

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

**DANIELLE APARECIDA GUIMARÃES**

**Efeitos de diferentes doses de doxiciclina sobre as  
alterações vasculares associadas à hipertensão  
experimental 2R1C**

**Ribeirão Preto – SP**

**2010**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**DANIELLE APARECIDA GUIMARÃES**

**Efeitos de diferentes doses de doxiciclina sobre as  
alterações vasculares associadas à hipertensão  
experimental 2R1C**

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

**Área de concentração: Farmacologia**

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

**Ribeirão Preto**

**2010**

**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**

Guimarães, Danielle Aparecida

Efeitos de diferentes doses de doxiciclina sobre as alterações vasculares associadas à hipertensão experimental 2R1C. Ribeirão Preto, 2010.

79 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Tanus-Santos, José Eduardo.

1. Metaloproteinases.
2. Doxiciclina.
3. Remodelamento vascular.
4. Hipertensão.
5. 2R1C.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Danielle Aparecida Guimarães

**Efeitos de diferentes doses de doxiciclina sobre as alterações vasculares associadas à hipertensão experimental 2R1C.**

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

**Área de concentração: Farmacologia**

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

### **Banca examinadora:**

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Instituição: FMRP – USP

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

Prof. Dra. Lusiane Maria Bendhack

Instituição: FMRP – USP

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

Prof. Dra. Fernanda Marciano Consolim-Colombo

Instituição: USP – INCOR

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

***Dedico esse trabalho aos meus pais, pelo dom da vida, pelo amor e por abdicarem de seus sonhos para tornar o meu realidade.***

*...A vida é um aprendizado constante, é amadurecer com o sofrimento... Mesmo assim, sorrir e chorar a qualquer hora fazem de mim uma eterna criança cheia de sonhos e esperanças.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, porque mesmo que o mundo me fizesse chorar, ele estava ao meu lado me fazendo sorrir e aliviando meu sofrimento.

Às minhas irmãs queridas, meu irmão e meu sobrinho, que me apoiaram e deram incentivo, confiança e amor incondicional. Vocês foram essenciais nesta caminhada!

Ao Felipe pelo companheirismo, carinho e amor dedicados. Por dedicar-se intensamente a mim nas horas de angústia, e me acalmar e fazer sorrir sempre. Seu amor faz brilhar meus olhos e me dá segurança para seguir em frente.

Ao professor José Eduardo Tanus dos Santos pela orientação, confiança e ensinamentos acadêmicos oferecidos.

Aos professores Raquel Fernanda Gerlach e Carlos Renato Tirapelli por disponibilizarem seus laboratórios e pelos ensinamentos acadêmicos.

Às amigas de Juiz de Fora (Fernanda, Luana, Luciana M., Luciane e Luciana G.) que me ofereceram uma amizade sincera e fiel e que mesmo de longe torceram por mim e me apoiaram.

À Florzinha Lorena, amiga de ontem, hoje e sempre, que me conhece, me compreende e sempre me oferece um ombro para chorar.

Aos amigos Stêfany, Élen, Carla e Alisson pelo carinho, incentivo e conselhos. Vocês me cativaram e vão estar para sempre na minha vida.

À querida amiga Laura, e aos meus queridos amigos, Rafael e Paulo pelas risadas e pelos momentos inesquecíveis.

Aos amigos do grupo “Hipertensão” - Élen, Carla, Alisson e Diogo pela paciência, conselhos, ajuda e ensinamentos, e por estarem ao meu lado sempre. Amigos como vocês são difíceis de encontrar e impossíveis de esquecer. Obrigada por poder contar com todos vocês.

A todos os amigos do laboratório de Farmacologia Cardiovascular, pela amizade, paciência e bons momentos vividos.

Aos professores do departamento de farmacologia da FMRP-USP pela contribuição acadêmica.

Aos funcionários José Waldik Ramon, às queridas secretárias Fátima e Soninha pelo apoio, ajuda profissional e dedicação. E aos demais funcionários, Elenir, Serginho (odontologia) e Júnia pelo excelente auxílio técnico e colaboração.

Aos membros da banca Dr<sup>a</sup> Lusiane Maria Bendhack, Dr<sup>a</sup> Fernanda Marciano Consolim-Colombo por aceitarem o convite, pela disponibilidade e pelos ensinamentos oferecidos.

A todos os funcionários, e amigos do departamento de Farmacologia pela amizade e serviços prestados.

Ao apoio financeiro do Cnpq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

*“A princípio bastaria ter saúde e amor, o que já é um pacote louvável, mas nossos desejos são ainda mais complexos...”*

*Mário Quintana.*

## RESUMO

GUIMARÃES, D. A. **Efeitos de diferentes doses de doxiciclina sobre as alterações vasculares associadas à hipertensão experimental 2R1C.** 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

A hipertensão arterial provoca alterações vasculares que estão associadas com o aumento da atividade das metaloproteinases (MMPs). Embora estas alterações possam ser atenuadas pela doxiciclina, um inibidor não seletivo de MMPs, nenhum estudo anterior avaliou o efeito de diferentes doses de doxiciclina sobre estas alterações. No presente trabalho estudamos os efeitos da doxiciclina nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg/dia sobre as alterações vasculares encontradas no modelo de hipertensão renal 2 rins-1 clipe (2R1C). A pressão arterial sistólica (PAS) foi monitorada durante as quatro semanas de tratamento com a doxiciclina. Anéis de aorta foram isolados para avaliar o relaxamento dependente do endotélio. Morfometria quantitativa das mudanças estruturais na parede da aorta foram estudadas através de cortes histológicos corados com hematoxilina/eosina. Os níveis aórticos de MMP-2 e a atividade proteolítica foram determinados por zimografia em gel e *in situ*, respectivamente. O tratamento com doxiciclina nas três diferentes doses apresentou efeito hipotensor, ao reduzir de forma significativa a PAS dos animais 2R1C tratados com doxiciclina em relação aos animais 2R1C tratados com veículo ( $195,4 \pm 3,9$  mmHg *versus*  $177,2 \pm 6,2$  mmHg,  $176,3 \pm 4,5$  mmHg e  $173 \pm 5,1$  mmHg nos ratos hipertensos 2R1C tratados com veículo, ou com doxiciclina, 3, 10, 30 mg /kg/dia, respectivamente na sexta semana ( $P < 0,01$ )). No entanto, apenas a maior dose de doxiciclina normalizou a resposta relaxante da ACh ( $P < 0,05$ ), a hipertrofia vascular e o aumento dos níveis da MMP-2 induzidos pela hipertensão

2R1C ( $P < 0,05$ ). Não foram observadas mudanças significativas entre os animais controle (Sham+veículo, Sham+doxi 3, Sham+doxi 10, Sham+doxi 30) em relação a todos os parâmetros estudados. Em conclusão, estes resultados sugerem que a doxiciclina diminui a atividade da MMP-2, melhorando assim a disfunção endotelial, e o remodelamento vascular encontrados nesse modelo de hipertensão renovascular. Além disso, menores doses de doxiciclina não atenuam estas alterações vasculares.

Palavras-chave: hipertensão 2R1C, doxiciclina, metaloproteinases, remodelamento vascular.

## ABSTRACT

GUIMARÃES, D. A. **Effects of different doses of doxycycline on vascular changes associated with experimental hypertension.** 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Hypertension induces vascular alterations that are associated with upregulation of matrix metalloproteinases (MMPs). While these alterations may be blunted by doxycycline, a non-selective MMPs inhibitor, no previous study has examined the effects of different doses of doxycycline on these alterations. We studied the effects of doxycycline at 3, 10, and 30 mg/kg/day on the vascular alterations found in the two kidney-one clip (2K1C) renal hypertension model. Systolic blood pressure (SBP) was monitored during four weeks of doxycycline treatment. Aortic rings were isolated to assess endothelium dependent relaxation. Quantitative morphometry of structural changes in the aortic wall was studied in hematoxylin/eosin stained sections. Aortic MMP-2 levels and proteolytic activity were determined by gelatin and *in situ* zymography, respectively. Treatment with doxycycline in three different doses demonstrated a hypotensive effect, reducing significantly the SBP in 2K1C animals treated with doxycycline compared with 2K1C+ vehicle ( $195.4 \pm 3.9$  mmHg *versus*  $177.2 \pm 6.2$  mmHg,  $176.3 \pm 4.5$  mmHg, and  $173 \pm 5.1$  mmHg in 2K1C hypertensive rats treated with vehicle, or doxycycline at 3, 10, 30 mg/kg/day, respectively ( $P < 0.01$ )). However, only the highest dose normalized the Ach relaxation ( $P < 0.05$ ), vascular hypertrophy, and increases in MMP-2 levels ( $P < 0.05$ ). There were no changes between animals control (Sham+vehicle, Sham+doxy 3, Sham+doxy 10, Sham+doxy 30) in all parameters studied. In conclusion, our results suggest that doxycycline decreases the activity of MMP-2 and thus improves vascular endothelial dysfunction and

remodeling found in this model of renovascular hypertension. Moreover, relatively low doses of doxycycline do not attenuate these vascular alterations.

**Keywords:** 2K1C hypertension, doxycycline, metalloproteinases, vascular remodeling.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**2R1C** – Dois-rins, um-clipe

**ACh** – Acetilcolina

**Ae** – Área externa

**Ai** – Área interna

**Ang II**- Angiotensina II

**ANOVA** – Análise de Variância

**APS**- Persulfato de amônio

**AST**- Área de secção transversal

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

**BSA**- Albumina do soro bovino

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

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

**DE**- Diâmetro externo

**DI**- Diâmetro interno

**DQ gelatin**- Substrato fluorescente para determinar a atividade gelatinolítica

**Doxi**- Doxiciclina

**EPM**- Erro padrão da média

**ET1** - Endotelina 1

**FDA**- US Food and Drug Administration

**Fen**- Fenantrolina

**g**- Gramas

**µg**- Microgramas

**i.p.**- Intra peritoneal

**HCl**- Ácido clorídrico

**H&E**- Hematoxilina e eosina

**K<sup>+</sup>**- Potássio

**KCl**- Cloreto de potássio

**KDa**- Quilodaltons

**Kg**- Quilograma

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

**L**- Litro

**μL**- Microlitros

**M**- Molar

**mM**- Milimolar

**μM**- Micromolar

**μm**- Micromol

**mmol** - Milimol

**mL**- Mililitros

**mg**- Miligramas

**mmHg** – Milímetros de mercúrio

**Média**- Camada média

**M/L**- Razão média/lúmen

**MMPs**- Metaloproteinases

**MgSO<sub>4</sub>**- Sulfato de magnésio

**MT-MMPs**- MMP de membrana

**N**- Número de experimentos

**nmol**- Nanomol

**Na<sup>+</sup>**- Sódio

**NaCl**- Cloreto de sódio

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

**OCT**- Composto para congelar tecidos

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

**PA**- Pressão arterial

**PAD**- Padrão interno

**PAS**- Pressão arterial sistólica

**PBS**- Tampão salina fosfato

**pD<sub>2</sub>**- Logaritmo negativo da EC50

**PFA**- Paraformaldeído

**pH**- Potencial hidrogeniônico

**PMSF**- Fenilmetilsulfonil

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

**SDS**- Dodecil sulfato de sódio

**Sham**- Rato controle

**TEMED**- Tetrametil etilenodiamina

**TIMPs**- Inibidores endógenos de MMPs

**VSMC**- Células musculares lisas vasculares

**Zn<sup>2+</sup>**- Zinco

**ZnCl<sub>2</sub>**- Cloreto de zinco

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

### **FIGURAS:**

- Figura 1** - Representação esquemática da estrutura das MMPs.....24
- Figura 2** - Ativação da MMP-2 por remoção proteolítica do domínio pró-peptídeo resultando na forma ativa de 64 KDa, e ativação por estresse oxidativo, sem remoção do pró-peptídeo .....26
- Figura 3** - Representação esquemática da regulação do tônus vascular pela MMP-2.....28
- Figura 4** - Mecanismo de inibição da MMP-7 pela doxíciclina .....29
- Figura 5** - Efeito da doxíciclina sobre a pressão arterial sistólica e o peso corporal. ....51
- Figura 6** - Efeitos da doxíciclina sobre o relaxamento vascular dependente do endotélio induzido por Ach, relaxamento máximo (E<sub>max</sub> %) e pD<sub>2</sub> em anéis de aorta. ....53
- Figura 7** - Efeitos da doxíciclina sobre as alterações estruturais induzidas na aorta associadas à hipertensão 2R-1C .....55
- Figura 8** - Efeitos da doxíciclina sobre a proliferação de células musculares lisas....56
- Figura 9** - Efeitos da doxíciclina sobre os níveis de MMP-2 na aorta dos oito grupos experimentais. ....58

**Figura 10** - Efeitos da doxiciclina sobre a atividade gelatinolítica *in situ* e nos níveis de MMP-2 nas aortas.....59

**Figura 11** - Efeito da doxiciclina em diferentes concentrações (de 0,8 a 200 µm) sobre a atividade da MMP-2 recombinante .....61

**TABELAS:**

**Tabela 1** - Valores da pressão arterial sistólica (mmHg) dos animais durante as seis semanas de experimento nos oito grupos experimentais (n=20)..... 50

**Tabela 2** - Valores do peso dos animais (g) durante as seis semanas de experimento nos oito grupos experimentais (n=20) .....50

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
1 - Alterações fisiopatológicas da hipertensão arterial .....	20
1.1 - Remodelamento vascular .....	21
1.2 - O modelo de hipertensão 2R1C .....	22
2 - As metaloproteinases da matriz extracelular .....	23
2.1 - Importância da MMP-2 na hipertensão arterial .....	25
3 - Efeitos da doxiciclina sobre as MMPs.....	28
<b>HIPÓTESE .....</b>	<b>32</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
1 - Considerações gerais .....	36
1.1 - Hipertensão arterial induzida pela técnica de Goldblatt.....	36
1.2 - Grupos experimentais.....	37
2 - Materiais .....	38
2.1 - Soluções utilizadas nos experimentos:.....	38
2.2 - Drogas administradas diretamente nos animais: .....	40
2.3 - Equipamentos utilizados nos experimentos:.....	40
2.4 - Programas de aquisição de dados: .....	40
3 - Métodos .....	41
3.1 - Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos .....	41
3.1.1 - Avaliação da pressão arterial sistólica e peso corporal:.....	41
3.1.2 - Avaliação da reatividade vascular: .....	41
3.2 - Parâmetros estruturais .....	42
3.2.1 - Análise morfológica da aorta: .....	42
3.3 - Parâmetros bioquímicos e moleculares.....	43
3.3.1 - Determinação dos níveis de MMP-2 por zimografia em gel: .....	43
3.3.1.A - Dosagem de proteína pelo método de Bradford: .....	44
3.3.1.B - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%:.....	45

3.3.2 - Determinação da atividade gelatinolítica por zimografia <i>In situ</i> :.....	45
3.3.2.A - Imunofluorescência para MMP-2: .....	46
3.3.3 - Determinação da atividade da doxiciclina <i>in vitro</i> :.....	47
4 - Análise estatística .....	47
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
1 - Efeitos de diferentes doses de doxiciclina sobre a pressão arterial sistólica e o peso corporal nos animais 2R1C: .....	49
2 – Efeitos de diferentes doses de doxiciclina sobre a função vascular nos animais 2R1C:.....	52
3 - Efeitos de diferentes doses de doxiciclina sobre o remodelamento vascular em ratos 2R1C:.....	54
4 - Efeitos de diferentes doses de doxiciclina sobre os níveis e atividade de MMP-2 na aorta dos animais 2R1C: .....	57
5- Efeitos <i>in vitro</i> de diferentes concentrações de doxiciclina sobre a atividade da MMP-2 recombinante:.....	61
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>

# ***INTRODUÇÃO***

## INTRODUÇÃO

### 1 - Alterações fisiopatológicas da hipertensão arterial

A hipertensão é um crescente problema de saúde pública, associado à elevada morbidade e mortalidade entre a população adulta (Sarafidis and Bakris 2008). Estima-se que em 2025, mais de 1,56 bilhões de indivíduos serão acometidos por esta doença em todo o mundo (Chobanian, Bakris et al. 2003; Kearney, Whelton et al. 2005).

