

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

RAQUEL CARROS ANTONIO

**Efeito da doxiciclina nas alterações vasculares de ratos
espontaneamente hipertensos.**

Ribeirão Preto – SP

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

RAQUEL CARROS ANTONIO

**Efeito da doxiciclina nas alterações vasculares de ratos
espontaneamente hipertensos.**

**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: Profa. Dra. Raquel Fernanda
Gerlach**

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

Antonio, Raquel Carros

Efeitos dadoxíclicina nas alterações vasculares de ratos espontaneamente hipertensos. Ribeirão Preto, 2010.

76 p. : il. ; 30cm

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

Orientador: Gerlach, Raquel Fernanda.

1. Metaloproteinases. 2. Doxiclicina. 3. SHR
4. Estresse oxidativo. 5. Remodelamento Vascular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Raquel Carros Antonio

Efeito da doxiciclina nas alterações vasculares de ratos espontaneamente hipertensos.

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.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho aos meus pais, Jurandyr Paggiolo e Miriam M. Paggiolo, por estarem sempre ao meu lado, em todos os momentos, pela dedicação e amor com que sempre orientaram minha formação.

*“...Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem,
Ou que seus planos nunca vão dar certo ou que você nunca vai ser alguém...
Se você quiser alguém em quem confiar confie em si mesmo...*

***...Quem acredita
Sempre alcança...”***

(Renato Russo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a *Deus* pela vida e saúde por me amparar nos momentos difíceis, mostrar o caminho certo nas horas incertas e suprir todas as minhas necessidades, a *Nossa Senhora da Medalha Milagrosa* pela fé e força interior para superar as dificuldades.

Aos meus pais *Jurandyr e Miriam*, os quais amo muito, obrigada pelo carinho, paciência e incentivo por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos.

À minha querida *Tata*, pela verdadeira amizade, companheirismo e amor.

Aos meus irmãos, cunhados(as), sobrinhos(as) pelo incentivo, em especial ao meu irmão *Paulo*, a minha cunhada *Marystela* e aos meus sobrinhos *Maurício e Murillo*, que sempre me acolheram com carinho e fizeram a saudade de casa diminuir durante esses anos.

À minha avó *Vica* e a minha tia *Loreni*, mesmo longe sempre torceram por mim e sempre me fizeram presente em suas orações.

À minha orientadora *Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach*, por acreditar em mim, me mostrar o caminho da ciência, pela orientação, ensinamentos, paciência e carinho.

Ao *Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos* pela abertura do seu laboratório e ensinamentos acadêmicos.

As professoras *Profa. Dra. Cristina Antonialli Silva* e *Profa. Dra. Lusiane Bendehack* por participarem deste momento.

Agradeço especialmente à *Carla* e à *Elen* que me acompanharam desde o início desse trabalho, grande parte do que sei hoje devo a vocês, obrigada por participarem do meu crescimento profissional e principalmente pessoal.

Aos meus sempre e eternos amigos, *Adriana* e *Rafael*, mesmo com a distância estão sempre me ao meu lado. À minha amiga *Andréia*, obrigada pela amizade, apoio, compreensão, por dividir os momentos alegres e os não tão alegres e por saber que posso contar sempre com você. À *Natália* pela amizade verdadeira conquistada durante esses poucos anos.

Aos amigos do grupo de trabalho com hipertensão *Alisson*, *Danielle*, *Diogo* e *Stefany*, pela ajuda nos experimentos e amizade. À *Aline* pelas conversas e apoio. Ao *Evandro* pela ajuda nos estudos.

Aos amigos do *Laboratório de Proteínas* e de *Farmacologia Cardiovascular*, pela amizade e paciência.

À *Junia* pelo apoio técnico excepcional.

Aos funcionários *José Waldik Ramon*, *Fátima Helena Ferreira Petean* e *Sonia Maria Stefanelli* pelo carinho, dedicação, amizade, excelente auxílio técnico e colaboração.

Ao *Serginho* do Biotério da Faculdade de Odontologia, pela atenção, paciência, por sempre cuidar dos animais com dedicação.

Aos *Professores* do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP pela contribuição acadêmica e aos demais *Pós-Graduandos* e *Funcionários* a agradável convivência.

Ao apoio financeiro da *CAPES* (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

*"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende".*

Leonardo da Vinci

RESUMO

A hipertensão arterial provoca alterações morfológicas e funcionais na vasculatura. Metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) são endopeptidases dependentes de cálcio e zinco que degradam a matriz extracelular, apresentam papel importante em várias doenças cardiovasculares, inclusive na hipertensão. Aumento na atividade das MMPs pode levar à degradação das proteínas da matriz extracelular, contribuindo para alterações nos vasos sanguíneos durante hipertensão. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram 1) Comparar a espessura das aortas, a atividade gelatinolítica total, a expressão de MMP-2 e atividade de espécies reativas de oxigênio em SHR e normotensos WKy; 2) Verificar se o tratamento com doxiciclina altera a pressão arterial sistólica em SHR; 3) Verificar se o tratamento com doxiciclina altera a hipertrofia de aortas em SHR; 4) Verificar se o tratamento com doxiciclina altera a atividade gelatinolítica total e a quantidade e/ou atividade de MMP-2 na aorta de SHR; 5) Verificar se o tratamento com doxiciclina altera a atividade de EROs em SHR. Animais normotensos WKy e SHR foram tratados com o veículo ou doxiciclina (30mg/kg/dia), gavagem, por cinco semanas. A PAS foi monitorada semanalmente por pletismografia de cauda. Após o tratamento, os animais foram sacrificados e a aorta de cada animal foi submetida às seguintes análises: a) análise morfológica incluindo área de secção transversal, razão média/lúmen e medida dos diâmetros interno e externo; b) dosagem de proteína pelo método de Bradford e zimografia em gel; c) zimografia *in situ*; d) imunofluorescência para MMP-2 e e) EROs *in situ*. O tratamento com doxiciclina reduziu a hipertensão arterial (SHR= 194± 2mmHg versus SHR+Doxi= 166± 1mmHg p<0,05). O tratamento com doxiciclina levou à diminuição da atividade gelatinolítica total e EROs na camada média e íntima das aortas, mas não reduziu o remodelamento vascular na aorta dos animais tratados. O conjunto dos nossos resultados indica que a doxiciclina, reduz a PAS, a atividade gelatinolítica, particularmente da MMP-2, no entanto não altera o remodelamento vascular nas aortas de SHR.

ABSTRACT

Systolic Arterial Hypertension (SAH) causes structural and functional modifications of the vasculature. Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of zinc and calcium-dependent endopeptidases that degrade the extracellular matrix components playing an important role in many cardiovascular conditions, including hypertension. Increased MMPs activation promotes excessive degradation of the extracellular matrix components, thus contributing to hypertensive structural alterations. The aim of this work was 1) To compare the aorta thickness, total gelatinolytic activity, MMP-2 levels/activity and oxidative stress activity in SHR and controls WKY; 2) to examine whether the treatment with doxycycline prevents the increase in arterial blood pressure in SHR animals; 3) To examine whether the treatment with doxycycline prevents aortic hypertrophy in SHR animals; 4) To examine whether the treatment with doxycycline prevents total gelatinolytic activity increase and MMP-2 levels/activity in SHR animals; 5) To examine whether the treatment with doxycycline prevents oxidative stress in SHR animals. Controls animals and SHR rats were treated with vehicle or doxycycline (30 mg/kg/day) for five weeks. Systolic blood pressure was monitored weekly by tail-cuff plethysmography. After the treatment, animals were sacrificed and the aortas were used to assess: a) morphometry including cross-sectional area, mean ratio/lumen and measurement inner and outer diameters; b) measurement of protein by Bradford method and gel zymography; c) *in situ* zymography; d) immunofluorescence for MMP-2 e) *in situ* oxidative stress. Treatment with doxycycline attenuated hypertension (SHR= 194± 2mmHg versus SHR+Doxy= 166± 1mmHg p<0,05). Treatment with doxycycline prevented the increase in total gelatinolytic activity and increase in oxidative stress in the tunica media and in the tunica intima of the aortas, although it did not alter vascular remodeling. These results suggest that doxycycline decreases the systolic arterial hypertension, the gelatinolytic activity, particularly MMP-2, in the aortas of SHR.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ae – Área externa

