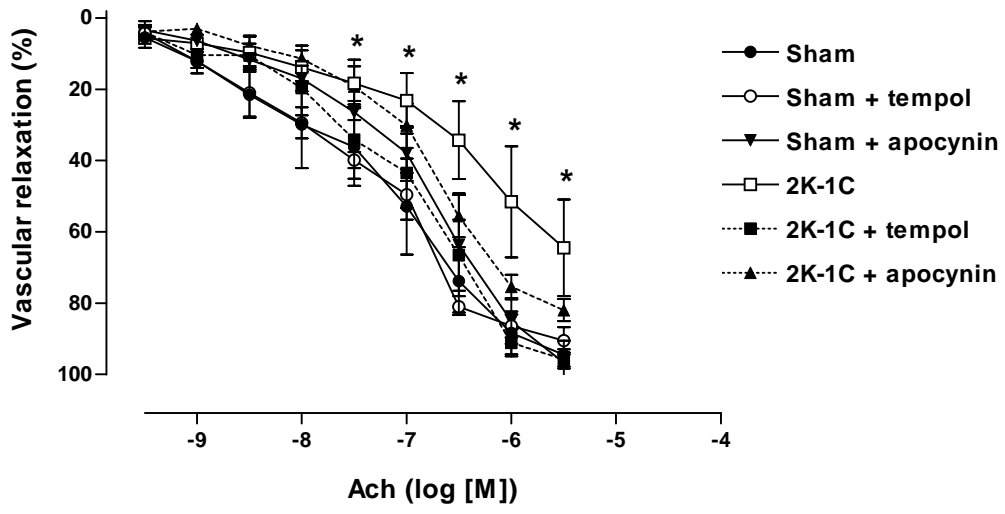
A



B



**A**



**B**

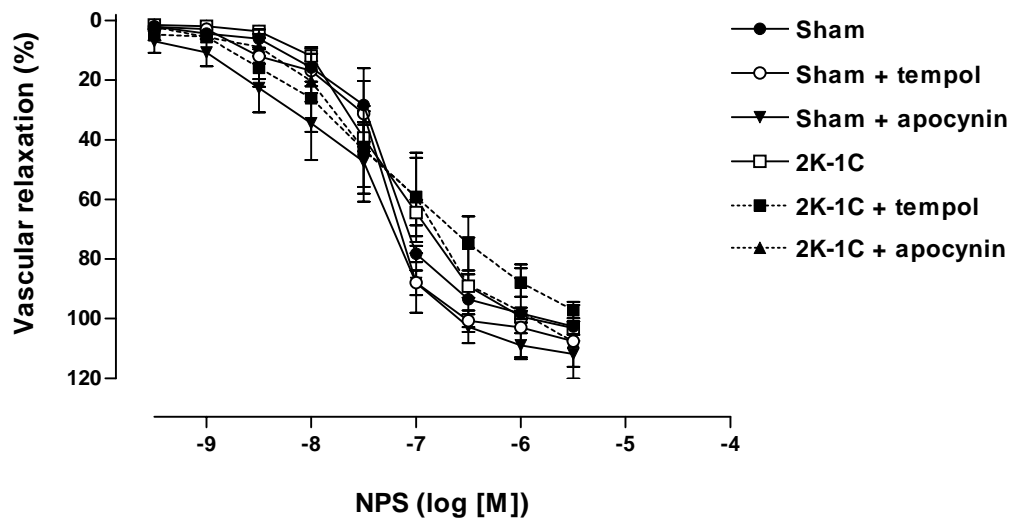


Figure 1



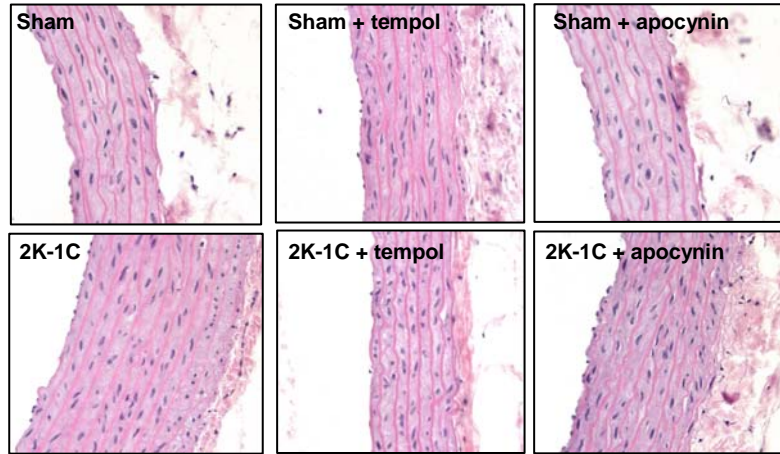