O diagnóstico da hipertensão é feito pela detecção de níveis elevados e sustentados da pressão arterial. Indivíduos com pressão sistólica menor que 130 mmHg e diastólica menor que 85 mmHg não apresentam hipertensão arterial. Por outro lado, indivíduos com pressão sistólica entre 120 e 139 mmHg ou diastólica entre 80 e 89 mmHg são considerados pré-hipertensos e aqueles com pressão sistólica entre 140 e 159 mmHg e diastólica entre 90 e 99 mmHg são classificados no estágio 1 da hipertensão arterial (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010).

A hipertensão é uma doença multifatorial e está intimamente associada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares, bem como alterações patológicas nos mecanismos vasculares, hormonais, neuronais e renais de controle da pressão arterial (Kannel 1993; Himmelmann, Hedner et al. 1998; Raffetto and Khalil 2008). Durante a hipertensão, ocorrem várias alterações vasculares e funcionais, dentre elas está o aumento do estresse oxidativo, evidenciado em pacientes com hipertensão essencial e em modelos experimentais de hipertensão (Griendling and FitzGerald 2003; Zhang, Griendling et al. 2005). Além disso, ocorre um remodelamento vascular, o qual envolve a ativação de vias proteolíticas que

contribuem para a mudança estrutural que ocorre na matriz extracelular (Ruddy, Jones et al. 2009).

### **1.1 - Remodelamento vascular**

A parede do vaso é composta de células endoteliais, células do músculo liso vascular e fibroblastos, os quais são organizados em camadas distintas (Wagenseil and Mecham 2009). As células vasculares respondem fisiologicamente a diversos estímulos. Entretanto, as artérias de condutância, especialmente a aorta, são particularmente bem adaptadas a mudanças cíclicas na pressão sanguínea, que as forçam a expandir-se na sístole e estreitar-se na diástole (Lemarie, Tharaux et al.).

Em condições fisiológicas, a elasticidade intrínseca dos grandes vasos atenua as variações periódicas de pressão (Arribas, Hinek et al. 2006). No entanto, em condições de elevada pressão arterial, como na hipertensão arterial ocorrem mudanças geométricas, estruturais, morfológicas e funcionais na parede da artéria conhecidas por remodelamento vascular (Fridez, Zulliger et al. 2003), que é considerado uma resposta adaptativa para normalizar a tensão na parede do vaso (Safar, London et al. 1998). Algumas modificações específicas que ocorrem no vaso são: disfunção endotelial, espessamento da parede, hipertrofia e hiperplasia das células do músculo liso vascular, migração, proliferação e apoptose celular, além de deposição de componentes da matriz extracelular (Intengan and Schiffrin 2001; Fridez, Zulliger et al. 2003; Newby 2006; Castro, Rizzi et al. 2008).

Existem dois tipos de remodelamento, o hipertrófico e o eutrófico, que ocorrem nas artérias de condutância e nas artérias de resistência (diâmetro menor que 300  $\mu\text{m}$ ), respectivamente (Mulvany 2002). No remodelamento eutrófico, acontece diminuição do diâmetro do lúmen do vaso e aumento na razão da

espessura da média pelo diâmetro do lúmen do vaso (média/lúmen), sem alterar a área de secção transversal (AST). Já o remodelamento hipertrófico envolve tanto o aumento na média/lúmen quanto na AST, enquanto o lúmen do vaso é inalterado (Intengan and Schiffrin 2001; Arribas, Hinek et al. 2006; Duprez 2006).

Um mecanismo pelo qual o remodelamento vascular ocorre é através da degradação e reorganização da matriz na parede do vaso (Raffetto and Khalil 2008), devido à ativação das metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) (Ruddy, Jones et al. 2009). Além disso, a ativação do sistema renina-angiotensina induz efeitos na estrutura vascular, como crescimento e fibrose, sendo um importante regulador do remodelamento e inflamação vascular (Duprez 2006).

## **1.2 - O modelo de hipertensão 2R1C**

A fisiopatologia da hipertensão é bastante heterogênea e vários modelos animais têm sido propostos com o intuito de explicar os fenômenos ocorridos na hipertensão essencial (Levy, Chung et al. 2009). O modelo experimental de hipertensão 2 rins-1 clipe (2R1C), desenvolvido por Goldblatt (1939), é relacionado à significativa ativação do sistema renina-angiotensina, sendo muito semelhante ao quadro de hipertensão renovascular em humanos (Martinez-Maldonado 1991).

Neste modelo, inicialmente é colocado um clipe em uma das artérias renais, e mantém-se o rim contralateral intacto. Ocorre inicialmente uma diminuição na perfusão renal para o rim clampeado que leva à liberação de renina e, subsequente produção de angiotensina II circulante (Ang II), o que resulta em vasoconstrição acentuada, retenção de sódio e água (mediados pela aldosterona), dentre outros fatores, com conseqüente aumento da pressão arterial (PA) (Lerman and Chade 2006; Textor 2006). Inicialmente, existem concentrações elevadas de Ang II e

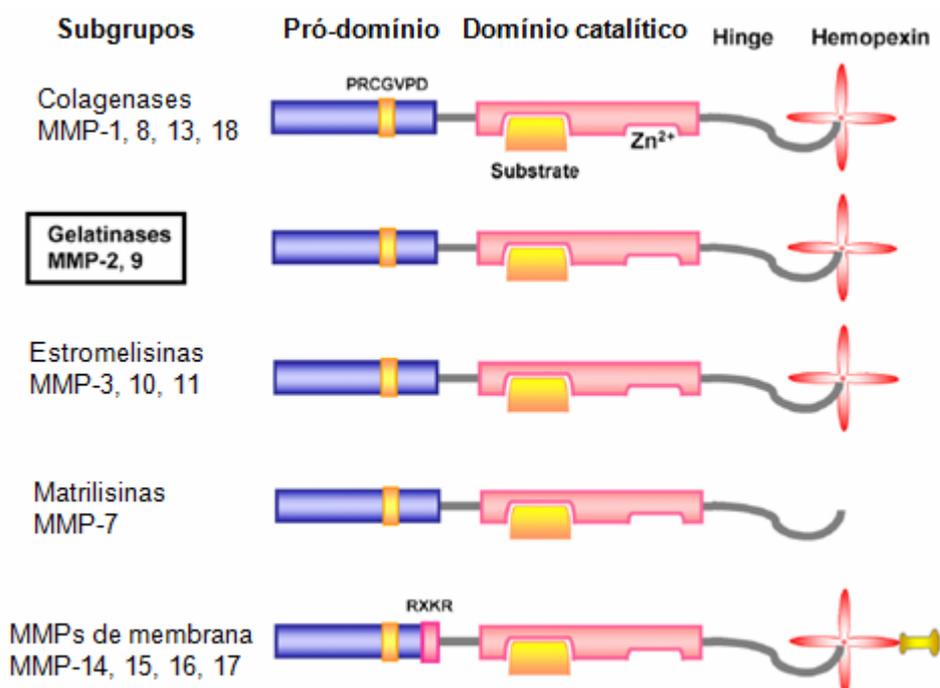
diminuição progressiva de renina plasmática, mantendo ainda a PA elevada. Já na fase considerada crônica da hipertensão, os animais apresentam redução tanto das concentrações de renina como também da Ang II circulante, embora a pressão continue elevada. Deste modo, desencadeia-se um progressivo dano cardiovascular e renal resultando em acentuadas alterações vasculares associadas a um significativo aumento da atividade das MMPs (Martinez-Maldonado 1991; Lerman, Chade et al. 2005; Lerman and Chade 2006).

## **2 - As metaloproteinases da matriz extracelular**

Recentes estudos indicam que um grupo de endopeptidases cálcio-dependentes, contendo zinco, conhecidas por metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) desempenham importante papel no remodelamento vascular presente em muitas doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão (Castro, Rizzi et al.; Ceron, Castro et al.; Galis and Khatri 2002; Chow, Cena et al. 2007; Castro, Rizzi et al. 2008).

As MMPs degradam várias proteínas da matriz extracelular, quebrando-as em suas ligações peptídicas específicas e são expressas em vários tipos celulares e tecidos, incluindo células da musculatura vascular lisa, endotélio, fibroblastos e células inflamatórias. A família das MMPs apresenta mais de 28 espécies, dentre elas estão: colagenases intersticiais (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), gelatinases (MMP-2 ou gelatinase A, e MMP-9 ou gelatinase B), *stromelisin*as (MMP-3 e MMP-10), MMPs de membranas (MT1-MMP a MT6-MMP) e subgrupos heterogêneos (MMP-7, MMP-12, MMP-19 e MMP-20) (Chow, Cena et al. 2007; Schulz 2007; Raffetto and Khalil 2008).

Basicamente, as MMPs são compostas de um sítio catalítico, contendo zinco ( $Zn^{2+}$ ) e cálcio e de um pró-peptídeo ligado a este sítio por uma ligação sulfidrila. Grande parte dessas enzimas possui também uma região conhecida como “*hemopexin-like*”, responsável pelo reconhecimento e adesão aos componentes da matriz extracelular (Figura 1) (Raffetto and Khalil 2008).



**Figura 1-** Representação esquemática da estrutura das MMPs (Raffetto and Khalil 2008).

Como consequência das propriedades potencialmente destrutivas das proteases, todas as MMPs são sintetizadas em uma pró-forma enzimaticamente inativa, denominada de zimogênio (Nagase and Woessner 1999). Assim, a ativação enzimática requer a remoção do domínio pró-peptídeo através da degradação deste por outras proteases, tais como plasmina, ou por MT-MMPs (Murphy and Nagase 2008).

A atividade das MMPs pode ser regulada por vários fatores como, citocinas, hormônios, fatores de crescimento, estresse de cisalhamento e estresse oxidativo (Spinale 2007). Esta regulação pode ser feita em três níveis: indução da transcrição gênica, modificação pós-traducional e interação das MMPs com seus inibidores teciduais específicos (TIMPs) (Nagase and Woessner 1999; Visse and Nagase 2003; Murphy and Nagase 2008).

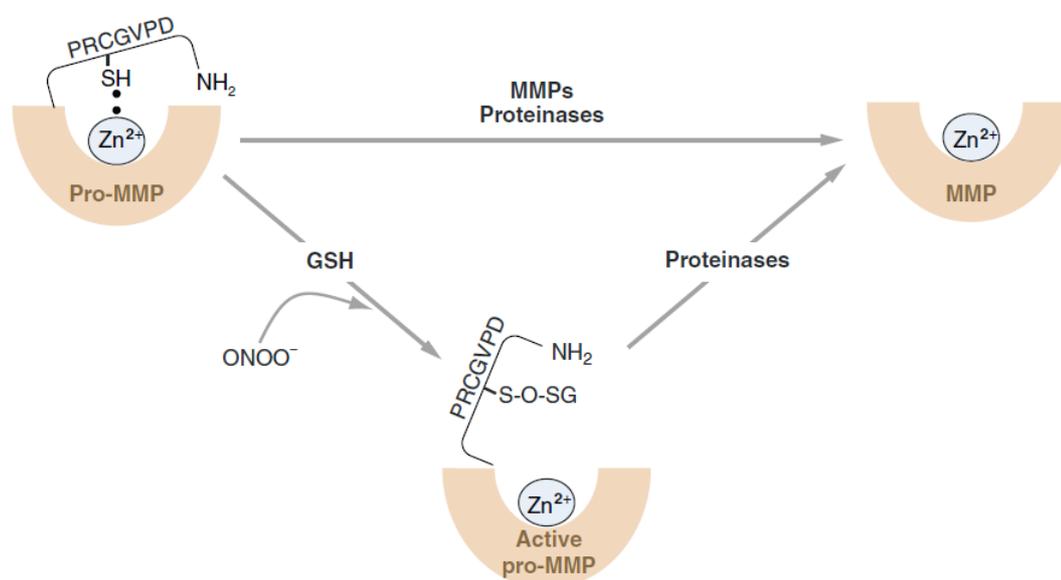
Existem quatro tipos de TIMPs descritos (TIMP-1 a TIMP-4), entretanto apenas o TIMP-1 e o TIMP-2 são mais bem caracterizados em modelos animais de hipertensão. Sob condições fisiológicas, existe um equilíbrio entre a razão de MMPs e TIMPs, entretanto em processos patológicos como na hipertensão arterial, ocorre um desequilíbrio entre esta razão, levando a uma degradação excessiva das proteínas da matriz extracelular (Murphy and Nagase 2008) e consequente remodelamento vascular patológico (Sluijter, de Kleijn et al. 2006).

## **2.1 - Importância da MMP-2 na hipertensão arterial**

A atividade aumentada das MMPs induz a vários processos patológicos como invasão de células tumorais e metástase (Deryugina and Quigley 2006), doença fibrótica e artrite reumatóide (Mohammed, Smookler et al. 2003). Dentre estas enzimas proteolíticas, MMP-2 e MMP-9, têm apresentado um importante papel nas doenças cardiovasculares como aterosclerose, infarto, doença cardíaca isquêmica, aneurisma e hipertensão (Dollery, McEwan et al. 1995; Spinale, Coker et al. 2000; Creemers, Cleutjens et al. 2001; Wilson and Spinale 2001; Castro, Rizzi et al. 2008).

A MMP-2 é uma gelatinase, que existe de forma constitutiva, e possui um domínio chamado "*fibronectin like*" responsável pelo reconhecimento ao colágeno tipo I, IV, V, VII e X, gelatina (colágeno desnaturado), laminina e elastina (Galis and

Khatri 2002). A ativação das MMPs requer a dissociação da ligação entre o resíduo de cisteína do domínio pró-peptídeo e o íon zinco do domínio catalítico. A pró-MMP-2 (72 KDa) é processada por ação combinada da MMP-14 e do TIMP-2 a uma forma enzimaticamente ativa (64 KDa). Entretanto, o estresse oxidativo por ação do peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) pode ativar a pró-MMP-2 sem remover o pró-peptídeo autoinibitório, mantendo o mesmo peso molecular da forma inativa (72 KDa) (Kandasamy, Chow et al.; Schulz 2007)(Figura 2).