Ai – Área interna

ANOVA – Análise de Variância

APS- Persulfato de amônio

Big-ET-1- Big endotelina 1

BSA- Albumina do soro bovino

CSA- Área de secção transversal

CaCl₂- Cloreto de cálcio

Ca²⁺- Cálcio

CGRP- Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

DE- Diâmetro externo

DHE- Dihidroetídeo

DI- Diâmetro interno

DQ gelatin- Substrato fluorescente para determinar a atividade gelatinolítica

EPM- Erro padrão da média

EROS- Espécies reativas de oxigênio

ET1- Endotelina 1

GPX- Glutathione Peroxidase

g- Gramas

µg- Microgramas

H⁺- Hidrogênio

H₂O₂- Peróxido de hidrogênio

H&E- Hematoxilina e eosina

KDa- Quilodaltons

Kg- Quilograma

L- Litro

μL- Microlitros

L-NAME- N^G-nitro-L-arginina

M- Molar

mM- Milimolar

μmol- Micromol

mmol - Milimol

mL- Mililitros

mg- Miligramas

mmHg – Milímetros de mercúrio

Média- Camada média

M/L- Razão média/lúmen

MMPs- Metaloproteinases

MT-MMPs- MMP de membrana

N- Número

nmol- Nanomol

NADPH - β-Nicotinamida adenosina dinucleotído fosfato

NEM – N-etilmaleimida

NO- Óxido nítrico

O₂- Ânion superóxido

OCT (Tissue Tec)- Composto para congelar tecidos

OH⁻- Radical hidroxil

OONO⁻- Peroxinitrito

PA- Pressão arterial

PAD- Padrão interno

PAS- Pressão Arterial Sistólica

PBS- Tampão salina fosfato

PFA- Paraformaldeído

pH- Potencial hidrogeniônico

PMSF- Fenilmetilsulfonil

SDS- Dodecil sulfato de sódio

SHR- Ratos espontaneamente hipertensos

SOD- Superóxido Dismutase

TEMED- Tetrametil etilenodiamina

TIMPs- Inibidores endógenos de MMPs

μU- Microunidades internacionais

VSMC- Células musculares lisas vasculares

WKy- Wistar-Kyoto

ZnCl₂- Cloreto de zinco

Zn²⁺- Zinco

2R-1C – Dois-rins, um-clipe

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras 1 - Principais metaloproteinases e suas características estruturais	19
Figura 2 - Ativação proteolítica e/ou não proteolítica da MMP-2	20
Figura 3 - Ações exercidas pela MMP-2 sobre o tônus vascular.....	24
Figura 4 - Efeito da doxíciclina sobre a pressão arterial sistólica e o sobre peso corporal	46
Figura 5 - Efeito da doxíciclina sobre alterações estruturais da aorta associada à hipertensão.....	48
Figura 6 - Efeito da doxíciclina sobre a proliferação de células musculares lisas.....	50
Figura 7 - Efeito da doxíciclina na atividade gelatinolítica.....	52
Figura 8 - Efeito da doxíciclina sobre a atividade gelatinolítica <i>in situ</i> e a expressão de MMP-2 em aortas	55
Figura 9 – Efeito da doxíciclina sobre a produção vascular de EROs	58

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1- Hipertensão arterial.....	17
2- Metaloproteinases.....	18
2.1- Metaloproteinase-2 e Hipertensão Arterial	22
2.2- Metaloproteinases e Estresse Oxidativo.....	24
3- Efeitos da Doxíciclina.....	26
4- Modelo Experimental: Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR).....	27
HIPÓTESE	29
OBJETIVOS.....	31
MATERIAIS E MÉTODOS	33
1 - Considerações Gerais	33
1.1 - Grupos Experimentais	33
2 – Materiais	34
2.1 - Soluções utilizadas nos experimentos.....	34
2.2 - Droga administrada diretamente nos animais	35
2.3 - Equipamentos utilizados nos experimentos.....	36
2.4 - Programas de aquisição de dados	36
3 – Metodologia	37
3.1 - Parâmetros hemodinâmicos	37
3.1.1 - Avaliação da pressão arterial sistólica (PAS) e peso corporal	37
3.2 - Parâmetros estruturais	37
3.2.1 - Análise morfológica da aorta	37
3.3 - Parâmetros bioquímicos e moleculares.....	39
3.3.1 - Determinação de espécies reativas de oxigênio vasculares	39
3.3.1.A - EROs <i>in situ</i>	39
3.3.2 - Determinação dos níveis de MMP-2 por zimografia em gel	39
3.3.2.A - Dosagem de proteína pelo método de Bradford	40
3.3.2.B - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%	41
3.3.3 - Determinação da atividade gelatinolítica por zimografia <i>In situ</i>	41

3.3.4 - Imunofluorescência para MMP-2.....	42
4 - Análise estatística	43
RESULTADOS.....	45
1 - Efeito da doxiciclina sobre a pressão arterial sistólica e peso corporal em ratos SHR	45
2 - Efeitos da doxiciclina sobre o remodelamento vascular em ratos SHR.....	47
3 – Efeitos da doxiciclina sobre as concentrações vasculares de MMP-2 em ratos SHR	51
4 – Efeitos da doxiciclina sobre a atividade gelatinolítica <i>in situ</i> e presença de MMP-2 localizada no tecido por imunomarcção	53
5 - Efeitos da doxiciclina sobre as concentrações vasculares de EROs.....	57
DISCUSSÃO	60
CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1- Hipertensão arterial

A hipertensão é considerada um problema de saúde pública no mundo, sendo responsável por milhares de mortes por ano, afeta cerca de 25% da população mundial adulta, há um indicativo que até 2025 essa doença atinja 60% da população (Kearney et al., 2005). No Brasil representa 55% das várias causas de morte ao ano (Freitas et al., 2001). Cerca de dois terços do ônus da doença ocorre nos países em desenvolvimento, atingindo principalmente pessoas com idade entre 45 e 69 anos (Lawes et al., 2006).

A hipertensão arterial é uma condição caracterizada pela elevação persistente da pressão arterial. Provocando alterações patológicas na vasculatura contribuindo para o aumento e aparecimento das doenças cardiovasculares, tais como, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio e morte cardíaca súbita (Wang et al., 2009).

A hipertensão arterial envolve tanto componentes ambientais como hereditários, sendo classificada como uma condição multifatorial, relacionada a alterações morfológicas e funcionais no sistema cardiovascular (Lassegue; Griendling, 2004). Dentre vários fatores associados à hipertensão, o aumento da atividade de algumas enzimas como as metaloproteinases, pode estar amplamente relacionado às alterações cardiovasculares observadas nessa doença (Gali; Khatri 2002; Lehoux et al. 2004; Raffeto; Khalil, 2008).

2- Metaloproteinases

Metaloproteinases são endopeptidases cálcio-dependentes, contendo zinco, presentes na matriz extracelular de vários tecidos, incluindo musculatura lisa e endotélio, entre outros. A família das MMPs apresenta mais de 25 espécies, classificadas em, collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), gelatinases (MMP-2 ou gelatinase A e MMP-9 ou gelatinase B), estromelisina (MMP-3 e MMP-10) e MMPs de membranas (MT1-MMP a MT6-MMP) (Raffetto; Khalil, 2008).