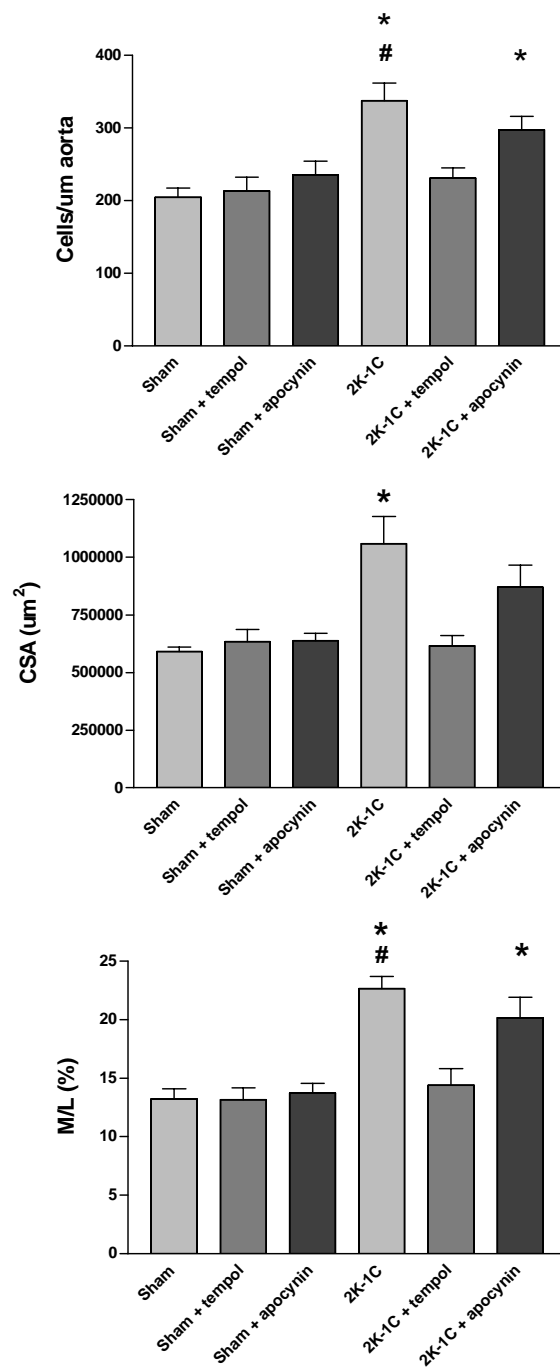
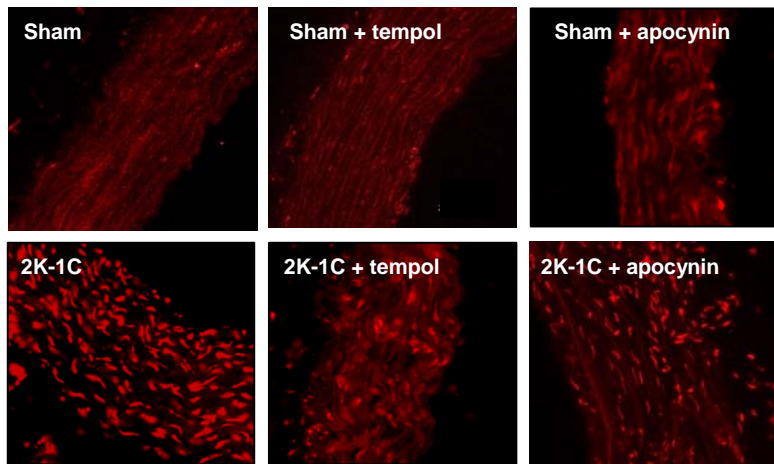
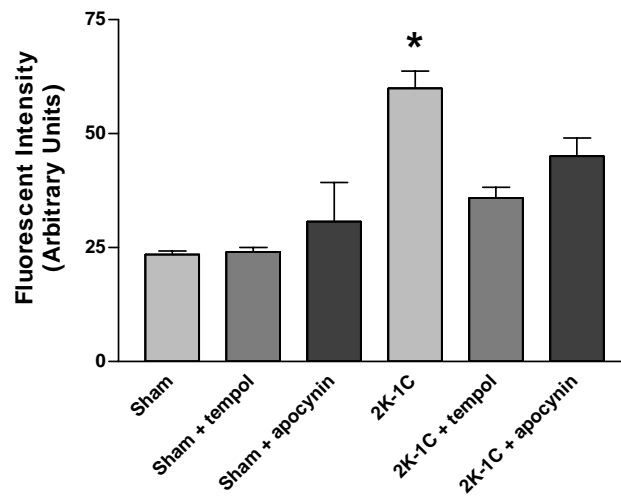
**A****B**