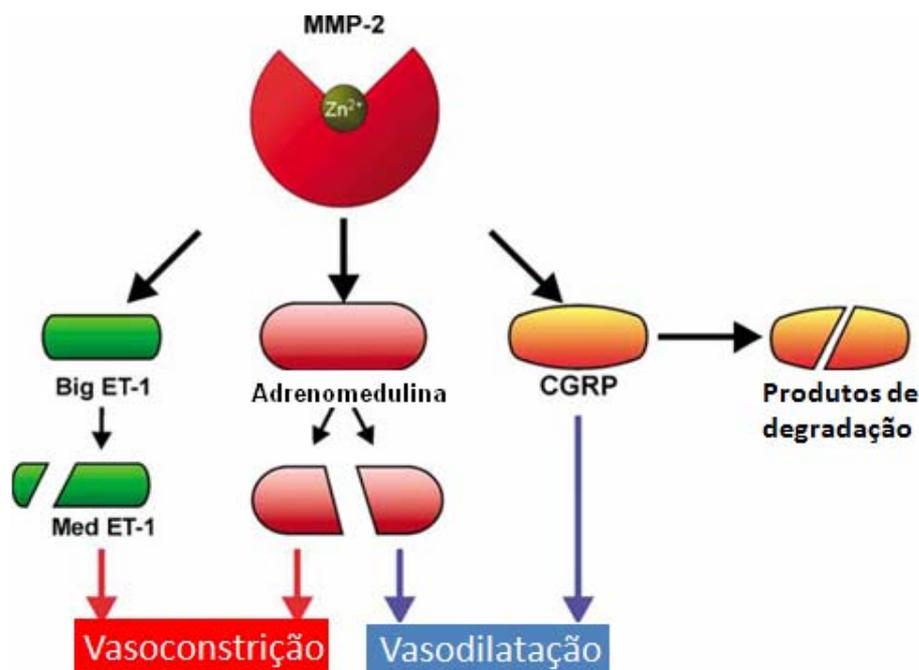


**Figura 2-** Ativação da MMP-2 por remoção proteolítica do domínio pró-peptídeo resultando na forma ativa de 64 KDa e ativação por estresse oxidativo, sem remoção do pró-peptídeo (Schulz 2007).

Recentemente, foi demonstrada elevada expressão e atividade da MMP-2 e da MMP-9 no remodelamento vascular em pacientes hipertensos (Yasmin, McEniery et al. 2005; Ahmed, Clark et al. 2006) e em modelos animais (Castro, Rizzi et al.; Lehoux, Lemarie et al. 2004; Bouvet, Gilbert et al. 2005; Flamant, Placier et al. 2007; Watts, Rondelli et al. 2007; Castro, Rizzi et al. 2008; Martinez, Castro et al. 2008). Outras evidências sugerem que o aumento na atividade e nos níveis de MMP-2

pode prejudicar o vasorelaxamento dependente do endotélio e causar hipertrofia na parede da artéria, deposição excessiva de colágeno e elastina e deste modo contribuir para disfunção e remodelamento vascular hipertensivo (Ceron, Castro et al.; Castro, Rizzi et al. 2008; Martinez, Castro et al. 2008; Castro, Rizzi et al. 2009).

Embora as MMPs sejam conhecidas pelo seu papel no remodelamento da matriz extracelular, recentes evidências têm mostrado que a MMP-2 também desempenha importante papel intracelular, especialmente em resposta ao estresse oxidativo durante a injúria de isquemia/reperfusão cardíaca (Wang, Schulze et al. 2002; Schulz 2007). Além disso, a MMP-2 também pode aumentar a contratilidade vascular, contribuindo para a manutenção da hipertensão arterial. Neste contexto, a MMP-2 cliva a big endotelina-1 (Big-ET-1) a um potente vasoconstritor, a endotelina-1 (ET-1) (Fernandez-Patron, Radomski et al. 1999). Cliva ainda, o peptídeo vasodilatador CGRP (peptídeo relacionado ao gene calcitonina) em produtos de degradação sem ação vasodilatadora (Fernandez-Patron, Stewart et al. 2000), e a adrenomedulina a metabólitos menos vasodilatadores e a metabólitos com ação vasoconstritora (Martinez, Oh et al. 2004), desse modo promovendo a vasoconstrição (Figura 3).



**Figura 3-** Representação esquemática da regulação do tônus vascular pela MMP-2 (Chow, Cena et al. 2007).

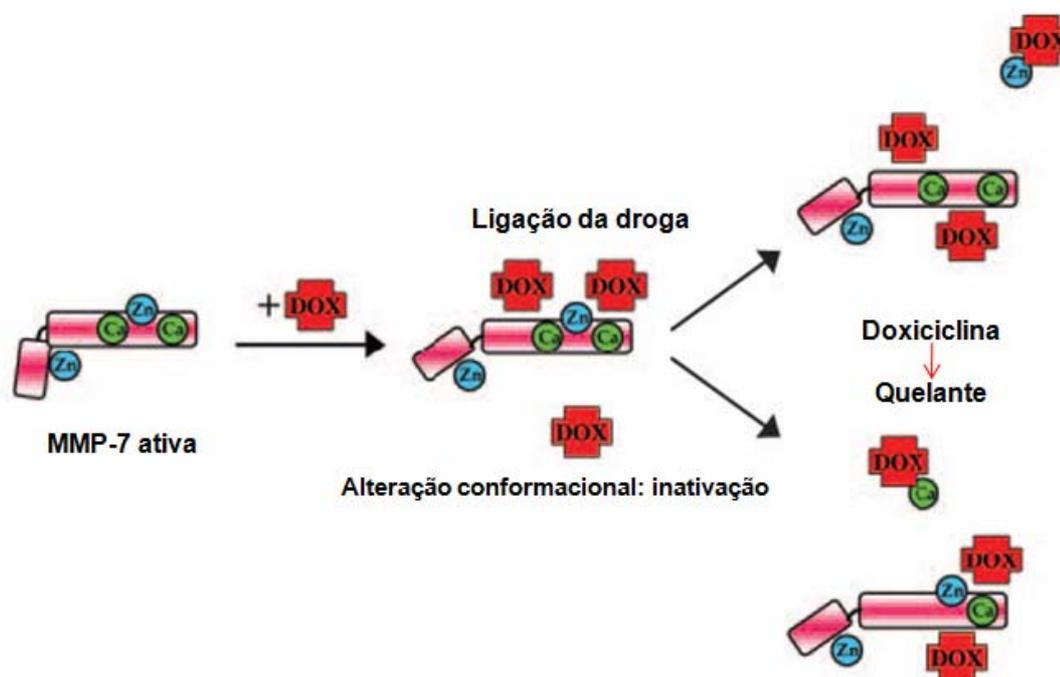
### 3 - Efeitos da doxiciclina sobre as MMPs

Portanto, as MMPs desempenham importante papel no desenvolvimento e progressão de diversas doenças cardiovasculares. Desse modo, inibir estas proteases torna-se uma importante estratégia terapêutica para o tratamento, por exemplo, da hipertensão arterial.

A doxiciclina é uma tetraciclina capaz de inibir a atividade das MMPs independentemente de sua ação antimicrobiana (Golub, Lee et al. 1998). É considerada o inibidor mais potente e não seletivo de MMPs (Golub, Ramamurthy et al. 1991), capaz de inibir a atividade destas enzimas em concentrações plasmáticas menores do que a requerida para sua ação antimicrobiana (Lee, Ciancio et al. 2004). Embora as tetraciclina sejam quelantes de  $Zn^{2+}$  (Peterson 2004), o mecanismo primário de inibição das MMPs pela doxiciclina não está esclarecido. Entretanto, foi proposto que a doxiciclina pode se ligar próximo ao  $Zn^{2+}$  no sítio catalítico e romper

a ligação entre este íon e o cálcio e assim bloquear o sítio ativo e inibir a atividade da MMP-7 (ou matrilisina) (Figura 4) (Garcia, Pantazatos et al. 2005).

O derivado da doxiciclina (Periostat) é o único inibidor de MMPs aprovado para uso clínico pelo FDA (US Food and Drug Administration), em dose subantimicrobiana para o tratamento de doenças periodontais (Novak, Johns et al. 2002). Além disso, o uso da doxiciclina tem demonstrado efeitos benéficos, no tratamento de outras doenças em que as MMPs desempenham papéis patológicos, tais como aneurisma aórtico abdominal (Thompson and Baxter 1999), hipertensão arterial (Castro, Rizzi et al. 2008), infarto do miocárdio (Villarreal, Griffin et al. 2003) e câncer de colo retal (Onoda, Ono et al. 2004),.



**Figura 4-** Mecanismo de inibição da MMP-7 pela doxiciclina (Garcia, Pantazatos et al. 2005).

Estudos sugerem que a doxiciclina reduz significativamente o aumento da atividade da MMP-2 em artérias de resistência e de condutância (Bouvet, Gilbert et

al. 2005; Castro, Rizzi et al. 2008) e atenua o remodelamento ventricular após infarto do miocárdio (Villarreal, Griffin et al. 2003) por diminuir a atividade da MMP-2 e MMP-9 (Tessone, Feinberg et al. 2005). Além disso, estabiliza placas ateroscleróticas por inibir MMPs em carótidas (Axisa, Loftus et al. 2002), reduz a produção de MMP-2 por células do músculo liso vascular, por diminuir a estabilidade do RNAm (Liu, Xiong et al. 2003), bem como diminui a degradação da matriz extracelular em aneurisma aórtico abdominal (Thompson and Baxter 1999; Prall, Longo et al. 2002). Estes efeitos benéficos foram produzidos por diferentes doses de doxiciclina, contudo nenhum estudo anterior avaliou comparativamente os efeitos de diferentes doses de doxiciclina sobre as alterações vasculares induzidas pelo modelo experimental de hipertensão 2R1C.

Castro et al (Castro, Rizzi et al. 2008), mostrou que a doxiciclina pode inibir o remodelamento vascular induzido pela hipertensão arterial experimental 2R1C, em uma dose muito maior, com base no peso (30 mg/kg/dia) em comparação com o padrão da dose antimicrobiana de doxiciclina usada em humanos (1 a 1,5 mg/kg) (Prall, Longo et al. 2002). Dessa maneira, doses elevadas de doxiciclina administradas em humanos para inibir MMPs, poderiam causar resistência em algumas espécies de bactérias à doxiciclina, podendo dificultar o tratamento de determinadas infecções bacterianas, além de causar outros tipos de efeitos adversos. Assim, torna-se importante saber se doses inferiores a 30 mg/kg/dia são eficazes em reduzir o remodelamento vascular em ratos hipertensos 2R1C.

***HIPÓTESE***

## HIPÓTESE

Levando-se em consideração que:

1. No modelo 2R1C de hipertensão há um aumento nos níveis de MMP-2, que participam do desenvolvimento das alterações vasculares estruturais e funcionais, bem como do remodelamento vascular;
2. A doxiciclina é capaz de reduzir os níveis de MMP-2 e, dessa forma atenua as alterações vasculares citadas anteriormente;
3. Existem resultados conflitantes em relação à melhor dose de doxiciclina para o tratamento de disfunções vasculares;
4. Doses menores que 30 mg/kg/dia de doxiciclina podem produzir efeitos semelhantes aos produzidos pela dose de 30 mg/kg/dia e que doses maiores podem produzir efeitos adversos;

***Formulamos a hipótese de que é possível que a doxiciclina em doses inferiores a 30 mg/kg/dia possa impedir o aumento dos níveis de MMP-2, a disfunção e o remodelamento vascular associado à hipertensão 2R1C.***

## ***OBJETIVOS***

## **OBJETIVOS**

**1-** Verificar os efeitos da inibição das MMPs, com diferentes doses de doxiciclina (3, 10 e 30 mg/kg/dia), sobre as alterações funcionais e estruturais presentes nos vasos de ratos com hipertensão renovascular (2R1C).

**2-** Avaliar se a doxiciclina provoca inibição de forma dose dependente das MMPs e, determinar a dose mais favorável para o tratamento de disfunções vasculares associadas ao aumento da MMP-2 na hipertensão 2R1C.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

## **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. Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, em salas com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada (22-25 °C) e livre acesso a ração e água. Esse estudo foi previamente aprovado pelo comitê de ética dessa universidade (nº140/2009).

#### **1.1 - Hipertensão arterial induzida pela técnica de Goldblatt**

O modelo de hipertensão renal 2R1C foi proposto para este estudo por apresentar significativas alterações vasculares associadas às MMPs (Martinez-Maldonado 1991). A indução da hipertensão arterial foi realizada através da introdução de um clipe de prata com abertura de 0,2 milímetros na artéria renal, causando estenose da artéria. Esse procedimento leva a ativação do sistema renina-angiotensina, resultando em aumento da pressão arterial (Goldblatt 1958). Os animais controle foram submetidos a laparotomia, sem introdução do clipe na artéria renal. Como anestésicos foram utilizados ketamina (100mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), via intra-peritoneal (i.p.).

## 1.2 - Grupos experimentais

**Sham:** animais controle, submetidos apenas à laparotomia e que receberam água;

**Sham+doxi 3:** animais controle, submetidos apenas à laparotomia e que receberam a dose de 3 mg/kg/dia de doxiciclina;

**Sham+doxi 10:** animais controle, submetidos apenas à laparotomia e que receberam a dose de 10 mg/kg/dia de doxiciclina;

**Sham+doxi 30:** animais controle, submetidos apenas à laparotomia e que receberam a dose de 30 mg/kg/dia de doxiciclina;

**2R1C:** animais submetidos à estenose da artéria renal e que receberam água;

**2R1C+doxi 3:** animais submetidos à estenose da artéria renal e que receberam a dose de 3 mg/kg/dia de doxiciclina;

**2R1C+doxi 10:** animais submetidos à estenose da artéria renal e que receberam a dose de 10 mg/kg/dia de doxiciclina;

**2R1C+doxi 30:** animais submetidos à estenose da artéria renal e que receberam a dose de 30 mg/kg/dia de doxiciclina.

A escolha das diferentes doses de doxiciclina foi baseada em estudos prévios descritos na literatura, em diferentes modelos de hipertensão (Griffin, Jinno et al. 2005; Tessone, Feinberg et al. 2005; Garcia, Go et al. 2007; Castro, Rizzi et al. 2008). Inicialmente, utilizamos a dose de doxiciclina de 100 mg/kg/dia com o objetivo de verificar o efeito de uma dose maior que 30 mg/kg/dia sobre as alterações bioquímicas, estruturais e funcionais estudadas. Entretanto, os animais apresentavam um comportamento anormal após a gavagem, desse modo o tratamento com esta dose foi abolido, pois poderia interferir nos resultados finais, além de poder ser possivelmente tóxico aos ratos.

Somente os animais 2R1C, após as duas semanas de hipertensão, que apresentaram um aumento mínimo na pressão arterial sistólica de 30 mmHg foram utilizados para o estudo.

Iniciamos os tratamentos após duas semanas da indução da hipertensão arterial renovascular, e os animais que ficaram hipertensos foram distribuídos aleatoriamente em cada um dos grupos experimentais de animais hipertensos citados acima. Os tratamentos foram realizados por gavagem, por um período de quatro semanas totalizando seis semanas de hipertensão após a cirurgia. A seguir os animais foram sacrificados para a coleta de tecidos para análises estruturais bioquímicas e moleculares.

## **2 - Materiais**

### **2.1 - Soluções utilizadas nos experimentos:**

- Acetilcolina ( $10^{-10}$  mol/L a  $10^{-5}$  mol/L);
- Albumina sérica bovina (BSA), 8 mg/mL;
- Anticorpos monoclonais: anti-MMP-2 (MAB 3308); diluição 1:1000 em PBS, a partir da solução inicial de 1 mg/mL (Chemicon, Temecula, CA, USA);
- Anticorpo secundário rodamina (AP 160P), diluição 1:200 em PBS, a partir da solução inicial de 1 mg/mL (Chemicon, Temecula, CA, USA);
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) 12%, co-polimerizado com gelatina (1 mg/mL);
- Fenilefrina ( $10^{-4}$  mol/L);
- Hematoxilina e Eosina (H&E);
- Kit de atividade gelatinolítica (E12055, Molecular Probes, Oregon, EUA);
- MMP-2 recombinante humana (R&D Systems Inc., Minneapolis, EUA);
- Paraformaldeído (PFA) 4% v/v tamponado;

- PBS (tampão salina fosfato);
- Persulfato de Amônio (APS) 10%;
- Reagente de Bradford;
- 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);
- Solução de Triton X-100 a 2%;
- Solução de Agarose 3%;
- 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. 2 U/mL (Molecular Probes, Oregon, USA);
- Solução de Krebs-HEPES, pH 7,2;
- Tampão de extração de proteínas: 20mmol/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>;
- Tampão utilizado no gel de separação: Tris-HCl/SDS, pH 8,8;
- Tampão utilizado no gel de largada: Tris-HCl/SDS, 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.