Todas as isoformas apresentam similaridade de estrutura e função. Basicamente são compostas de sítio catalítico, contendo zinco ou cálcio e de um pró-peptídeo, ligado a este sítio por uma ligação sulfidrila que as mantém em forma inativa. Algumas isoformas possuem uma região conhecida como “hemopexin-like”, responsável pelo reconhecimento e adesão aos componentes da matriz extracelular (Woessner ; Nagase, 2000).

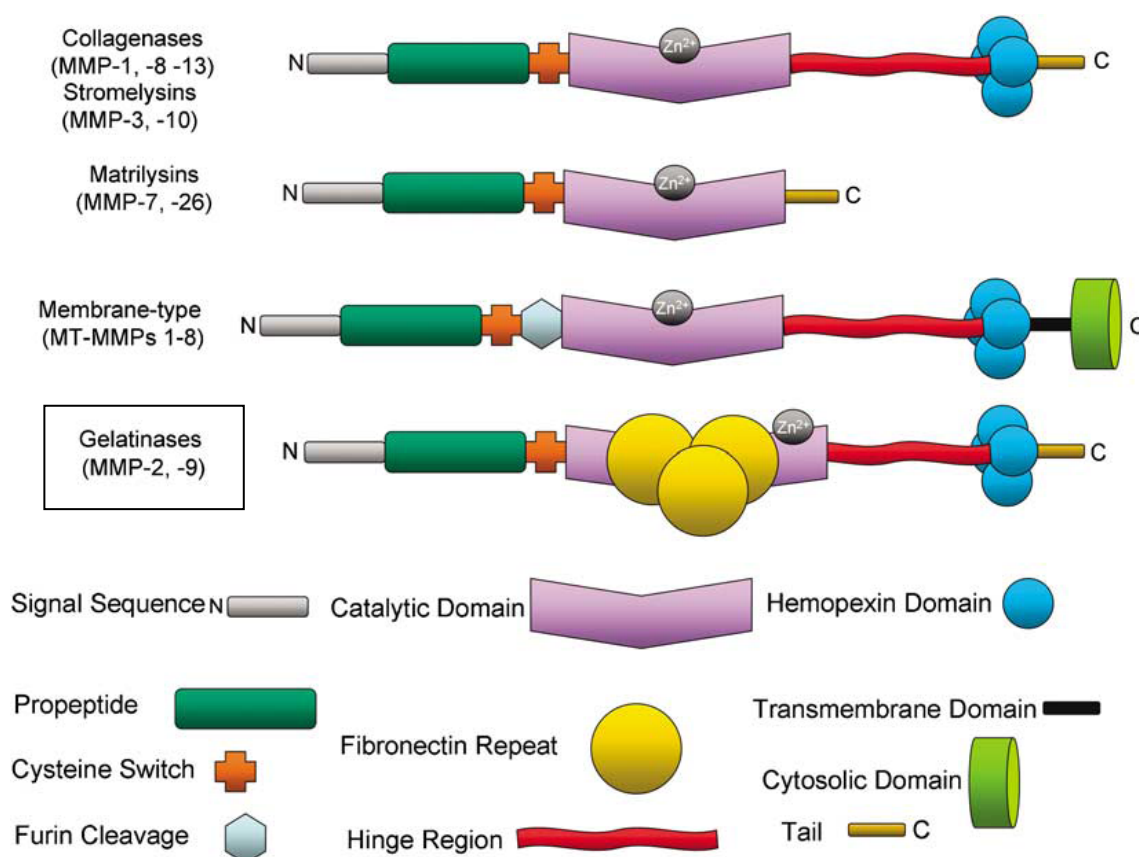


Figura 1: Principais metaloproteinases e suas características estruturais. A gelatinase (MMP-2), apresenta três domínios “*fibronectin-like*” que as diferem das outras MMPs (adaptado de Chow et al., 2007).

As MMPs são sintetizadas e secretadas em uma pró-forma latente, zimogênio ou pró-MMPs. Sua atividade depende na maioria das vezes, da clivagem dos domínios pró-peptídicos do sítio ativo da enzima (Nagase; Woessner, 1999). A ativação proteolítica da MMP por proteases como plasmina e MT MMP (metaloproteinases de membrana) ou TIMPs (inibidores teciduais específicos de MMPs) resulta na remoção ou ruptura do domínio peptídeo resultando em um ativo não funcional de MMP. Além disso, outros fatores como alterações conformacionais induzidas por detergentes, agentes oxidantes, citocinas, angiotensina II, aldosterona e estresse de cisalhamento, competem com o íon Zn^{2+} pela ligação sulfidril e

promovem a ruptura do resíduo de cisteína no domínio pro-peptídeo interrompendo a sua ligação com o íon Zn^{2+} , resultando em uma enzima ativa. (Spinale 2002; Woessner Jr., 1991; Schulz, 2007; Visse; Nagase, 2003). Estes mecanismos estão representados na figura 2.

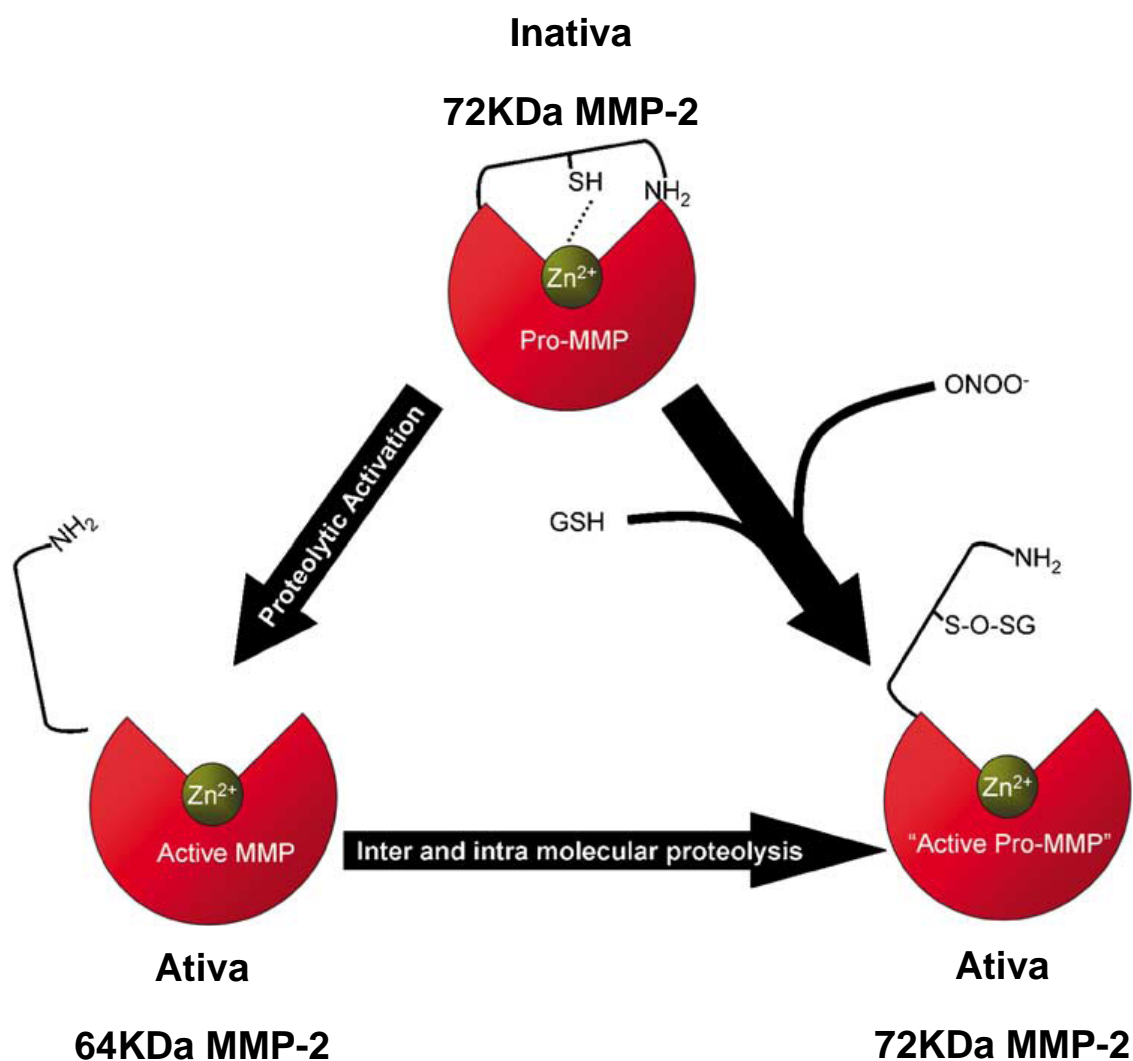


Figura 2: Ativação proteolítica e/ou não proteolítica das MMPs (adaptado de Chow et al., 2007).