Figure 2

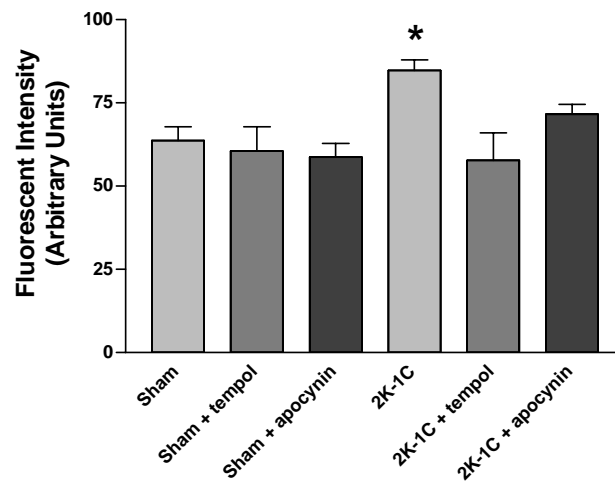
**A**



**B**



**C**



D

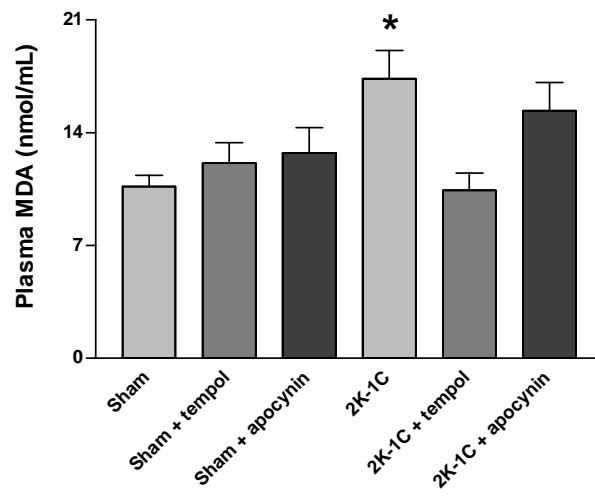