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

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

- Doxiciclina 3, 10 ou 30 mg/kg/dia em suspensão aquosa com agitação prévia para diluição da droga, administrada por via oral;
- Ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), via intra peritoneal.

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

- Balança de precisão (Shimadzu AY220), pHmetro (Incibrás) e centrífuga refrigerada (CELM – 3 plus);
- Espectrofluorímetro (Gemini EM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA);
- Espectrofotômetro;
- Fonte de eletroforese (Electrophoresis Power Supply – EPS 301);
- Micrótopo (Leica RM2025) e criostato (CM 1900; Leica, Alemanha);
- Microscópio de luz branca e fluorescência (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplada à câmera fotográfica;
- Sistema de documentação de eletroforese Kodak (Kodak, Rochester, NY);
- Transdutor de pressão acoplado a um manguito (MTL125R pulse transducer/pressure cuff; Castle Hill, Austrália);
- Transdutor de tensão isométrica (Letica Scientific Instruments; Barcelona, Espanha).

## **2.4 - Programas de aquisição de dados:**

- Analysis System (EDAS) 290 (Kodak, Rochester, NY);
- Chart V4.04, PowerLab ADInstruments (2000);
- ImageJ Program (NIH – National Institutes of Health);

- KCJunior e SoftMax Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA);
- PowerLab 4/S analog-to-digital converter (AD Instruments Ltd., Gosport Hill, Australia);
- SigmaStat for Windows (Jandel Scientific, USA).

### **3 - Métodos**

#### **3.1 - Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos**

##### **3.1.1 - Avaliação da pressão arterial sistólica e peso corporal:**

A pressão arterial sistólica foi verificada pelo método de pletismografia de cauda. Para isso, um manguito acoplado a um transdutor de pressão foi colocado em torno da cauda dos animais acordados, previamente aquecidos (em cabines 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., Gosport Hill, Australia) e os resultados representados por uma média de três medidas consecutivas para cada animal. A pressão arterial e o peso corporal foram avaliados semanalmente, durante as 6 semanas do estudo (2 semanas de indução de hipertensão arterial renal + 4 semanas de tratamento com doxiciclina).

##### **3.1.2 - Avaliação da reatividade vascular:**

Ao final da sexta semana de tratamento, os animais foram anestesiados, decapitados e suas aortas foram retiradas delicadamente e lavadas em solução de Krebs. Essas aortas foram cortadas em anéis de quatro milímetros de comprimento e colocadas em um sistema de cuba para órgãos isolados contendo 5 mL de

solução modificada de Krebs a 37 °C, pH 7,4 e aeração constante com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>). Esse sistema foi previamente conectado a um transdutor de tensão isométrica (Letica Scientific Instruments; Barcelona, Espanha) (Rizzi, Castro et al. 2009) e os registros de tensão, em gramas, foram adquiridos utilizando o programa de aquisição de dados: Chart V4.04, PowerLab ADInstruments (2000). Após 60 minutos de estabilização sob tensão basal de 1,5 g, os anéis foram contraídos com fenilefrina (10<sup>-7</sup> mol/L). Sobre a contração mantida com fenilefrina, testamos a integridade do endotélio com a adição de 10<sup>-6</sup> mol/L de acetilcolina. Somente os anéis que produziram relaxamento igual ou superior a 80% da contração original foram considerados com endotélio funcional preservado. O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina. Para avaliar o relaxamento vascular dependente do endotélio foram utilizadas concentrações crescentes e cumulativas de acetilcolina (10<sup>-10</sup> mol/L a 10<sup>-5</sup> mol/L).

## **3.2 - Parâmetros estruturais**

### **3.2.1 - Análise morfológica da aorta:**

Ao final da sexta semana do estudo, os animais foram anestesiados, decapitados e suas aortas foram retiradas delicadamente, lavadas em solução de Krebs, dissecadas do tecido conjuntivo e gordura e fixadas imediatamente em solução tamponada de paraformaldeído (PFA) a 4%, por 24 horas. Após a fixação, as aortas foram desidratadas em diferentes concentrações de álcool, inseridas em parafina e cortadas transversalmente (4 µm) em micrótomo (Leica RM2025). Esses cortes foram feitos em lâmina de vidro e colocados sobre uma chapa de aquecimento a 37-39 °C, para promover aderência e abertura dos cortes de

parafina. Para cada animal, foram feitas duas lâminas com três cortes cada, em seqüência.

As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para determinação dos parâmetros estruturais da aorta: área de secção transversal do corte (AST), espessura da camada média (média) e razão média por lúmen (M/L). O número de células musculares lisas foi determinado pela contagem de núcleos.

As imagens dos cortes foram obtidas utilizando microscópio de luz branca (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado a uma câmera fotográfica. Essas imagens foram captadas pelo programa Leica IM50, com aumento de 50 e 400x e posteriormente analisadas com o programa ImageJ. A partir da análise da área interna ( $A_i$ ) e externa ( $A_e$ ) dos cortes, conseguimos determinar a AST ( $A_e - A_i$ ), o diâmetro interno (raiz quadrada de  $4A_i/\pi$ ), o diâmetro externo (raiz quadrada de  $4A_e/\pi$ ), a média ( $(DE-DI)/2$ ) e a razão M/L ( $2x \text{ Média}/DI$ ). A contagem do número de células da musculatura lisa vascular também foi realizada com o programa ImageJ, em aumento de 400x. 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. Os cálculos e a quantificação das células musculares lisas foram realizados com base no método descrito por Dao e colaboradores (Dao, Lemay et al. 2001).

### **3.3 - Parâmetros bioquímicos e moleculares**

#### **3.3.1 - Determinação dos níveis de MMP-2 por zimografia em gel:**

Para determinação dos níveis de MMPs no plasma e amostras de tecidos biológicos utilizamos o método desenvolvido em nosso laboratório (Gerlach, Uzuelli et al. 2005; Souza-Tarla, Uzuelli et al. 2005; Gerlach, Demacq et al. 2007). No caso

da zimografia de tecidos, é preciso determinar a concentração de proteínas presente em cada amostra, para aplicar no gel a mesma quantidade de proteína por amostra, pois variações protéicas entre as amostras poderiam interferir nos resultados finais.

### **3.3.1.A - Dosagem de proteína pelo método de Bradford:**

Para a quantificação de proteínas foi utilizado o método de Bradford, que consiste em um ensaio colorimétrico quantitativo em que ao se ligar às proteínas do tecido, o reagente adquire uma coloração azul. As amostras de aorta foram trituradas e homogeneizadas em tampão de extração de proteínas ( $\text{CaCl}_2$  10 mM, Tris 20 mM pH 7,4, fenantrolina 1 mM, PMSF 1 mM, NEM 1 mM) e incubadas por 16 horas em geladeira. Para cada 0,08 g de tecido foram acrescentados 300  $\mu\text{L}$  do tampão. Após 16 h, as amostras foram centrifugadas por 15 min e os sobrenadantes removidos para determinação protéica. A curva padrão foi realizada com albumina do soro bovino (BSA) diluída em água destilada nas seguintes concentrações em mg/mL: 0,085; 0,0175; 0,035; 0,7; e 1,4.

O reagente de Bradford foi utilizado para determinar as concentrações de proteína em cada amostra analisada. A coloração azul desenvolvida no contato com as proteínas pode ser quantificada em espectrofotômetro de luz visível (595 nm). A intensidade de cor varia de acordo com a quantidade de proteína presente na amostra. Para cada 5  $\mu\text{L}$  de amostra adicionamos 250  $\mu\text{L}$  de reagente de Bradford. Pelos valores obtidos após a leitura, em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , foi possível aplicar 30  $\mu\text{g}$  de proteína por “lane” do gel.

### 3.3.1.B - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%:

As amostras foram previamente preparadas (SDS 2%, Tris-HCl 125 mM, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,001%) e aplicadas em géis de poliacrilamida a 12% e separadas por eletroforese, conforme a técnica SDS-PAGE. Após o tempo de corrida da eletroforese, os géis foram submetidos a dois banhos de Triton X-100 a 2%, para remover o SDS e colocados em solução de Tris CaCl<sub>2</sub> 50 mM, por 18 h, a 37 °C. Posteriormente, foram fixados e corados por 4h em solução Coomassie Blue 0,05%. Para visualização das bandas referentes às MMPs, os géis foram descorados com metanol a 30% e ácido acético a 10%. Observa-se a formação de bandas claras contra o fundo azul do Coomassie devido à degradação da gelatina incorporada ao gel pelas MMPs.

Para cada gel foi utilizado um padrão interno (soro fetal bovino a 2%), representado nas figuras como PAD. Por ele, foi possível normalizar as quantidades de proteínas obtidas entre os géis, sendo possível compará-los entre si. A quantificação das bandas da MMP-2 foi feita utilizando o sistema Kodak “Electrophoresis Documentation and Analysis System – EDAS 290” (Kodak, Rochester, NY). As formas da MMP-2 foram identificadas pelos seus pesos moleculares: 75, 72 e 64 KDa, e foram inibidas por fenantrolina, mas não por outros inibidores de proteases.

### 3.3.2 - Determinação da atividade gelatinolítica por zimografia *In situ*:

Esse método reflete a atividade *in situ* das MMPs e não seus níveis, como a zimografia convencional. Esse método permite a quantificação dessa atividade diretamente no tecido (Galis, Sukhova et al. 1995). Para essa análise, utilizamos DQ gelatin (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA) na concentração de 1,0 µg/mL em tampão Tris-CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Os tecidos foram congelados em OCT (Sakura Finetek,

Torrance, CA, USA), utilizando acetona e gelo seco. Eles foram cortados em criostato em 4 µm de espessura e incubados com o substrato DQ gelatin por 60 minutos em câmara úmida e escura. Após a incubação, os cortes foram lavados com PBS e fixados em PFA 4% v/v por 10 minutos. Com o auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado à câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram fotografadas em um aumento de 400x. A quantificação da atividade gelatinolítica *in situ* observada como intensidade de fluorescência verde emitida, foi realizada utilizando o programa ImageJ. Fenantrolina e PMSF foram utilizados para confirmar a atividade das MMPs nos tecidos, que foi significativamente reduzida apenas pela fenantrolina.

### **3.3.2.A - Imunofluorescência para MMP-2:**

Método utilizado para determinar os níveis de MMP-2 e co-localizar a atividade gelatinolítica *in situ* com a expressão dessa enzima, uma vez que outras MMPs também possuem a capacidade de degradar a gelatina. Após a incubação com DQ gelatin e PFA 4%, os cortes de aorta foram incubados com anticorpo primário anti-MMP-2 (MAB 3308, Chemicon, USA), na concentração de 0,1 µg/mL por 1h, em câmara úmida e escura e em seguida os cortes foram lavados com PBS. Após esse período, os cortes foram incubados com anticorpo secundário rodamina (AP160P, Chemicon, USA) PA 5,0 µg/mL por 1h nas mesmas condições citadas. Esse anticorpo emite fluorescência vermelha quando ligado ao anticorpo primário. Com auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado à câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram fotografadas num aumento de 400x. Os níveis de MMP-2 foram observados como intensidade de fluorescência vermelha emitida e a quantificação foi realizada

utilizando o programa ImageJ. Para sobreposição da atividade gelatinolítica com a expressão da MMP-2 foi utilizado o programa Adobe Photoshop. As imagens sobrepostas apresentaram coloração amarela.

### **3.3.3 - Determinação da atividade da doxiciclina *in vitro*:**

Para examinar se a doxiciclina inibe diretamente a atividade da MMP-2 *in vitro* foram utilizadas nove concentrações entre 0,8 e 200  $\mu\text{M}$  desta droga. Para este experimento, utilizou-se uma MMP-2 recombinante humana (R&D Systems Inc., Minneapolis, EUA) na ausência ou na presença da doxiciclina usando o kit de atividade gelatinolítica (E12055, Molecular Probes, Oregon, EUA). Esta atividade foi avaliada em microplaca em espectrofluorímetro (excitação 495nm, emissão 515 nm; Gemini EM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) após 30 min de incubação a 37<sup>0</sup>C, como descrito previamente (Castro, Rizzi et al. 2009). Fenantrolina (0,1 mM) foi usada como controle positivo de inibição da atividade da MMP-2.

## **4 - Análise estatística**

Os resultados obtidos nesse estudo foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias (análise de variância) ou ANOVA de uma via, seguido de teste Tukey (SigmaStat for Windows, Jadel Scientific, USA). Foram considerados estatisticamente diferentes valores com  $P < 0,05$ . Os gráficos foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

## ***RESULTADOS***

## RESULTADOS

### 1 - Efeitos de diferentes doses de doxiciclina sobre a pressão arterial sistólica e o peso corporal nos animais 2R1C:

Os valores basais de pressão arterial sistólica foram similares nos oito grupos experimentais (Tabela 1 e Figura 5A). Entretanto, após a primeira semana de cirurgia para implantação do clipe na artéria renal, a pressão sistólica aumentou progressivamente até a sexta semana do estudo nos ratos do grupo 2R1C quando comparados aos controles (Sham e Sham+doxiciclina) (Figura 5A). Todas as doses de doxiciclina administradas atenuaram os aumentos na pressão sistólica nos ratos hipertensos após a quinta semana do procedimento cirúrgico ( $195,4 \pm 3,9$  mmHg versus  $177,2 \pm 6,2$  mmHg,  $176,3 \pm 4,5$  mmHg e  $173 \pm 5,1$  mmHg nos grupos 2R1C e 2R1C+doxi 3, 2R1C+doxi 10 e 2R1C+doxi 30, respectivamente, na sexta semana;  $P < 0,01$ ; Tabela 1 e Figura 5A). Não foram observadas mudanças significativas sobre a pressão sistólica nos grupos controle Sham e Sham+doxiciclina durante as seis semanas de hipertensão. Também não foram observadas diferenças significativas no peso corporal entre os oito grupos experimentais (Tabela 2 e Figura 5B).

**Tabela 1** - Valores da pressão arterial sistólica (mmHg) dos animais durante as seis semanas de experimento nos oito grupos experimentais (n=20).