Fisiologicamente, existe um equilíbrio entre a ativação e a inativação destas MMPs pelos TIMPs, inibidores endógenos das MMPs, que se classificam em 4 tipos diferentes: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. Esses inibidores possuem diferentes eficácias contra diferentes MMPs. Eles se encontram em equilíbrio com as MMPs (estequiometria 1:1) (Bode; Maskos, 2003; Visse; Nagase, 2003; Donnelly et al., 2003).

De forma geral, as metaloproteinases podem promover a degradação de várias proteínas da matriz extracelular participando ativamente do processo de remodelamento tecidual (Page-McCaw et al., 2007). Desse modo, podem alterar o remodelamento vascular, que ocorre nos vasos sanguíneos em resposta às alterações crônicas na hemodinâmica (Galis; Khatri, 2002; Ward et al., 2000).

O remodelamento vascular é caracterizado como uma resposta adaptativa ao aumento da pressão arterial em que o objetivo é normalizar a tensão exercida na parede do vaso (Mayet; Hughes, 2003). É considerado um processo adaptativo, no entanto, o aumento constante da pressão arterial o torna crônico e mal-adaptativo. Ocasionalmente ocasionando alterações estruturais, mecânicas e funcionais, resultando em espessamento da camada média dos vasos sanguíneos (Intengan; Schiffrin, 2001). De acordo com a teoria de La Place ($T=P \times R$, onde T=tensão, P= pressão e R=raio) o remodelamento pode ser classificado em hipertrófico (artérias de condutância) e eutrófico (artérias de resistência) (Duprez, 2006; Humphrey, 2008). O remodelamento hipertrófico envolve alterações no tamanho do músculo liso vascular, no número de células, além do acúmulo de matriz extracelular e proteínas como o colágeno e fibronectina (Duprez, 2006). Vários estudos realizados com células musculares lisas, mostraram que o aumento da pressão intra-luminal pode levar ao aumento significativo da atividade de MMPs (Lehoux, 2004).

O desequilíbrio na regulação das MMPs pode resultar em aumento significativo de suas atividades, o que contribui para o desenvolvimento ou progressão de várias doenças como: artrite reumatóide, arteriosclerose, fibrose, enfisema pulmonar, crescimento tumoral, metástases e doenças cardiovasculares, inclusive hipertensão (Galis; Katri, 2002; Raffeto; Khalil, 2008).

2.1- Metaloproteinase-2 e Hipertensão Arterial

As metaloproteinases (MMPs) degradam as macromoléculas da matriz extracelular, entre elas o colágeno. A MMP-2 (gelatinase) é responsável pela degradação dos componentes da membrana basal, como colágeno do tipo IV, V e laminina, colágeno do tipo I e III, elastina e fibronectina (Nagase et al., 2006).

Portanto, por promoverem o aumento dessa degradação de proteínas da matriz extracelular, as metaloproteinases, principalmente a MMP-2, podem estar amplamente relacionadas às alterações cardiovasculares por desempenharem papel importante na invasão de monócitos na vasculatura e na migração de células da musculatura lisa, contribuindo assim para o progresso de lesões vasculares participando ativamente do processo de remodelação tecidual acelerada, a fim de manter o fluxo sanguíneo a vários órgãos (Nagase, 1999; Raffetto; Khalil, 2008).

Desta maneira, a MMP-2 parece exercer um papel importante na hipertensão. Há estudos em modelos animais de hipertensão quando comparados com os controles, demonstrando aumento significativo da expressão e atividade destas enzimas, especialmente da MMP-2, no remodelamento vascular (Bouvet et al., 2005; Castro et al., 2009; Ceron et al., 2010; Rizzi et al., 2009). Entre eles, estão o modelo 2R-1C de hipertensão renovascular em ratos (Castro et al., 2008; Castro et al.,

2009) e o modelo de administração crônica de L-NAME em ratos (Bouvet et al., 2005)

A MMP-2 pode também regular o tônus vascular (figura 3), por clivar o peptídeo vasoativo derivado do endotélio, a big endotelina-1 (Big ET-1) em endotelina-1 (ET-1) que possui potente ação vasoconstritora. Assim, cliva também um potente neuropeptídeo vasodilatador, o CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), formando metabólitos com menor ação vasodilatador. Além disso, cliva o peptídeo vasodilatador adrenomodulina, formando metabólitos menos vasodilatadores e produz metabólitos vasoconstrictores (Fernandez-Patron et al., 1999; Martinez et al., 2004). Assim a MMP-2 pode causar vasoconstricção por aumentar a ação de vasoconstrictores ou diminuir a ação de vasodilatadores, podendo ter papel importante na manutenção da pressão arterial (Chow et al., 2007; Fernandez-Patron, et al., 2000).

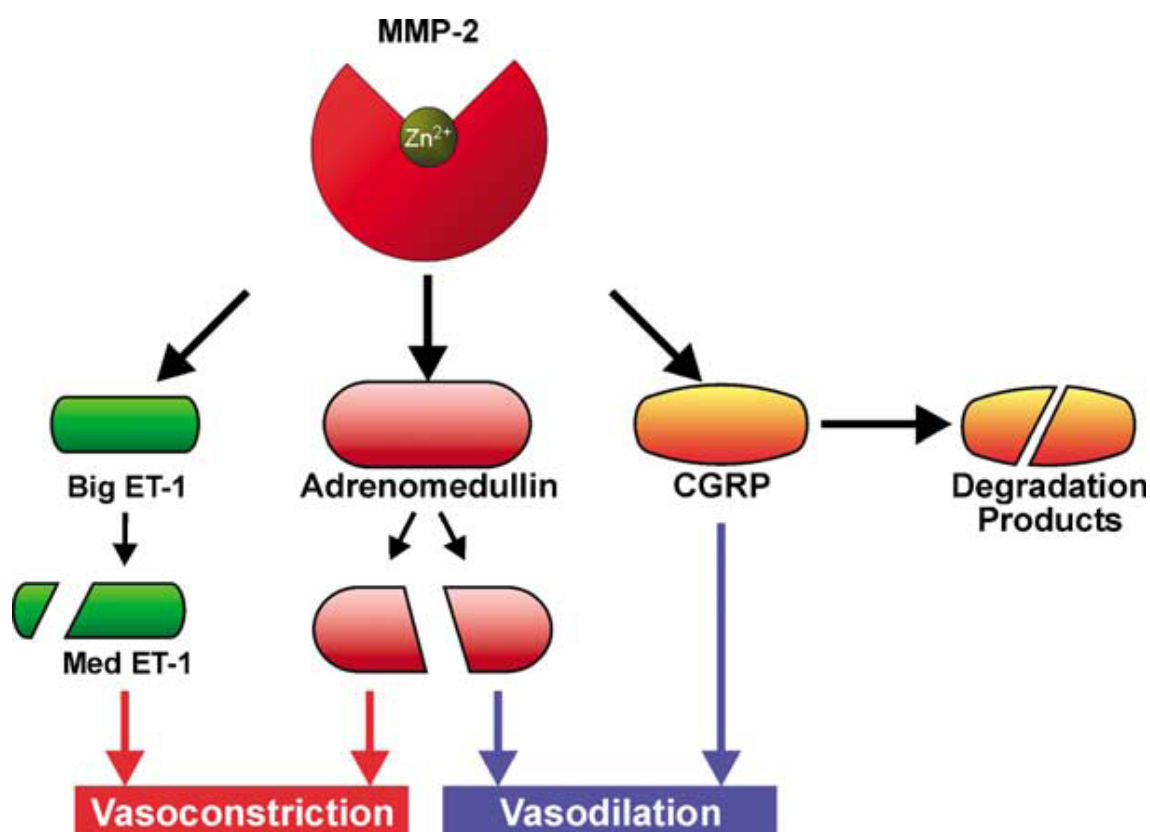


Figura 3: Ações exercidas pela MMP-2 sobre o tônus vascular (Chow et al., 2007).