Figure 3

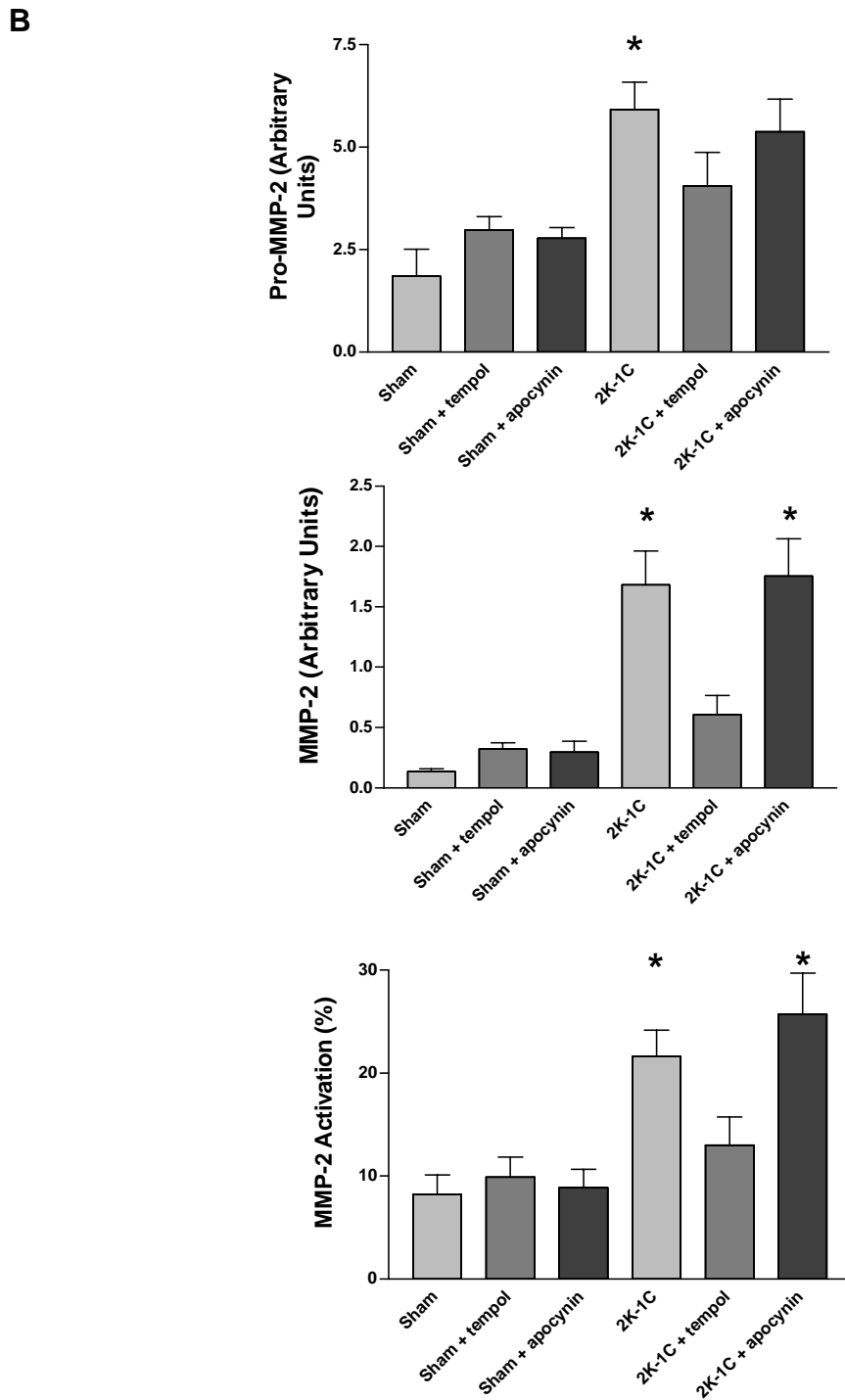
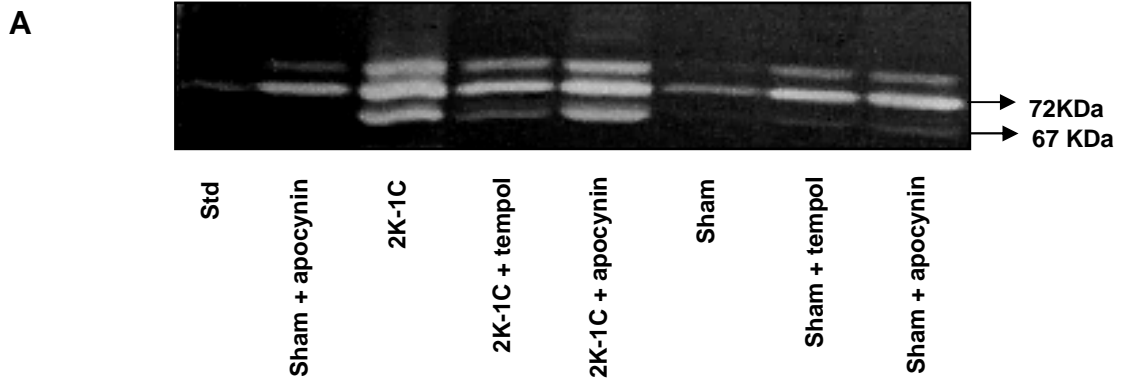