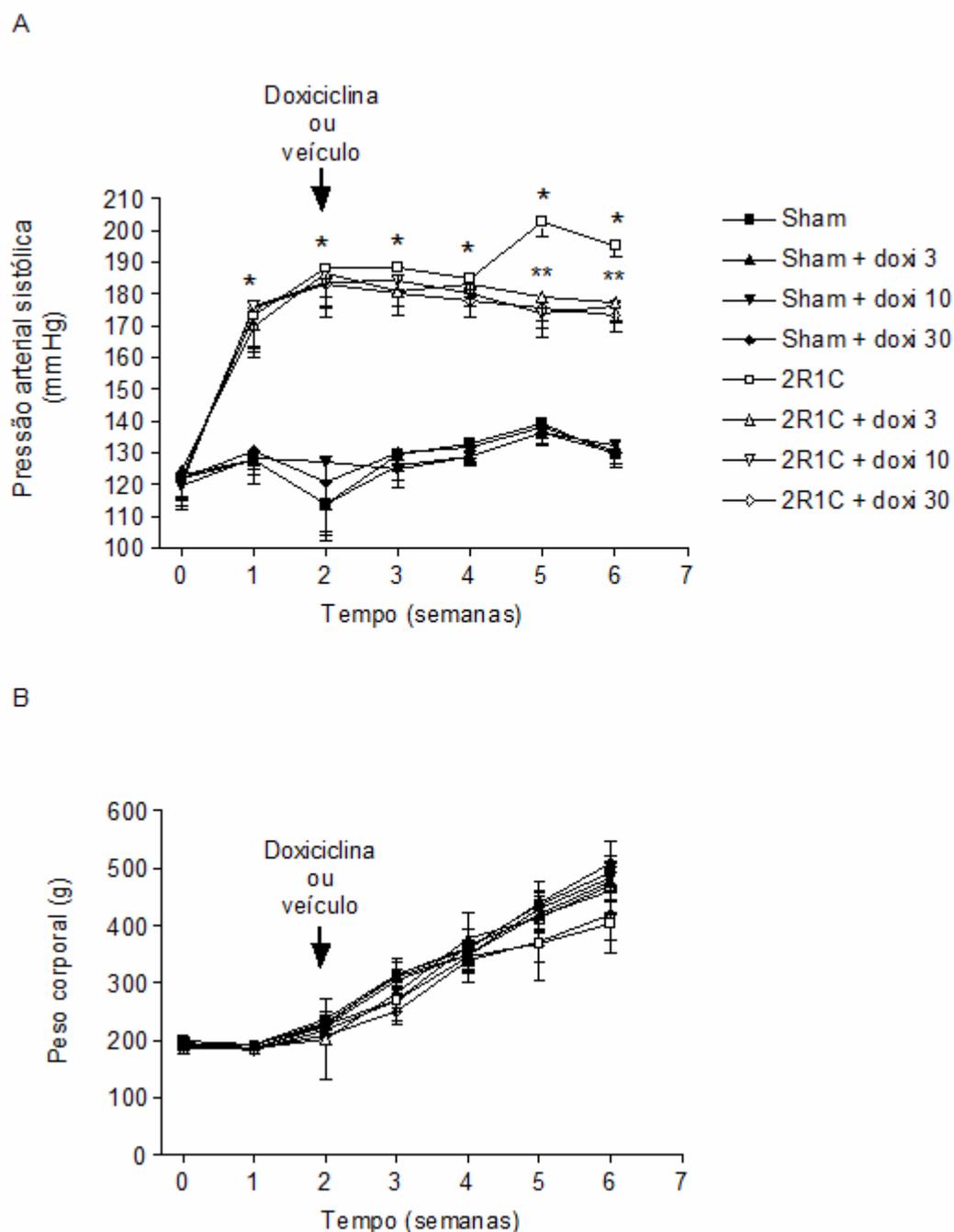
	Valores basais	1 <sup>a</sup> semana	2 <sup>a</sup> semana	3 <sup>a</sup> semana	4 <sup>a</sup> semana	5 <sup>a</sup> semana	6 <sup>a</sup> semana
<b>Sham</b>	122,1±6,2	127,7±7,5	113,8±11,6	129,4±3,0	132,7±6,18	139,4±3,0	129,4±3,9
<b>Sham+doxi3</b>	122,9±9,4	127,5±7,1	114,0±9,1	126,0±6,9	129,0±3,1	136,5±4,1	130,0±4,7
<b>Sham+doxi10</b>	119,6±7,5	128,5±5,5	127,0±12,5	125,0±3,8	129,0±3,0	136,5±4,5	132,5±2,6
<b>Sham+doxi30</b>	122,1±6,2	130,5±5,8	120,5±16,6	130,0±2,5	131,6±3,5	137,7±5,1	130,5±3,9
<b>2R1C</b>	122,1±6,2*	173,0±10,3*	187,9±8,6*	188,3±6,8*	185,0±4,7*	202,5±4,5*	195,4±3,9*
<b>2R1C+doxi 3</b>	124,4±9,1	170,0±10,0	186,6±10,3	180,5±7,2	182,7±3,6	178,8±7,4**	177,2±6,2**
<b>2R1C+doxi 10</b>	120,0±8,0	175,9±14,1	183,6±10,7	184,1±8,0	180,4±4,1	173,6±7,4**	176,3±4,5**
<b>2R1C+doxi 30</b>	121,8±6,4	175,4±11,9	183,2±7,5	180,0±3,8	177,7±5,1	175,4±6,1**	173,2±5,1**

Os dados estão expressos como média±EPM. \* e \*\*  $P<0,01$  versus Sham e 2R1C, respectivamente

**Tabela 2** - Valores do peso dos animais (g) durante as seis semanas de experimento nos oito grupos experimentais (n=20).

	Valores basais	1 <sup>a</sup> semana	2 <sup>a</sup> semana	3 <sup>a</sup> semana	4 <sup>a</sup> semana	5 <sup>a</sup> semana	6 <sup>a</sup> semana
<b>Sham</b>	189,0	191,1±5,6	236,2±14,9	312,3±3,5	362,6±30,5	434,8±40,9	494,0±5,2
<b>Sham+doxi 3</b>	192,0	191,3±5,3	230,9±17,7	311,4±24,0	348,4±24,0	420,1±30,5	477,0±36,0
<b>Sham+doxi 10</b>	192,0	187,1±7,5	224,0±13,6	304,1±20,2	348,1±25,3	427,3±33	482,4±38,0
<b>Sham+doxi 30</b>	188,0	187,0±5,1	228,4±9,7	315,0±20,0	357,1±36,7	439,3±21,4	508,5±5,0
<b>2R1C</b>	200,0	191,4±7,2	226,6±18,2	269,0±35,9	347,2±47,6	368,7±6,4	404,8±5,3
<b>2R1C+doxi 3</b>	185,0	186,4±5,2	202,8±30,0	283,0±25,8	376,3±41,1	411,4±46,5	470,7±50,9
<b>2R1C+doxi 10</b>	193,0	184,2±3,9	217,4±7,8	269,8±20,5	363,7±28,5	416±28,3	462,0±40,0
<b>2R1C+doxi 30</b>	195,0	186,0±3,8	207,4±7,6	250,2±23,2	339,0±21,9	370,3±35,1	419,3±44,8

Os dados estão expressos como média±EPM.

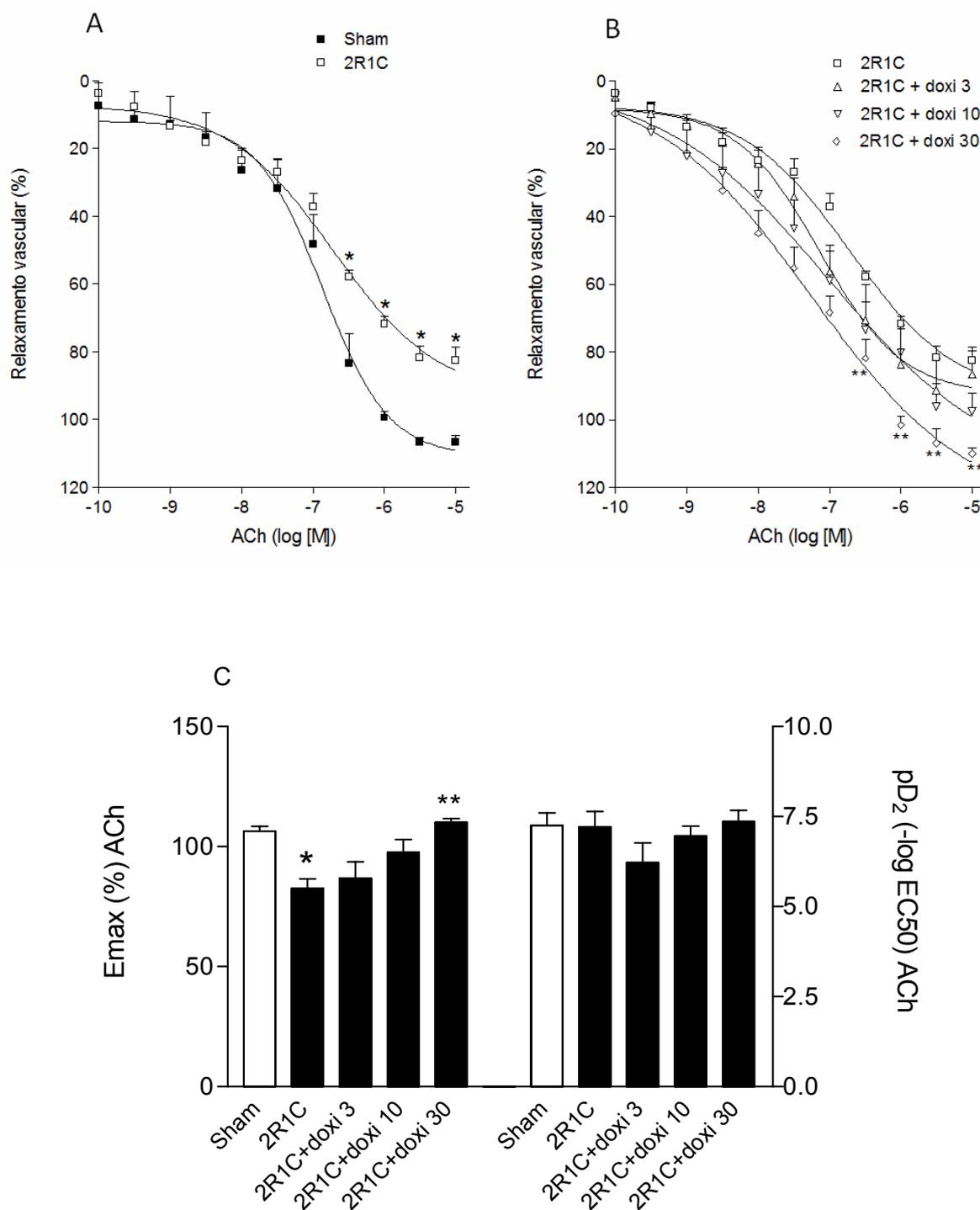


**Figura 5** – Efeito da doxiciclina sobre a pressão arterial sistólica e o peso corporal. Evolução da pressão arterial sistólica em mmHg (A), e do peso corporal em gramas (B) durante as 6 semanas de hipertensão. Valores expressos como média  $\pm$  EPM (n=20/grupo). \* e \*\*  $P < 0,01$  versus Sham e 2R1C, respectivamente.

## 2 – Efeitos de diferentes doses de doxiciclina sobre a função vascular nos animais 2R1C:

Para determinar os efeitos de diferentes doses de doxiciclina sobre a função vascular, os ratos foram sacrificados na sexta semana após a cirurgia e os anéis de aorta (n=6, por grupo) foram isolados. Neste experimento foi medido o relaxamento vascular, dependente do endotélio, produzido por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh;  $10^{-10}$ -  $10^{-5}$  M), vistos na Figura 6A.

As figuras 6A e 6B mostram o vasorelaxamento induzido pela ACh. Houve um prejuízo neste relaxamento de  $17,49 \pm 4,04\%$  no grupo 2R1C em comparação com os animais Sham e Sham+doxiciclina (Figura 6A;  $P<0,05$ ). No entanto, apenas o tratamento com doxiciclina 30 mg/kg normalizou o efeito induzido pela ACh nas aortas de ratos 2R1C (Figura 6B;  $P<0,05$ ). Esses efeitos são interpretados como uma melhora na disfunção endotelial, já que a ACh induz relaxamento dependente do endotélio. Por outro lado, a doxiciclina não alterou a potência da ACh em promover relaxamento, representada pelo  $pD_2$ . Os valores de  $pD_2$  não foram diferentes entre os oito grupos experimentais (Figura 6C). A hipertensão 2R1C reduziu o efeito máximo, e o tratamento com a doxiciclina 30 mg/kg restaurou este efeito ( $P<0,05$ ; Figura 6C). A reatividade vascular à ACh não foi alterada pelo tratamento em nenhum dos grupos controle (Sham e Sham+doxiciclina).

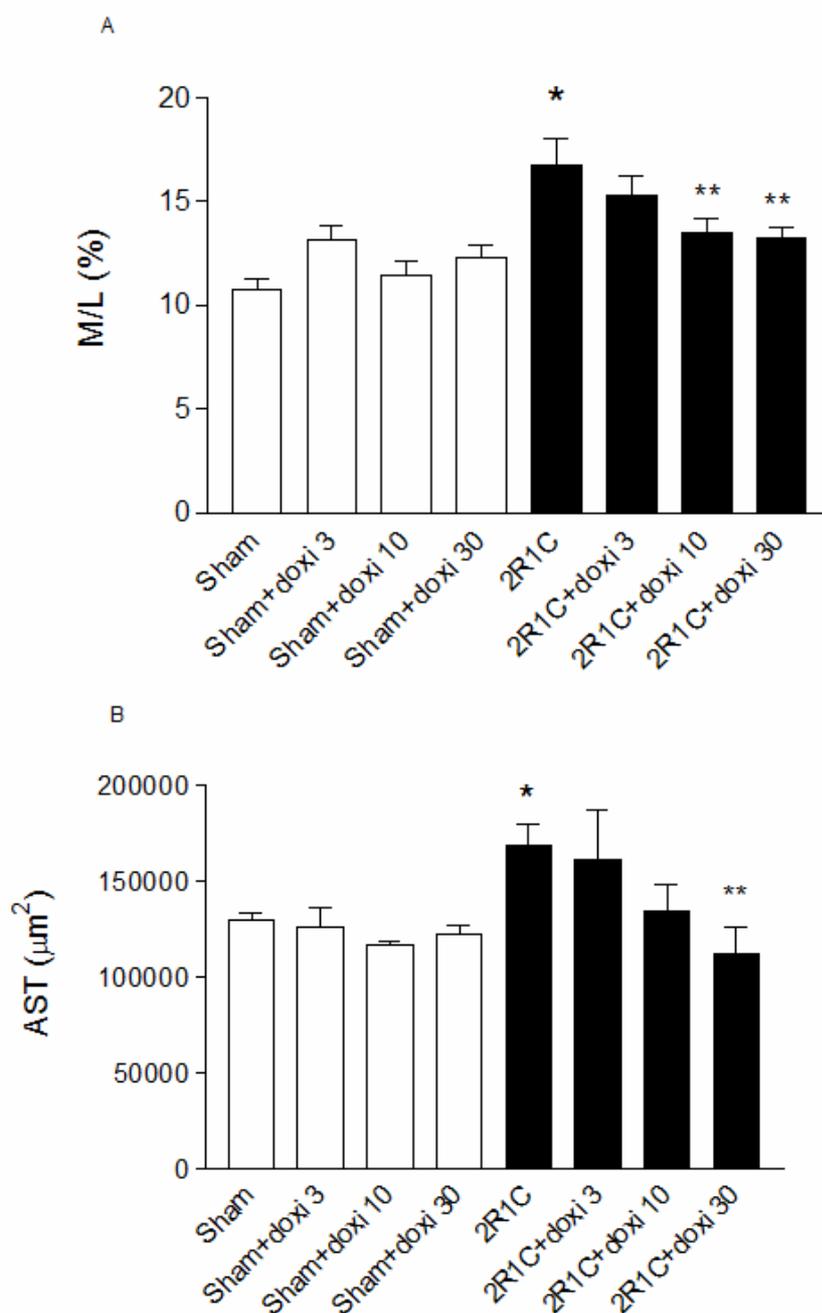


**Figura 6** – Efeito da hipertensão 2R1C sobre o relaxamento induzido pela ACh em comparação com os animais Sham (A). Efeitos da doxiciclina sobre o relaxamento vascular dependente do endotélio induzido por ACh (A e B), relaxamento máximo (Emax %) e pD<sub>2</sub> (C) em anéis de aorta. As respostas vasculares foram estudadas após a pré-contracção com fenilefrina (10<sup>-7</sup>M). Valores expressos como média ± EPM (n=6/grupo) \* e \*\* P<0,05 versus Sham e 2R1C, respectivamente.