2.2- Metaloproteinases e Estresse Oxidativo

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são espécies derivadas do metabolismo do oxigênio, encontradas na maioria dos sistemas biológicos, e são consideradas produtos celulares prejudiciais. Entretanto, em concentrações fisiológicas, são essenciais em processos de sinalização e regulação intracelular (Griendling et al., 2000).

Das várias EROs, as que apresentam uma maior importância nos estudos cardiovasculares são: ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxil (OH^-) e o peroxinitrito ($OONO^-$), formado pela reação do O_2^- com o óxido nítrico (NO) (Lassegue; Griendling, 2004; Touyz; Schiffrin, 2004). O O_2^- é o

principal precursor da produção das outras EROs e pode ser sintetizado nos vasos sanguíneos pela ação de várias enzimas pró-oxidantes, dentre elas a enzima NADPH oxidase (Touyz, 2004).

Em condições fisiológicas, a EROs é regulada por enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), a glutathiona peroxidase (GPX) e a catalase (Touyz, 2004). Já em algumas condições patológicas, como a hipertensão arterial, pode ocorrer um desequilíbrio entre a produção e a remoção destes agentes oxidantes do organismo, resultando em um aumento de suas concentrações e atividades, processo conhecido como estresse oxidativo, o qual pode estar relacionado com algumas alterações cardiovasculares (Griendling; Fitzgerald, 2003). Dentre estas alterações destacar-se a disfunção endotelial, proliferação e hipertrofia de células musculares lisas, peroxidação lipídica e aumento da atividade de metaloproteinases (Fortuno et al., 2005).

Como já visto anteriormente, as EROs são importantes na ativação de MMPs, especialmente a MMP-2 (Luchtefeld et al., 2005). Elas podem reagir com o resíduo de cisteína, presente no pró-peptídeo desta enzima, promovendo a ruptura do grupo tiol com o zinco, resultando na sua ativação (Van Wart et al., 1990).

Alguns estudos em modelos de animais mostraram que o tratamento com antioxidante reduziu a expressão da MMP-2, com conseqüente redução da disfunção endotelial e remodelamento vascular (Castro et al., 2009).

3- Efeitos da Doxíciclina

Doxiciclina é um antibiótico de amplo espectro, da classe A das tetraciclinas, de grande utilidade clínica, que apresenta certas propriedades anti-angiogênicas (Golub et al., 1998). A doxiciclina é um potente inibidor inespecífico das metaloproteinases em virtude da sua capacidade quelante de íons bivalentes como íons Zn^{2+} e Ca^{2+} que são necessários para a manutenção da estrutura terciária e essencial para a atividade das MMPs (Golub et al., 1987; Peterson, 2001; Garcia et al., 2005; Peterson, 2004).

A doxiciclina, mesmo desprovida de sua ação antimicrobiana ou em concentrações plasmáticas menores que as necessárias para esta ação, ainda é capaz de inibir a atividade MMPs (Golub et al., 1987; Lee et al., 2004). Independentemente do mecanismo de ação microbiana a doxiciclina inibe as metaloproteinases e melhora o resultado de doenças inflamatórias onde MMPs desempenham importantes papéis patológicos (Golub, et al. 1998). Até o momento, é o único inibidor de MMP aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para uso clínico e tem sido demonstrado que em dose subantimicrobiana (20mg/duas vezes ao dia) melhora o resultado de inflamação periodontal (Novak et al., 2002).

Estudos recentes sugerem que a doxiciclina reduz a atividade das MMPs. Em modelos animais SHR, o uso de doxiciclina mesmo em concentrações antimicrobianas inibiu uma variedade de MMPs, inclusive a MMP-2 (Delano; Schmid-Schonbein, 2008). Trabalhos realizados em modelo de hipertensão renovascular (2R-1C) mostraram também que a doxiciclina atenuou a pressão arterial e a atividade de MMP-2 (Castro et al., 2008). Além disso, outros estudos mostraram que

a doxiciclina tem efeitos anti-hipertensivos (Bouvet et al., 2005; Hao et al., 2004; Rizzi et al., 2009).

4- Modelo Experimental: Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR)

Diferentes modelos experimentais de hipertensão foram desenvolvidos em animais, como o modelo de hipertensão renovascular (Goldblatt, 1958) e o modelo de administração crônica de L-NAME (Bouvet et al., 2005). Os SHR (ratos espontaneamente hipertensos) foram desenvolvidos no Japão por endogamia seletiva da linhagem Wistar-Kyoto (WKy) que apresentaram elevada pressão arterial sistólica (Okamoto; Aoki, 1963).

Este modelo é comumente proposto para estudos por apresentar elevada pressão arterial e muitas outras alterações cardiovasculares observadas em pacientes humanos hipertensos (Folkow, 1982; Frohlich, 1986).

Recentemente, foi demonstrado que ratos SHR apresentam complicações cardiovasculares que acompanham a hipertensão assim como níveis elevados de atividade proteolítica no cérebro, coração e vasos (Camp et al., 2003; Delano; Schmid-Schonbein, 2008; Tram et al., 2010).

HIPÓTESE

HIPÓTESE

Levando-se em consideração que:

1- o aumento da pressão arterial está relacionado com aumento da concentração de MMP-2 em aortas de ratos com hipertensão renovascular (2R-1C) e em ratos com hipertensão induzida por L-NAME.

2- EROs e MMPs estão aumentadas no processo de remodelamento vascular;

3- doxiciclina inibe MMPs e tem efeitos anti-hipertensivos;

formulamos as seguintes hipóteses:

1- em SHR haveria aumento da atividade de MMPs em aortas associada a hipertrofia vascular; 2- a doxiciclina previne aumento da atividade de MMPs e a hipertrofia vascular em SHR, 3- a doxiciclina, diminuição da pressão arterial em SHR comparados com SHR não tratados

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- 1- Comparar a espessura das aortas, a atividade gelatinolítica total, a expressão de MMP-2 e atividade de EROs em SHR e controles.
- 2- Verificar se o efeito da doxiciclina diminui a pressão arterial sistólica em SHR.
- 3- Verificar se o efeito da doxiciclina diminui a hipertrofia de aortas em SHR.
- 4- Verificar se o efeito da doxiciclina diminui a atividade gelatinolítica total e a quantidade e/ou atividade de MMP-2 na aorta de SHR.
- 5- Verificar se o efeito da doxiciclina diminui a atividade de EROs em SHR.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Considerações Gerais

Os experimentos foram realizados com ratos machos SHR, com oito semanas de vida, provenientes do Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP), sendo a cepa original da Taconics Pharm. Inc. Germantown, NY e ratos machos Wistar-Kyoto com oito semanas de vida, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (USP), em salas com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada (22-25°C) e livre acesso à água e ração. Esse estudo foi previamente aprovado pelo comitê de ética dessa Universidade (Protocolo nº 09.1.1097.53.9)

1.1 - Grupos Experimentais

SHR + Doxíciclina: modelo de animais hipertensos (PAS > 180 mmHg) que receberam doxíciclina (Sigma, Aldrich), na dose de 30 mg/kg/dia: administração de 1,0 ml da droga em solução aquosa, por via oral (gavagem) (n=16);

SHR: modelo de animais com hipertensão moderada que receberam água filtrada, por via oral (gavagem) (n=16);

Controle (WKy) + Doxíciclina: animais normotensos que receberam doxíciclina (Sigma, Aldrich), na dose de 30 mg/kg/dia: administração de 1,0 ml da droga em solução aquosa, por via oral (gavagem) (n=16);

Controle (WKy): animais normotensos que receberam água filtrada, por via oral (gavagem) (n=16).