Figure 4

A

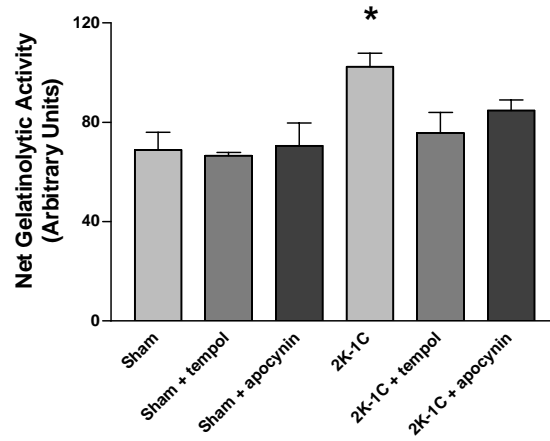
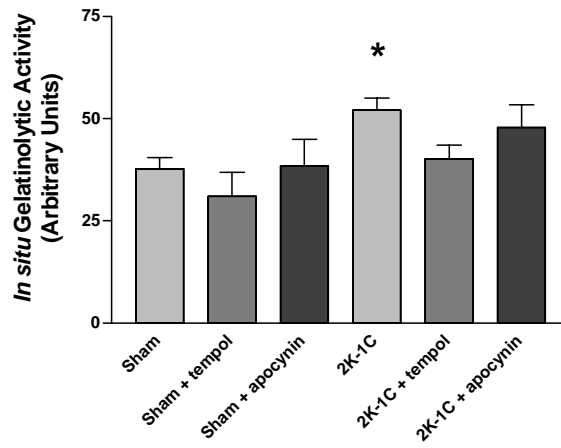
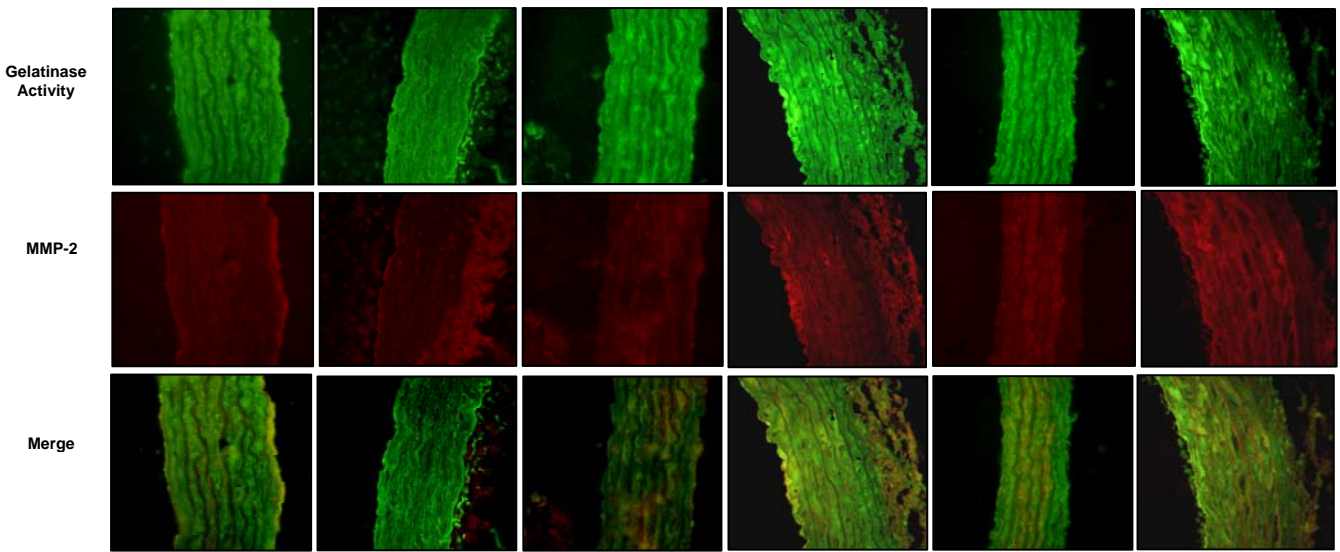
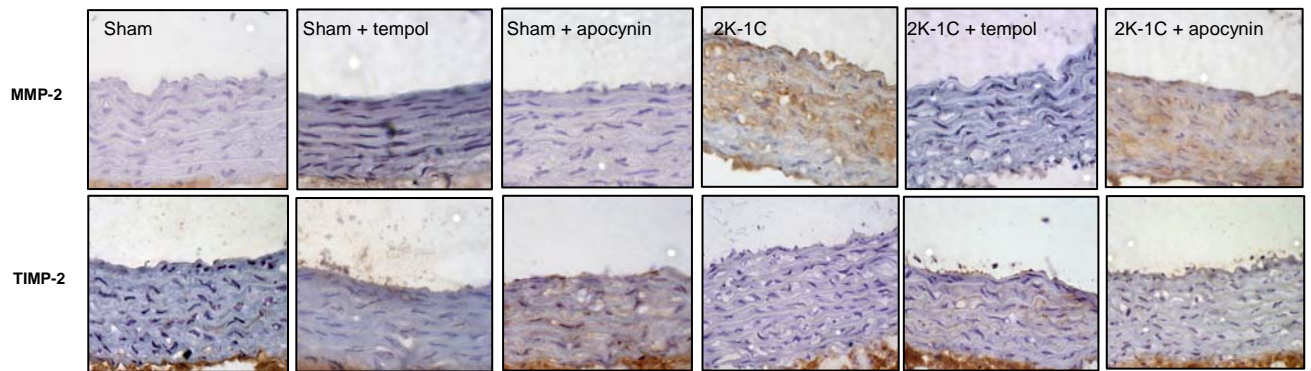