### **3 - Efeitos de diferentes doses de doxiciclina sobre o remodelamento vascular em ratos 2R1C:**

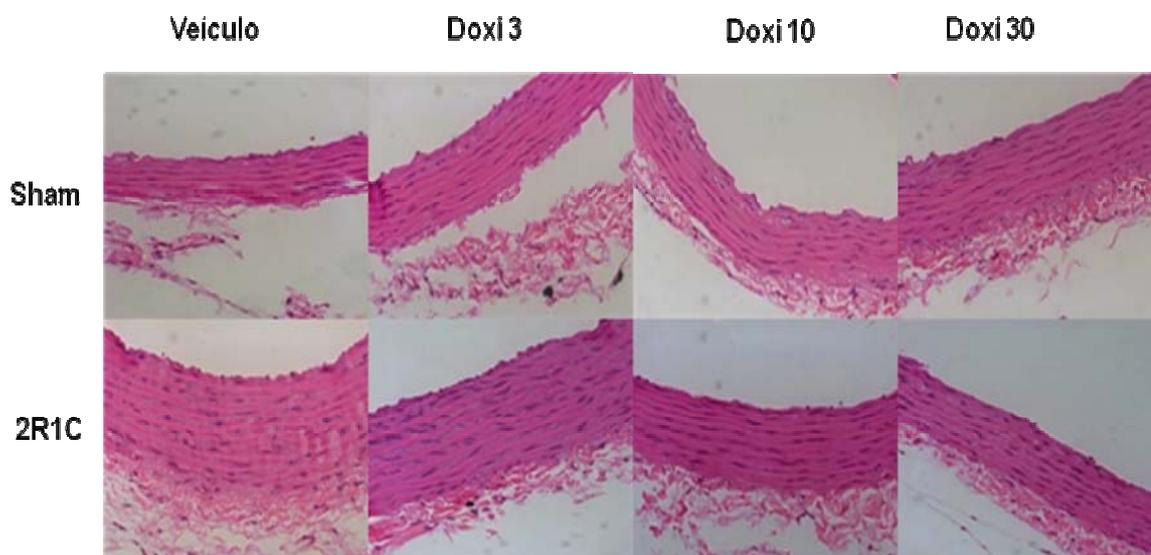
A figura 7 mostra que a administração da doxiciclina provocou um efeito de aumento da razão M/L (média/lúmen) e na área de secção transversal (AST) nas aortas dos ratos 2R1C ( $P<0,05$ ). Esse aumento da camada média é conhecido como remodelamento vascular hipertrófico. Em relação à razão M/L o tratamento com doxiciclina 10 e 30 mg/kg atenuou o aumento nesta razão induzido pela hipertensão 2R1C. Por outro lado, apenas o tratamento com doxiciclina 30 mg/kg atenuou o aumento na área de secção transversal (AST) (Figura 7A e 7B;  $P<0,05$ ) nos vasos do ratos hipertensos.

Na figuras 8A e 8B observamos que houve hipertrofia dos vasos dos animais 2R1C em relação aos animais Sham e Sham+doxiciclina, que foi acompanhada de aumento significativo no número de células musculares lisas (hiperplasia). Esse aumento foi atenuado pelo tratamento com doxiciclina 30 mg/kg (Figura 8A e 8B,  $P<0,05$ ), sem alterações na morfologia das aortas dos animais controle.

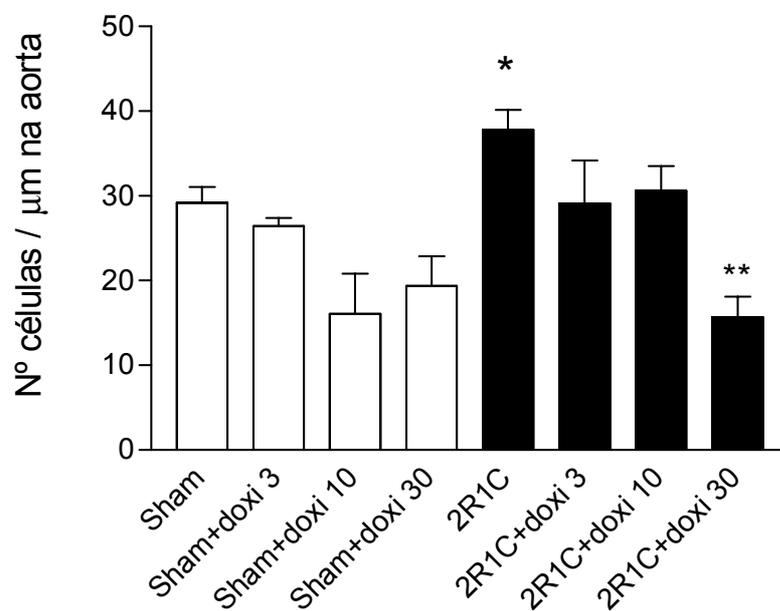


**Figura 7** – Efeitos da doxiciclina sobre as alterações estruturais na aorta associadas à hipertensão 2R1C. Valores da razão entre a camada média e o lúmen (M/L) (A), da área de secção transversal (AST) (B). Dados expressos como média  $\pm$  EPM (n=5-8/grupo). \* e \*\*  $P < 0,05$  versus Sham e 2R1C, respectivamente.

A



B



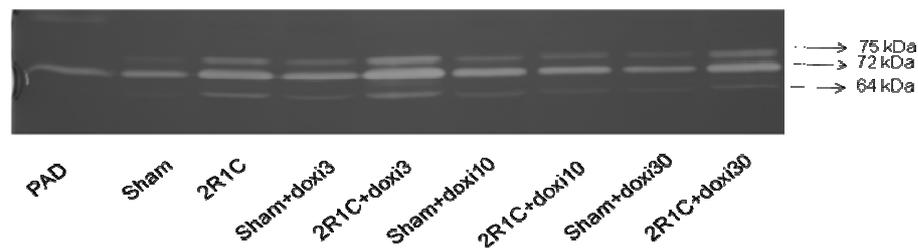
**Figura 8** – Efeitos da doxiciclina sobre a proliferação de células musculares lisas. Fotografias representativas de aortas (x400) coradas com H&E (A). Representação gráfica do número de células musculares lisas na camada média de aortas referentes aos 8 grupos experimentais (B). Dados expressos como média ± EPM (n=5-8/grupo). \* e \*\*  $P < 0,05$  versus Sham e 2R1C, respectivamente.

#### 4 - Efeitos de diferentes doses de doxiciclina sobre os níveis e atividade de MMP-2 na aorta dos animais 2R1C:

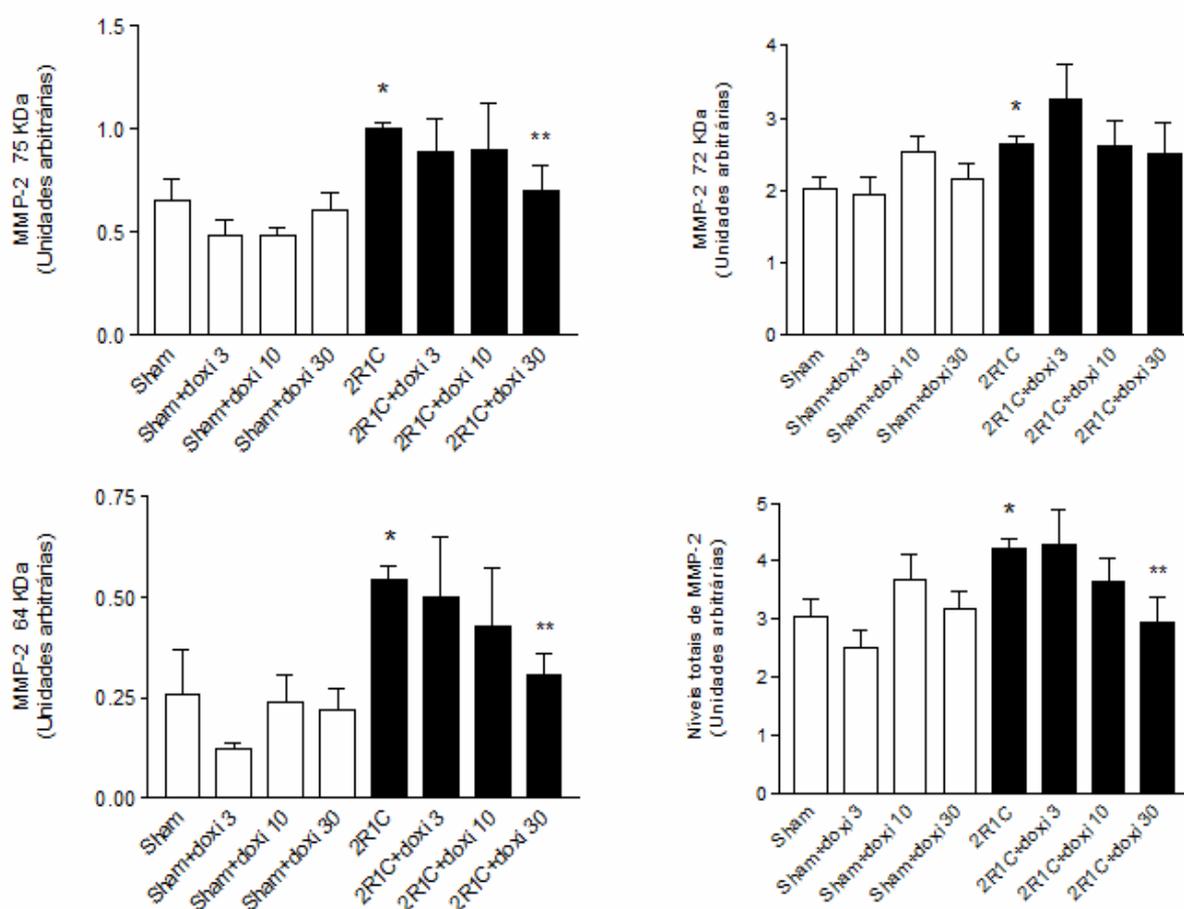
A técnica de zimografia foi utilizada para determinar os níveis de MMPs na aorta de todos os grupos experimentais. A figura 9A apresenta um zimograma representativo dos extratos das aortas com bandas correspondentes ao peso molecular das três bandas de MMP-2 (75, 72 e 64 kDa). As aortas dos ratos 2R1C mostram níveis aumentados das três formas de MMP-2 quando comparadas com os quatro grupos controle ( $P<0,05$ ; Figura 9B). O tratamento com doxiciclina 30 mg/kg, mas não com doxiciclina 3 e 10 mg/kg, atenuou o aumento induzido pela hipertensão 2R1C na MMP-2 (75 e 64 kDa) e nos níveis totais de MMP-2 ( $P<0,05$ ; Figura 9B).

Uma determinação semi-quantitativa da atividade gelatinolítica dessas enzimas foi realizada nas aortas por zimografia *in situ*. A atividade gelatinolítica é quantificada pela intensidade de fluorescência verde na camada média e endotélio das aortas dos animais. Foi encontrado um aumento na intensidade de fluorescência na aorta dos animais 2R1C em relação aos grupos controle ( $P<0,05$ ; Figuras 10A e 10B). O tratamento dos animais hipertensos com doxiciclina 30 mg/kg atenuou este aumento induzido pela hipertensão 2R1C ( $P<0,05$ ; Figuras 10A e 10B). Para confirmar que a atividade encontrada deve-se a MMP-2, realizou-se a imunomarcação das amostras de aorta com anticorpo anti-MMP-2, e as imagens foram sobrepostas. Além disso, realizou-se a quantificação dos níveis dessa enzima pela intensidade de fluorescência vermelha emitida no ensaio. Em paralelo com a zimografia *in situ* foram encontrados maiores níveis de MMP-2 nos animais hipertensos em comparação aos animais controle ( $P<0,05$ ; Figura 10 A e 10C), e menores níveis nos animais hipertensos tratados com doxiciclina 30 mg/kg em comparação aos animais não tratados ( $P<0,05$ ; Figura 10 A e 10C).