A escolha das doses das drogas foi baseada em estudos prévios em modelos de animais de hipertensão, que mostraram que esta dose de doxíciclina foi eficiente em inibir não seletivamente, a atividade das MMPs *in vivo* (Bouvet et al., 2005; Castro et al., 2008).

2 – Materiais

2.1 - Soluções utilizadas nos experimentos

- Paraformaldeído (PFA) 4% v/v tamponado;
- Hematoxilina e Eosina (H&E);
- 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 CaCl₂.
- Albumina sérica bovina (BSA), 8 mg/mL;
- Reagente de Bradford;
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) 12%, co-polimerizado com gelatina (1 mg/mL);
- 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;
 - Solução de TritonX-100 a 2%;
 - Solução de Agarose 3%;
 - Persulfato de Amônio (APS) 10%;
 - TEMED (tetrametil etilenodiamina);
 - Solução de acrilamida 30% e bisacrilamida (0,8%);
 - Solução de coloração: Coomassie Brilliant Blue G-250 0,05%;
 - Solução fixadora e de descoloração: Metanol 30% e Ácido acético 10%;
 - Solução tampão de Tris-CaCl₂ (Tris 50 mmol/L, CaCl₂ 10 mmol/L, ZnCl₂ 1 µmol/L);
 - Solução de DQ Gelatin 5 µg/mL (Molecular Probes, Oregon, USA)
 - DHE (dihidroetídio) 10 µmol/L
 - PBS (tampão salina fosfato);
 - Anticorpo monoclonal: 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);
- Os demais reagentes não especificados foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.2 - Droga administrada diretamente nos animais

- Doxíciclina 30 mg/kg/dia (Sigma, Aldrich) (Aldactone[®]; Pfizer), administração de 1,0 ml da droga em solução aquosa, por via oral (gavagem);

2.3 - Equipamentos utilizados nos experimentos

- Balança de precisão (Shimadzu AY220), pHmetro (Incibrás) e centrífuga refrigerada (CELM – 3 plus);
- Transdutor de pressão acoplado a um manguito (MTL125R pulse transducer/pressure cuff; Castle Hill, Austrália);
- Micrótopo (Leica RM2025) e criostato (CM 1900; Leica, Alemanha);
- Microscópio de luz branca e fluorescência (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado a câmera fotográfica;
- Espectrofotômetro;
- Fonte de eletroforese (Electrophoresis Power Supply – EPS 301);
- Sistema de documentação de eletroforese Kodak (Kodak, Rochester, NY);
- Espectrofluorímetro (Gemini EM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA);
- Luminômetro marca Berthold 9505 (EG&G Instruments GmbH, Munich, Germany).

2.4 - Programas de aquisição de dados

- PowerLab 4/S analog-to-digital converter (AD Instruments Ltd., Castle Hill, Australia);
- Summit for ACQUIRE e Data viewer (Gould Instruments Systems);
- ImageJ Program (NIH – National Institutes of Health);
- Analysis System (EDAS) 290 (Kodak, Rochester, NY);
- KCJunior e SoftMax Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA);
- SigmaStat for Windows (Jandel Scientific, USA).

3 – Metodologia

3.1 - Parâmetros hemodinâmicos

3.1.1 - Avaliação da pressão arterial sistólica (PAS) e peso corporal

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

3.2 - Parâmetros estruturais

3.2.1 - Análise morfológica da aorta

Ao final da quinta 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) 4%, por 24 horas. Após a fixação, as aortas foram desidratadas em diferentes concentrações de álcool (70%; 80%, 96%,

absoluto 1, absoluto 2) inseridas em parafina e cortadas transversalmente em um micrótomo (Leica RM2025), a uma espessura de quatro micrômetros. Esses cortes foram feitos em lâmina de vidro e colocados sobre 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 (CSA), diâmetro interno e externo (DI e DE, respectivamente), 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 câmera fotográfica. Essas imagens foram captadas pelo programa Leica IM50, em um 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, conseguiu-se determinar a CSA ($A_e - A_i$), o DI (raiz quadrada de $4A_i/\pi$), o DE (raiz quadrada de $4A_e/\pi$), a média ($(DE-DI)/2$) e a razão M/L ($2 \times \text{Média}/DI$) (Dao et al., 2001). 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 artigo publicado por Dao e colaboradores, em 2001 (Dao et al., 2001).

3.3 - Parâmetros bioquímicos e moleculares

3.3.1 - Determinação de espécies reativas de oxigênio vasculares

3.3.1.A - EROs *in situ*

As concentrações vasculares de EROs foram analisadas, *in situ*, na camada média das aortas, utilizando dihidroetídeo (DHE) na concentração de 10 µg/mL (Hao et al., 2006; Viel et al., 2008). Esse “probe” reage com o O₂⁻ presente nos tecidos, resultando na formação de 2-hidroetídeo e de etídeo, produtos que emitem fluorescência vermelha no local. Os tecidos foram congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), utilizando acetona e gelo seco. Foram feitos cortes com 4 µm de espessura em criostato, e incubados com DHE por 30 minutos em câmara úmida e escura. Após a incubação, os cortes foram lavados com tampão salina fosfato (PBS) e fixados em PFA 4%. Com auxílio de microscópio de fluorescência (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado a câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram fotografadas em aumento de 400x. A quantificação da intensidade de fluorescência vermelha emitida foi realizada pelo programa ImageJ.

3.3.2 - Determinação dos níveis de MMP-2 por zimografia em gel

A técnica de zimografia é muito utilizado para determinação dos níveis de MMPs no plasma e amostras de tecidos biológicos (Gerlach et al., 2005; Souza-Tarla et al., 2005; Gerlach et al., 2007). No caso de zimografia de tecidos, é preciso

determinar a quantidade de proteína presente em cada amostra, para aplicar no gel a mesma quantidade de proteína por amostra, pois variações protéicas entre uma e outra podem interferir nos resultados finais desse método.

3.3.2.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 (CaCl₂ 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 µL do tampão. Após 16 horas, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos e os sobrenadantes foram removidos para determinação protéica. A curva padrão foi realizada com albumina do soro bovino (BSA) diluído 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 para cada amostra analisada. A coloração azul desenvolvida no contato com as proteínas pode ser quantificada em espectrofotômetro de luz visível (595 nm). A intensidade da cor varia de acordo com a quantidade de proteína presente na amostra. Para cada 5 µL de amostra foi adicionado 250 µL de reagente de Bradford. Pelos valores obtidos após a leitura, em µg/µL, foi possível aplicar 30 µg de proteína por poço do gel.

3.3.2.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 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 CaCl₂ 50 mM, por 18 horas, a 37 °C. Posteriormente, foram fixados e corados em solução Coomassie Blue 0,05% por 4 horas. Para a visualização das bandas referentes às MMPs os géis foram descorados com metanol a 30% e ácido acético a 10%. Observamos 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, podendo compará-los entre si. As bandas da MMP-2 foram quantificadas pelo 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. Elas foram inibidas por fenantrolina, mas não por outros inibidores de proteases.