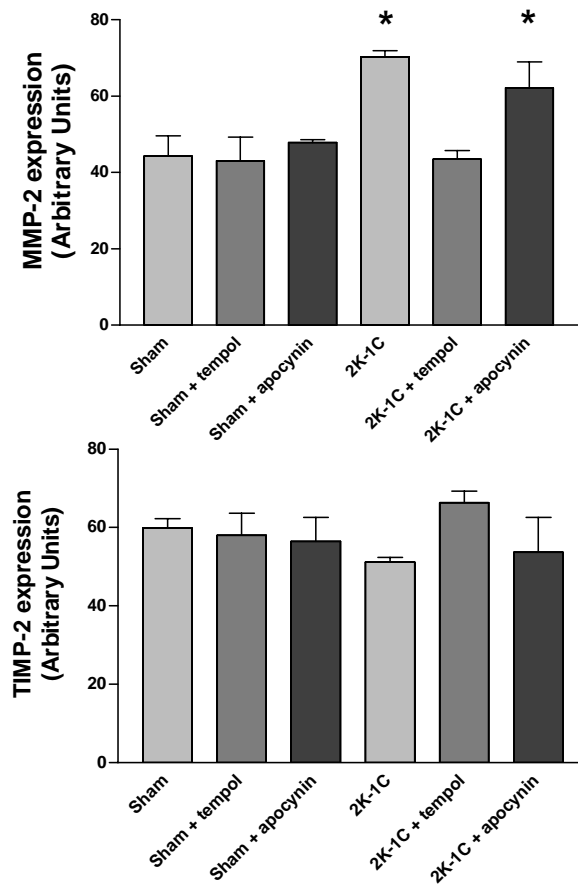
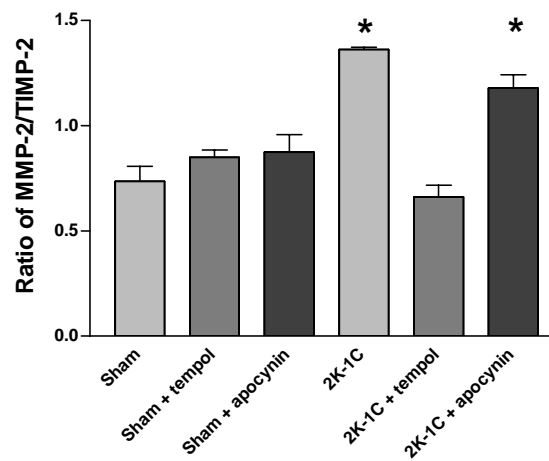


Figure 5

**A****B****C**

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)