A

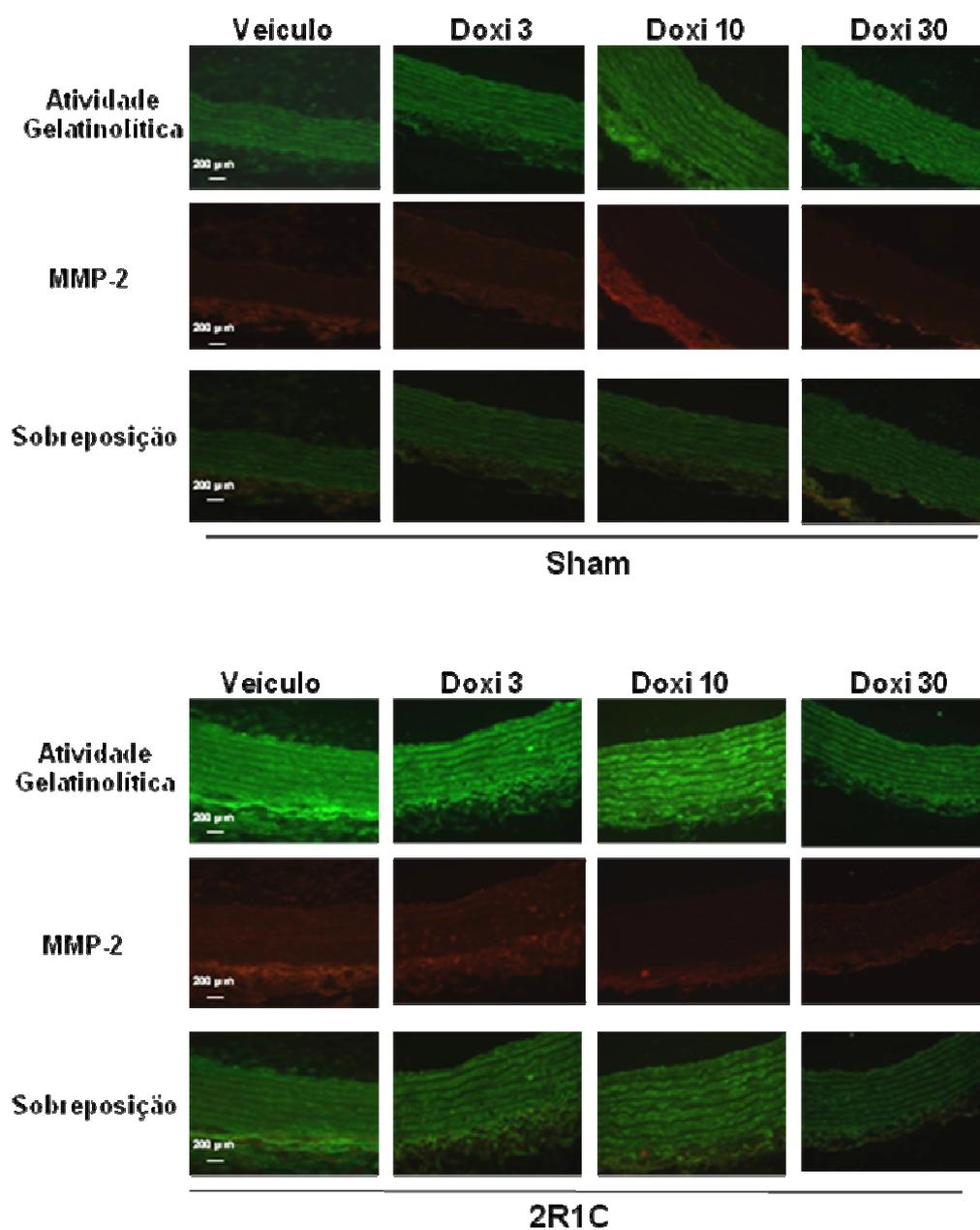


B

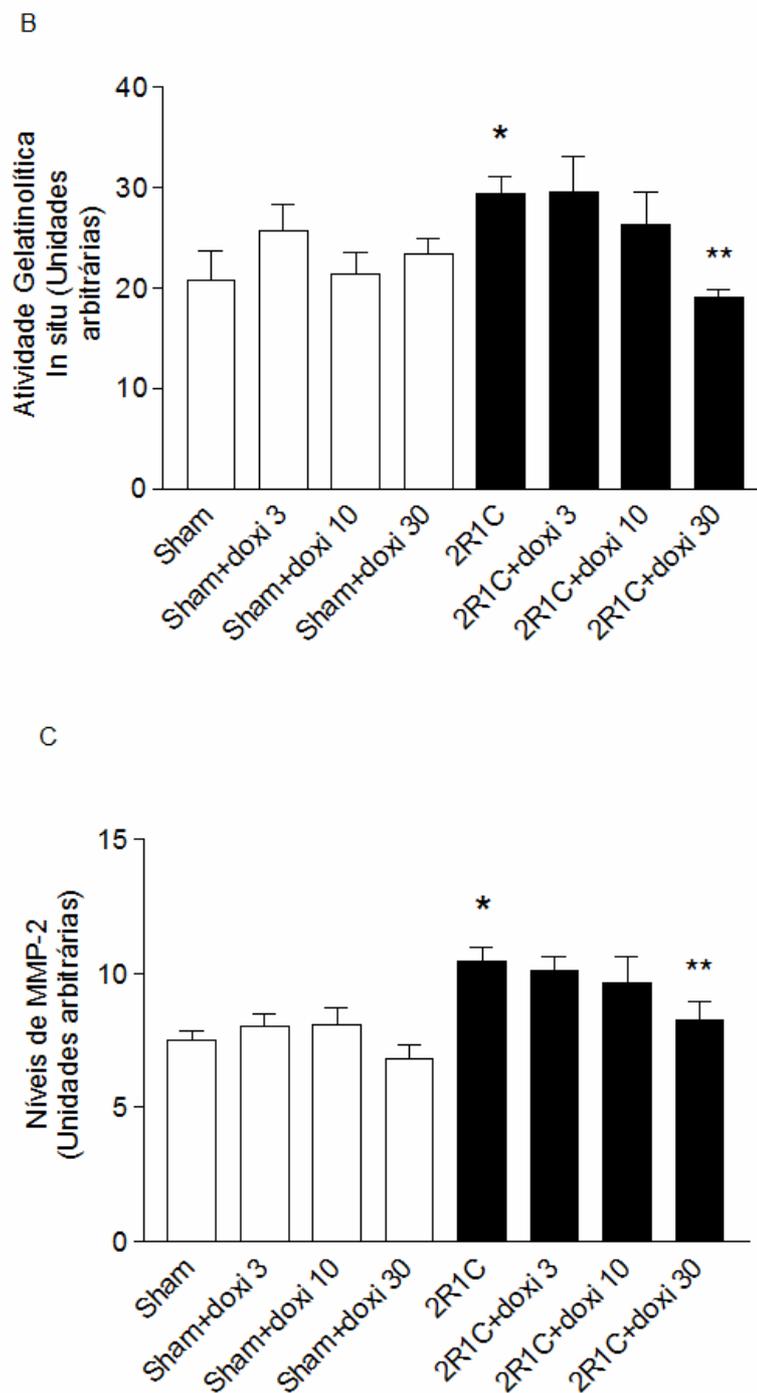


**Figura 9** – Efeitos da doxiciclina sobre os níveis de MMP-2 na aorta dos oito grupos experimentais. Gel representativo de zimografia SDS-PAGE de extrato de aorta (A). O peso molecular das bandas de MMP-2 (75, 72 e 64 kDa) foi identificado após eletroforese em gel a 12% SDS-PAGE. PAD: padrão interno. Representação gráfica dos valores para cada peso molecular da MMP-2 nos extratos de aorta (B). Valores expressos como média  $\pm$  EPM, (n=7-12/grupo). \* e \*\*  $P < 0,05$  versus Sham e 2R1C, respectivamente.

A



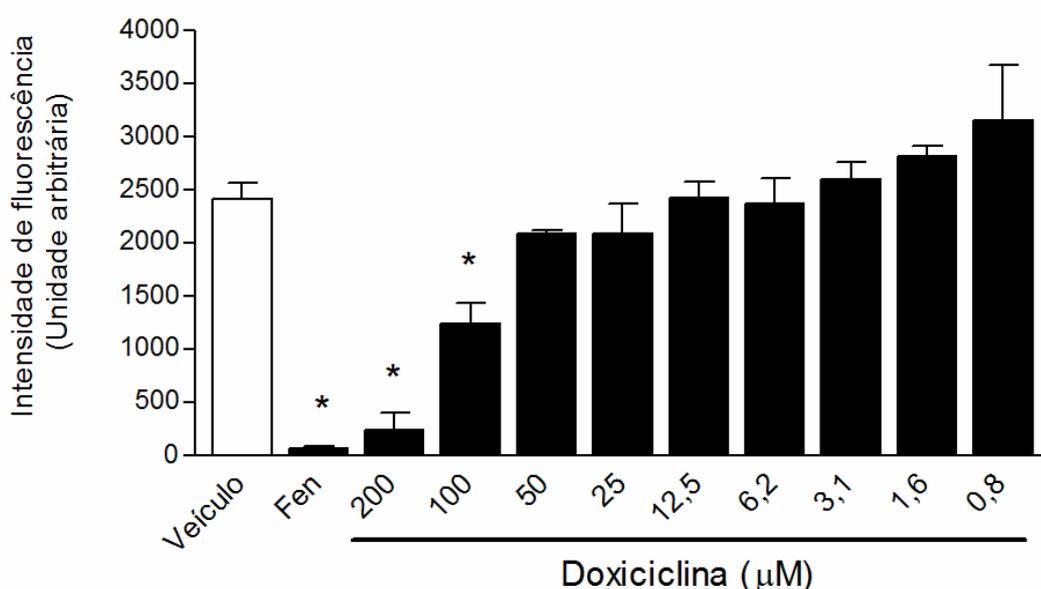
**Figura 10-** Efeitos da doxiciclina sobre a atividade gelatinolítica *in situ* e nos níveis de MMP-2 nas aortas (A). Fotografias representativas de aortas (x400) incubadas com DQ gelatin, anticorpo anti-MMP-2 e sobreposição das imagens.



**Figura 10-** Representação gráfica da atividade gelatinolítica *in situ*, em que a intensidade de fluorescência verde reflete a atividade enzimática via degradação da gelatina (fluoróforo) (n=6-8/grupo) (B). (C) Representação gráfica dos níveis de MMP-2, avaliada como intensidade de fluorescência vermelha (n=6-8/grupo). \* e \*\*  $P < 0,05$  versus Sham e 2R1C, respectivamente.

### 5- Efeitos *in vitro* de diferentes concentrações de doxiciclina sobre a atividade da MMP-2 recombinante:

A doxiciclina significativamente inibiu a atividade da MMP-2 recombinante humana quando presente nas concentrações de 100 e 200  $\mu\text{M}$  ( $P < 0,05$ ; Figura 11;  $n=3$  por concentração). Em concentrações menores que 50  $\mu\text{M}$ , a doxiciclina não produziu efeito sobre a atividade da MMP-2 recombinante. A fenantrolina na concentração de 100  $\mu\text{M}$  produziu completa inibição.



**Figura 11-** Efeito da doxiciclina em diferentes concentrações (de 0,8 a 200  $\mu\text{M}$ ) sobre a atividade da MMP-2 recombinante. A fenantrolina (Fen) foi utilizada na concentração de 0,1 mM como controle positivo de inibição da MMP-2. Valores expressos como média  $\pm$  EPM ( $n=3$ ). \* $P < 0,05$  versus veículo.

## ***DISCUSSÃO***

## DISCUSSÃO

O principal achado do presente estudo foi de que o tratamento com a dose de doxiciclina de 30 mg/kg/dia, diminui os níveis de MMP-2 e a atividade gelatinolítica, além de atenuar as alterações vasculares encontradas nos ratos hipertensos 2R1C, enquanto as doses de 3 e 10 mg/kg/dia não produziram tais efeitos. Assim, este é o primeiro estudo que compara os efeitos de doses significativamente diferentes de doxiciclina sobre a função e o remodelamento vascular, e sobre os níveis de MMP-2 em animais hipertensos 2R1C.

Como descrito anteriormente, as metaloproteinases são endopeptidases cálcio-dependentes, contendo zinco, presentes na matriz extracelular de vários tecidos. São as principais enzimas responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular. Um desequilíbrio na sua regulação pode resultar em aumentos significativos de suas atividades, o que contribui para um remodelamento vascular patológico, migração e proliferação de células musculares lisas e desenvolvimento e progressão de doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial (Donnelly, Collinson et al. 2003; Schulz 2007).

Dessa maneira, a inibição farmacológica das MMPs em doenças onde estas proteases desempenham importante papel patológico é uma importante estratégia terapêutica. A doxiciclina inibe a expressão e a atividade das MMPs e tem sido usada para avaliar o possível papel das MMPs em doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão arterial (Castro, Rizzi et al. 2008; Rizzi, Castro et al. 2009; Castro, Rizzi et al. 2010). Entretanto, na literatura, existem discrepâncias relacionadas aos efeitos da doxiciclina em doenças cardiovasculares, o que poderia ser explicado pelas diferenças nas doses utilizadas nestes estudos. Por exemplo,

enquanto o tratamento oral com doxiciclina na dose de 30 mg/kg/dia melhora o remodelamento após o infarto do miocárdio e a função do ventrículo esquerdo em modelo de infarto do miocárdio em ratos e reduz o tamanho do infarto em modelo de isquemia/reperfusão do miocárdio (Griffin, Jinno et al. 2005; Garcia, Go et al. 2007), a doxiciclina na dose de 160 mg/kg/dia acelera o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca e a progressão da insuficiência cardíaca produzida por constrição da aorta (Vinet, Rouet-Benzineb et al. 2008). Além disso, a dose relativamente baixa de 15 mg/kg/dia de doxiciclina reverte alterações mecânicas, elétricas e bioquímicas encontradas no coração de ratos diabéticos (Yaras, Sariahmetoglu et al. 2008). Embora, Castro et al mostrou que a doxiciclina na dose de 30 mg/kg/dia reverte completamente as mudanças associadas ao modelo de hipertensão 2R1C (Castro, Rizzi et al. 2008), não existem evidências experimentais de que menores doses desta droga poderiam produzir efeitos similares. Além disso, não existem estudos anteriores comparando os efeitos de diferentes doses de doxiciclina sobre as alterações vasculares associadas à hipertensão 2R1C. A resolução desta questão pode ser importante, pois os estudos anteriores mostraram efeitos variados produzidos por diferentes doses de doxiciclina.

Como descrito na introdução, a MMP-2, especificamente, pode participar do controle do tônus vascular através da proteólise de alguns peptídeos vasoativos, tais como a adrenomedulina, a Big-ET-1 e o CGRP (Fernandez-Patron, Radomski et al. 1999; Fernandez-Patron, Stewart et al. 2000; Martinez, Oh et al. 2004). Por meio dessas ações, essa enzima poderia estar envolvida na manutenção da disfunção vascular encontrada em modelos de hipertensão arterial (Ceron, Castro et al.; Castro, Rizzi et al. 2008; Castro, Rizzi et al. 2009) e em pacientes com hipertensão essencial (de la Sierra and Larrousse).

De fato, neste estudo, os animais 2R1C apresentaram um prejuízo no vasorelaxamento dependente do endotélio (induzido pela acetilcolina), caracterizando uma disfunção endotelial, o que não foi observado nos animais controle. O tratamento com a doxíciclina 30 mg/kg foi capaz de reverter este prejuízo no vasorelaxamento, o que sugere que a MMP-2 pode participar do processo de disfunção vascular associado ao modelo de hipertensão 2R1C.

A hipertensão arterial está associada a um remodelamento hipertrófico ocorrido nos grandes vasos, o qual é explicado por mudanças no tamanho e no número de células musculares lisas, bem como pela deposição excessiva de componentes da matriz extracelular (Lehoux and Tedgui 1998). As MMPs, como já citado, participam do remodelamento vascular por degradar componentes da matriz extracelular, promover proliferação e migração de células musculares lisas, e hipertrofia celular (Intengan and Schiffrin 2001; Bouvet, Gilbert et al. 2005). Em nosso estudo, os ratos 2R1C apresentaram tais mudanças estruturais evidenciadas pelo aumento do número de células do músculo liso vascular, da razão M/L e da AST, o que está de acordo com estudos anteriores (Dao, Lemay et al. 2001; Bouvet, Gilbert et al. 2005; Castro, Rizzi et al. 2008). Neste contexto, o tratamento com a doxíciclina 30 mg/kg reverteu as alterações estruturais hipertróficas induzidas pela hipertensão 2R1C, evidenciado por menores aumentos do número de células musculares lisa, da AST e da razão M/L. Estes resultados confirmam o papel importante das MMPs, especialmente da MMP-2, no remodelamento vascular induzido pela hipertensão 2R1C.

Diferentemente da zimografia convencional e da zimografia *in situ*, foi utilizado o método de imunofluorescência para a MMP-2, com o objetivo de determinar os níveis de MMP-2 no tecido e co-localizar a atividade gelatinolítica *in situ* com a

expressão dessa enzima, uma vez que outras MMPs também possuem a capacidade de degradar a gelatina. Os animais 2R1C apresentaram um aumento significativo dos níveis de MMP-2 tanto na zimografia em gel, quanto nesta imunofluorescência para a MMP-2. Além disso, apenas o tratamento com a doxiciclina na dose de 30 mg/kg atenuou este aumento na MMP-2 (75 e 64 kDa) e nos níveis totais de MMP-2 (avaliados pela zimografia em gel), além de reduzir a atividade gelatinolítica *in situ* e os níveis de MMP-2 (avaliados por imunofluorescência).

De uma forma geral, o tratamento com doxiciclina 30 mg/kg/dia reverteu completamente tanto as alterações morfológicas quanto as funcionais descritas anteriormente (Castro, Rizzi et al. 2008). Contudo, apesar das menores doses (3 e 10 mg/kg/dia) produzirem efeitos anti-hipertensivos similares aos produzidos pela maior dose (30 mg/kg/dia), o tratamento com a dose de 10 mg/kg/dia produziu um efeito discreto, mas não significativo, sobre as alterações estruturais e funcionais associadas à hipertensão 2R1C. De fato, as técnicas bioquímicas (zimografia em gel, zimografia *in situ* e imunofluorescência para a MMP-2) confirmam que as doses mais baixas de doxiciclina produziram menor ou nenhuma inibição das MMPs.