3.3.3 - Determinação da atividade gelatinolítica por zimografia *In situ*

Esse método reflete a atividade *in situ* das MMP-s e não seus níveis como a zimografia convencional. Esse método permite a quantificação dessa atividade diretamente no tecido (Galís et al., 1995). Para essa análise utilizou-se DQ gelatin (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA) na concentração de 1,0 µg/mL em

tampão Tris-CaCl₂ 50 mM. Os tecidos foram congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), utilizando acetona e gelo seco. Eles foram cortados em criostato, em seguimentos de 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 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. 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.

3.3.4 - 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 uma hora, 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 uma hora 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 a 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 apresentam coloração amarela.

4 - Análise estatística

Os resultados obtidos nesse estudo foram analisados com 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 com média \pm erro padrão da média (EPM).

RESULTADOS

RESULTADOS

1 - Efeito da doxiciclina sobre a pressão arterial sistólica e peso corporal em ratos SHR

A pressão arterial foi avaliada por seis semanas por meio de pletismografia de cauda. O peso corporal dos animais também foi acompanhado durante este período.

Os valores basais de pressão arterial sistólica e peso corporal foram diferentes nos grupos experimentais controles e hipertensos (Figura 4A e 4B). Não foram observadas mudanças significativas do tratamento com doxiciclina sobre a pressão nos grupos controles. Porém, como podemos observar no gráfico, a partir da terceira semana o tratamento com doxiciclina resultou na diminuição da pressão nos animais hipertensos ($p < 0,05$), sem alterar a pressão nos animais controles ($p > 0,05$). Foram observadas diferenças significativas no peso corporal entre os grupos experimentais controles e hipertensos (Figura 4B; $p < 0,05$).

A

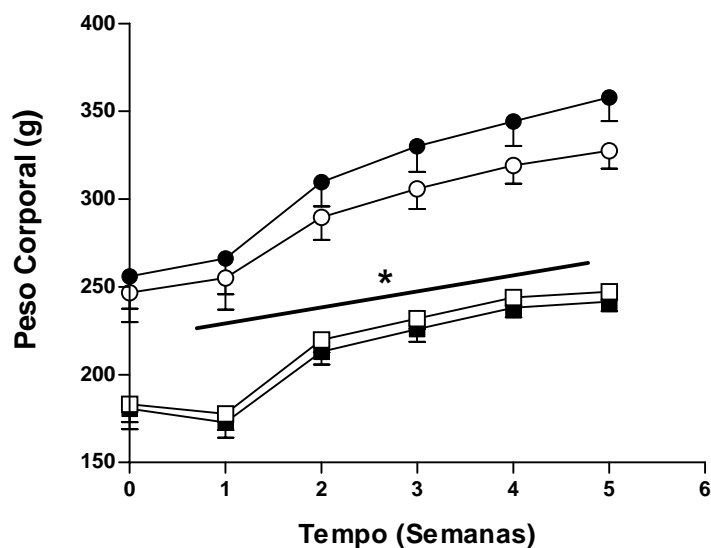
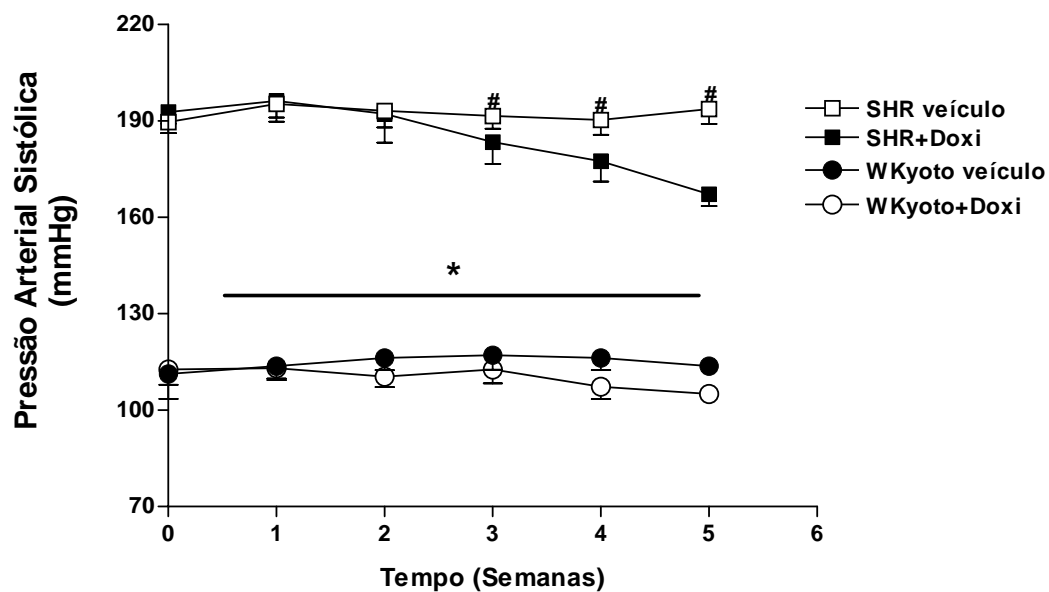


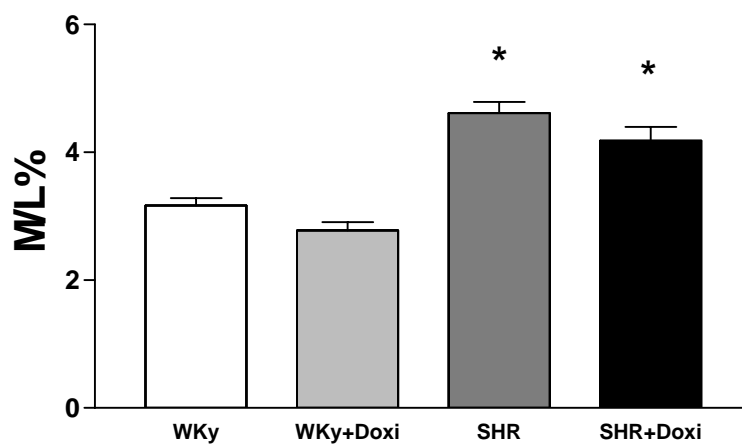
Figura 4: Efeito da doxiciclina sobre a pressão arterial e o peso corporal. Evolução da pressão arterial sistólica em mmHg (A) e do peso corporal (B). Valores expressos como média \pm EPM (n=16/grupo) *p<0,05 para SHR versus WKyoto. #p<0,05 para SHR+veículo versus SHR+doxiciclina.

2 - Efeitos da doxiciclina sobre o remodelamento vascular em ratos SHR

Como pode ser observado (Figura 5) houve um aumento significativo tanto da razão M/L quanto na área de secção transversal (CSA) nas aortas dos animais hipertensos em relação aos animais controle ($p < 0,05$). Estas alterações foram relacionadas principalmente a um aumento da camada média destas artérias, é conhecido como remodelamento vascular hipertrófico. Foi observado também o aumento do diâmetro externo (DE) e do diâmetro interno (DI) nas aortas dos animais hipertensos em relação aos controles (Figura 5C e 5D; $p < 0,05$). O tratamento com doxiciclina não reverteu estas alterações estruturais (Figura 5A; 5B; 5C; e 5D).

Neste remodelamento pode-se observar nos animais SHR que ocorreu um aumento da proliferação de células musculares lisas, como apresentado nas figuras 6. Houve um pequeno aumento significativo nos animais hipertensos em relação aos controles ($p < 0,05$).