Uma razão óbvia para a ausência de efeitos para as doses mais baixas de doxiciclina seria a falta de concentração suficiente deste inibidor de MMP no tecido vascular. Com relação a isto, Prall et al (Prall, Longo et al. 2002) mostrou que o tratamento com doxiciclina nas doses de 10, 50, e 100 mg/kg reduziu o crescimento de aneurisma de aorta abdominal em camundongos e produziu aumentos dose-dependentes nas concentrações séricas médias de doxiciclina, atingindo as concentrações de 1,4; 2,7 e 11,9 µg/mL (Prall, Longo et al. 2002), o que corresponde a 2,7; 5,3 e 23,2 µM, respectivamente. Se assumirmos que as concentrações de

doxiciclina alcançadas nos vasos de ratos do presente estudo foram proporcionalmente semelhantes às aquelas relatadas por Prall et al (Prall, Longo et al. 2002), esperaríamos que as concentrações de doxiciclina variassem de 1 a 5  $\mu\text{M}$ , aproximadamente. De fato, Prall et al (Prall, Longo et al. 2002) sugeriu que a doxiciclina, apenas em concentrações maiores que 4  $\mu\text{M}$ , é eficaz em reduzir as concentrações de MMPs. Assim, essa sugestão concorda com nossos resultados, mostrando que doses inferiores ou iguais a 10 mg/kg/dia de doxiciclina não produzem efeitos significativos.

O experimento *in vitro* mostrou que a doxiciclina em concentrações iguais ou inferiores a 50  $\mu\text{M}$  não produziu nenhum efeito significativo sobre a atividade da MMP-2 recombinante humana, o que pode não ter refletido os efeitos produzidos *in vivo* através do tratamento crônico com a doxiciclina (Golub, Lee et al. 1998; Lee, Ciancio et al. 2004), incluindo por exemplo, a redução na estabilidade do RNAm da MMP-2 (Liu, Xiong et al. 2003), que provoca redução na expressão das MMPs.

Embora a dose de 30 mg/kg de doxiciclina administrada aos ratos tenha sido a única dose efetiva em atenuar de forma significativa as alterações vasculares, e seja substancialmente maior do que as doses antibióticas administradas em humanos (1 a 1,5 mg/kg) (Prall, Longo et al. 2002), os níveis plasmáticos de doxiciclina podem ser semelhantes entre estes, devido possivelmente ao rápido metabolismo da doxiciclina nos ratos. Desta maneira, uma limitação deste estudo seria a ausência da dosagem dos níveis plasmáticos atingidos pelas doses de doxiciclina, que efetivamente provocaram a inibição das MMPs.

Contudo, as doses menores de doxiciclina (3 e 10 mg/kg/dia) foram capazes de produzir efeitos anti-hipertensivos, sem reduzir de forma significativa os níveis de MMPs. Assim, a doxiciclina pode apresentar outros efeitos além da inibição das

MMPs, como por exemplo, efeito antioxidante via diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio, o que poderia contribuir para o aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico, atenuação da disfunção endotelial, e redução das alterações estruturais induzidas pelos aumentos das MMPs na hipertensão 2R1C (Castro, Rizzi et al. 2009). Além disso, se o tratamento com estas doses inferiores fosse mais prolongado, talvez os efeitos de inibição das MMPs provocados pela doxiciclina poderiam ocorrer de forma significativa.

## ***CONCLUSÃO***

## CONCLUSÃO

O tratamento com a doxiciclina, apenas na dose de 30 mg/kg/dia, produziu efeito anti-hipertensivo, atenuou os níveis de MMP-2 e reverteu a disfunção endotelial e o remodelamento vascular associado à hipertensão 2R1C. Nossos resultados sugerem que a doxiciclina não provoca uma inibição dose-dependente das MMPs, e que doses de doxiciclina inferiores a 30 mg/kg/dia não atenuam as alterações vasculares encontradas no modelo de hipertensão 2R1C.

## ***REFERÊNCIAS***

## REFERÊNCIAS

- VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Sociedade Brasileira de Cardiologia / Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade Brasileira de Nefrologia. Arq Bras Cardiol 2010; 95 (1 supl.1):1-51.
- Ahmed, S. H., L. L. Clark, et al. (2006). "Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease." Circulation **113**(17): 2089-96.
- Arribas, S. M., A. Hinek, et al. (2006). "Elastic fibres and vascular structure in hypertension." Pharmacol Ther **111**(3): 771-91.
- Axisa, B., I. M. Loftus, et al. (2002). "Prospective, randomized, double-blind trial investigating the effect of doxycycline on matrix metalloproteinase expression within atherosclerotic carotid plaques." Stroke **33**(12): 2858-64.
- Bouvet, C., L. A. Gilbert, et al. (2005). "Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition." Hypertension **45**(3): 432-7.
- Castro, M. M., E. Rizzi, et al. (2008). "Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats." Atherosclerosis **198**(2): 320-31.
- Castro, M. M., E. Rizzi, et al. "Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling." Matrix Biol **29**(3): 194-201.
- Castro, M. M., E. Rizzi, et al. (2010). "Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling." Matrix Biol **29**(3): 194-201.
- Castro, M. M., E. Rizzi, et al. (2009). "Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension." Free Radic Biol Med **46**(9): 1298-307.
- Ceron, C. S., M. M. Castro, et al. "Spironolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and expression in a model of renovascular hypertension." Br J Pharmacol **160**(1): 77-87.

- Chobanian, A. V., G. L. Bakris, et al. (2003). "The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report." Jama **289**(19): 2560-72.
- Chow, A. K., J. Cena, et al. (2007). "Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature." Br J Pharmacol **152**(2): 189-205.
- Creemers, E. E., J. P. Cleutjens, et al. (2001). "Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure?" Circ Res **89**(3): 201-10.
- Dao, H. H., J. Lemay, et al. (2001). "Norepinephrine-induced aortic hyperplasia and extracellular matrix deposition are endothelin-dependent." J Hypertens **19**(11): 1965-73.
- de la Sierra, A. and M. Larrousse "Endothelial dysfunction is associated with increased levels of biomarkers in essential hypertension." J Hum Hypertens **24**(6): 373-9.
- Deryugina, E. I. and J. P. Quigley (2006). "Matrix metalloproteinases and tumor metastasis." Cancer Metastasis Rev **25**(1): 9-34.
- Dollery, C. M., J. R. McEwan, et al. (1995). "Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease." Circ Res **77**(5): 863-8.
- Donnelly, R., D. J. Collinson, et al. (2003). "Hypertension, matrix metalloproteinases and target organ damage." J Hypertens **21**(9): 1627-30.
- Duprez, D. A. (2006). "Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in vascular remodeling and inflammation: a clinical review." J Hypertens **24**(6): 983-91.
- Fernandez-Patron, C., M. W. Radomski, et al. (1999). "Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor." Circ Res **85**(10): 906-11.
- Fernandez-Patron, C., K. G. Stewart, et al. (2000). "Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction." Circ Res **87**(8): 670-6.
- Flamant, M., S. Placier, et al. (2007). "Role of matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling." Hypertension **50**(1): 212-8.

- Fridez, P., M. Zulliger, et al. (2003). "Geometrical, functional, and histomorphometric adaptation of rat carotid artery in induced hypertension." J Biomech **36**(5): 671-80.
- Galis, Z. S. and J. J. Khatri (2002). "Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly." Circ Res **90**(3): 251-62.
- Galis, Z. S., G. K. Sukhova, et al. (1995). "Microscopic localization of active proteases by in situ zymography: detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue." Faseb J **9**(10): 974-80.
- Garcia, R. A., K. V. Go, et al. (2007). "Effects of timed administration of doxycycline or methylprednisolone on post-myocardial infarction inflammation and left ventricular remodeling in the rat heart." Mol Cell Biochem **300**(1-2): 159-69.
- Garcia, R. A., D. P. Pantazatos, et al. (2005). "Molecular interactions between matrilysin and the matrix metalloproteinase inhibitor doxycycline investigated by deuterium exchange mass spectrometry." Mol Pharmacol **67**(4): 1128-36.
- Gerlach, R. F., C. Demacq, et al. (2007). "Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma." Clin Biochem **40**(1-2): 119-23.
- Gerlach, R. F., J. A. Uzuelli, et al. (2005). "Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities." Anal Biochem **344**(1): 147-9.
- Goldblatt, H. (1958). "Experimental renal hypertension; mechanism of production and maintenance." Circulation **17**(4, Part 2): 642-7.
- Golub, L. M., H. M. Lee, et al. (1998). "Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms." Adv Dent Res **12**(2): 12-26.
- Golub, L. M., N. S. Ramamurthy, et al. (1991). "Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs." Crit Rev Oral Biol Med **2**(3): 297-321.
- Griendling, K. K. and G. A. FitzGerald (2003). "Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies." Circulation **108**(17): 2034-40.

- Griffin, M. O., M. Jinnó, et al. (2005). "Reduction of myocardial infarct size by doxycycline: a role for plasmin inhibition." Mol Cell Biochem **270**(1-2): 1-11.
- Himmelman, A., T. Hedner, et al. (1998). "Isolated systolic hypertension: an important cardiovascular risk factor." Blood Press **7**(4): 197-207.
- Intengan, H. D. and E. L. Schiffrin (2001). "Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis." Hypertension **38**(3 Pt 2): 581-7.
- Kandasamy, A. D., A. K. Chow, et al. "Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix." Cardiovasc Res **85**(3): 413-23.
- Kannel, W. B. (1993). "Hypertension as a risk factor for cardiac events--epidemiologic results of long-term studies." J Cardiovasc Pharmacol **21 Suppl 2**: S27-37.
- Kearney, P. M., M. Whelton, et al. (2005). "Global burden of hypertension: analysis of worldwide data." Lancet **365**(9455): 217-23.
- Lee, H. M., S. G. Ciancio, et al. (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**(3): 453-63.
- Lehoux, S., C. A. Lemarie, et al. (2004). "Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling." Circulation **109**(8): 1041-7.
- Lehoux, S. and A. Tedgui (1998). "Signal transduction of mechanical stresses in the vascular wall." Hypertension **32**(2): 338-45.
- Lemarie, C. A., P. L. Tharaux, et al. "Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling." J Mol Cell Cardiol **48**(3): 433-9.
- Lerman, L. O. and A. R. Chade (2006). "Atherosclerotic process, renovascular disease and outcomes from bench to bedside." Curr Opin Nephrol Hypertens **15**(6): 583-7.
- Lerman, L. O., A. R. Chade, et al. (2005). "Animal models of hypertension: an overview." J Lab Clin Med **146**(3): 160-73.

- Levy, A. S., J. C. Chung, et al. (2009). "Nitric oxide and coronary vascular endothelium adaptations in hypertension." Vasc Health Risk Manag **5**: 1075-87.
- Liu, J., W. Xiong, et al. (2003). "Mechanism of inhibition of matrix metalloproteinase-2 expression by doxycycline in human aortic smooth muscle cells." J Vasc Surg **38**(6): 1376-83.
- Martinez-Maldonado, M. (1991). "Pathophysiology of renovascular hypertension." Hypertension **17**(5): 707-19.
- Martinez, A., H. R. Oh, et al. (2004). "Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator." Biochem J **383**(Pt. 3): 413-8.
- Martinez, M. L., M. M. Castro, et al. (2008). "Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-2 activity and reverses vascular dysfunction in renovascular hypertensive rats." Eur J Pharmacol **591**(1-3): 224-30.
- Mohammed, F. F., D. S. Smookler, et al. (2003). "Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **62 Suppl 2**: ii43-7.
- Mulvany, M. J. (2002). "Small artery remodeling and significance in the development of hypertension." News Physiol Sci **17**: 105-9.
- Murphy, G. and H. Nagase (2008). "Progress in matrix metalloproteinase research." Mol Aspects Med **29**(5): 290-308.
- Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." J Biol Chem **274**(31): 21491-4.
- 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**(3): 614-24.
- Novak, M. J., L. P. Johns, et al. (2002). "Adjunctive benefits of subantimicrobial dose doxycycline in the management of severe, generalized, chronic periodontitis." J Periodontol **73**(7): 762-9.
- Onoda, T., T. Ono, et al. (2004). "Doxycycline inhibits cell proliferation and invasive potential: combination therapy with cyclooxygenase-2 inhibitor in human colorectal cancer cells." J Lab Clin Med **143**(4): 207-16.

- Peterson, J. T. (2004). "Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery." Heart Fail Rev **9**(1): 63-79.
- Prall, A. K., G. M. Longo, et al. (2002). "Doxycycline in patients with abdominal aortic aneurysms and in mice: comparison of serum levels and effect on aneurysm growth in mice." J Vasc Surg **35**(5): 923-9.
- Raffetto, J. D. and R. A. Khalil (2008). "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease." Biochem Pharmacol **75**(2): 346-59.
- Rizzi, E., M. M. Castro, et al. (2009). "Evidence of early involvement of matrix metalloproteinase-2 in lead-induced hypertension." Arch Toxicol **83**(5): 439-49.
- Ruddy, J. M., J. A. Jones, et al. (2009). "Differential effects of mechanical and biological stimuli on matrix metalloproteinase promoter activation in the thoracic aorta." Circulation **120**(11 Suppl): S262-8.
- Safar, M. E., G. M. London, et al. (1998). "Recent advances on large arteries in hypertension." Hypertension **32**(1): 156-61.
- Sarafidis, P. A. and G. L. Bakris (2008). "Resistant hypertension: an overview of evaluation and treatment." J Am Coll Cardiol **52**(22): 1749-57.
- Schulz, R. (2007). "Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 211-42.
- Sluijter, J. P., D. P. de Kleijn, et al. (2006). "Vascular remodeling and protease inhibition--bench to bedside." Cardiovasc Res **69**(3): 595-603.
- Souza-Tarla, C. D., J. A. Uzuelli, et al. (2005). "Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities." Clin Biochem **38**(5): 410-4.
- Spinale, F. G. (2007). "Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function." Physiol Rev **87**(4): 1285-342.

- Spinale, F. G., M. L. Coker, et al. (2000). "Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target." Cardiovasc Res **46**(2): 225-38.
- Tessone, A., M. S. Feinberg, et al. (2005). "Effect of matrix metalloproteinase inhibition by doxycycline on myocardial healing and remodeling after myocardial infarction." Cardiovasc Drugs Ther **19**(6): 383-90.
- Textor, S. C. (2006). "Renovascular hypertension update." Curr Hypertens Rep **8**(6): 521-7.
- Thompson, R. W. and B. T. Baxter (1999). "MMP inhibition in abdominal aortic aneurysms. Rationale for a prospective randomized clinical trial." Ann N Y Acad Sci **878**: 159-78.
- Villarreal, F. J., M. Griffin, et al. (2003). "Early short-term treatment with doxycycline modulates postinfarction left ventricular remodeling." Circulation **108**(12): 1487-92.
- Vinet, L., P. Rouet-Benzineb, et al. (2008). "Chronic doxycycline exposure accelerates left ventricular hypertrophy and progression to heart failure in mice after thoracic aorta constriction." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(1): H352-60.
- Visse, R. and H. Nagase (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." Circ Res **92**(8): 827-39.
- Wagenseil, J. E. and R. P. Mecham (2009). "Vascular extracellular matrix and arterial mechanics." Physiol Rev **89**(3): 957-89.
- Wang, W., C. J. Schulze, et al. (2002). "Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury." Circulation **106**(12): 1543-9.
- Watts, S. W., C. Rondelli, et al. (2007). "Morphological and biochemical characterization of remodeling in aorta and vena cava of DOCA-salt hypertensive rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(5): H2438-48.
- Wilson, E. M. and F. G. Spinale (2001). "Myocardial remodelling and matrix metalloproteinases in heart failure: turmoil within the interstitium." Ann Med **33**(9): 623-34.

- Yaras, N., M. Sariahmetoglu, et al. (2008). "Protective action of doxycycline against diabetic cardiomyopathy in rats." Br J Pharmacol **155**(8): 1174-84.
- Yasmin, C. M. McEniery, et al. (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**(2): 372.
- Zhang, Y., K. K. Griendling, et al. (2005). "Vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension is mediated by vascular smooth muscle cell-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>." Hypertension **46**(4): 732-7.

# 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](#)