A



B

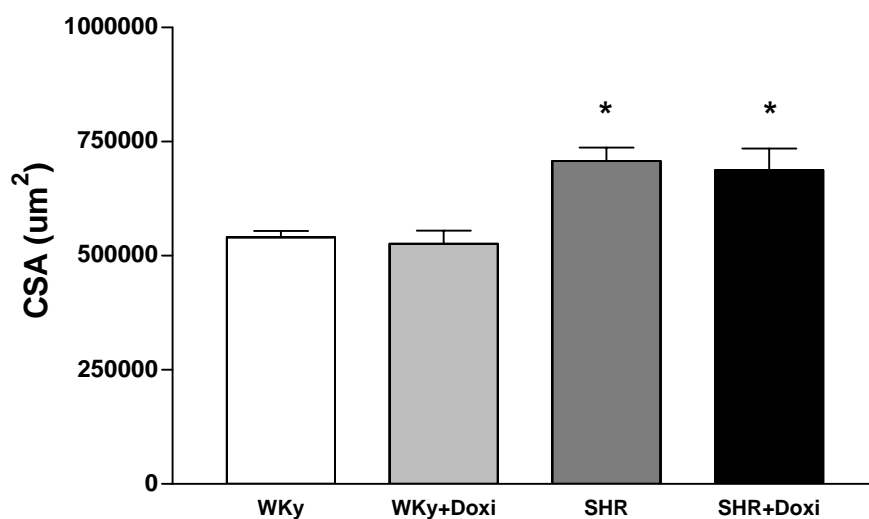
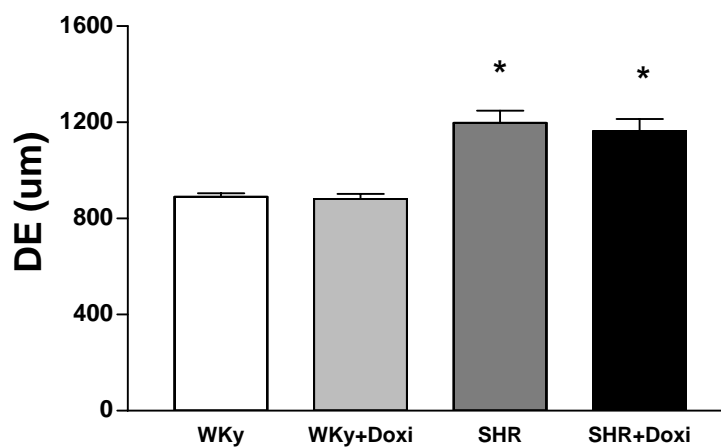


Figura 5: Efeito da doxiciclina sobre as alterações estruturais da aorta associadas à hipertensão. (A) Gráfico representativo da razão média/lúmen (M/L). (B) Gráfico representativo da área de secção transversal do corte (CSA), em μm^2 . Os dados estão representados como média \pm EPM (n=7/grupo). *p<0,05 Hipertensos versus Controles.

C



D

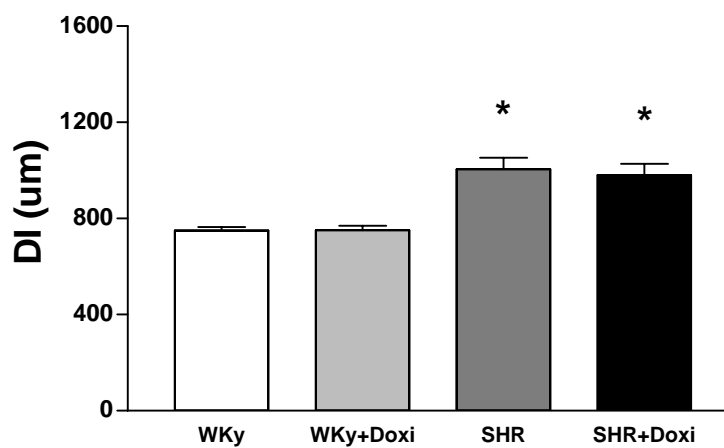


Figura 5: Efeito da doxiciclina sobre as alterações estruturais da aorta associadas à hipertensão. Gráfico representativo do diâmetro externo (DE) (C) e do diâmetro interno (DI) (D). Os dados estão representados como média \pm EPM (n=7/grupo). *p<0,05 Hipertensos versus Controles.

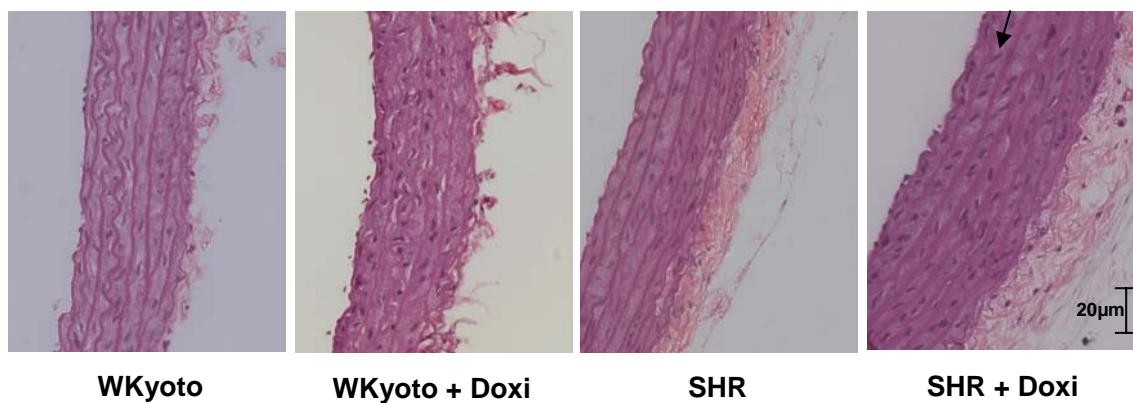
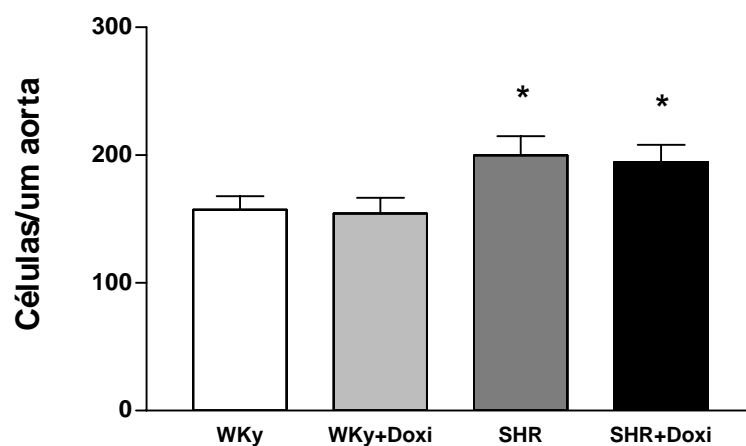
A**B**

Figura 6: Efeito da doxiciclina sobre a proliferação de células musculares lisas. (A) Imagens ilustrativas, em 400x, da quantidade de núcleos da camada média das aortas, referentes aos quatro grupos experimentais. (B) Representação gráfica do número de células musculares lisas por µm de aorta. Os dados estão representados como média ± EPM (n=7/grupo). *p<0,05 Hipertensos versus Controles.

3 – Efeitos da doxíciclina sobre as concentrações vasculares de MMP-2 em ratos SHR

Para avaliar os efeitos da doxíciclina sobre as concentrações vasculares da MMP-2 foi utilizado método convencional de zimografia em gel. A Figura 7A mostra gel representativo dos extratos de aorta referentes aos quatro grupos experimentais. As bandas da MMP-2 foram representadas pelos seus pesos moleculares: 75; 72 e 64 KDa.

As aortas dos ratos SHR mostram valores mais altos das três formas de MMP-2 (75 kDa, 72 kDa e 64 kDa), atividade gelatinolítica total, comparada com os grupos controle. Porém não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p>0,05$; Figura 7B). E o tratamento com doxíciclina não levou a uma mudança estatisticamente significativa nos valores obtidos de MMP-2 total nos animais hipertensos tratados ($p>0,05$; Figura 7B).

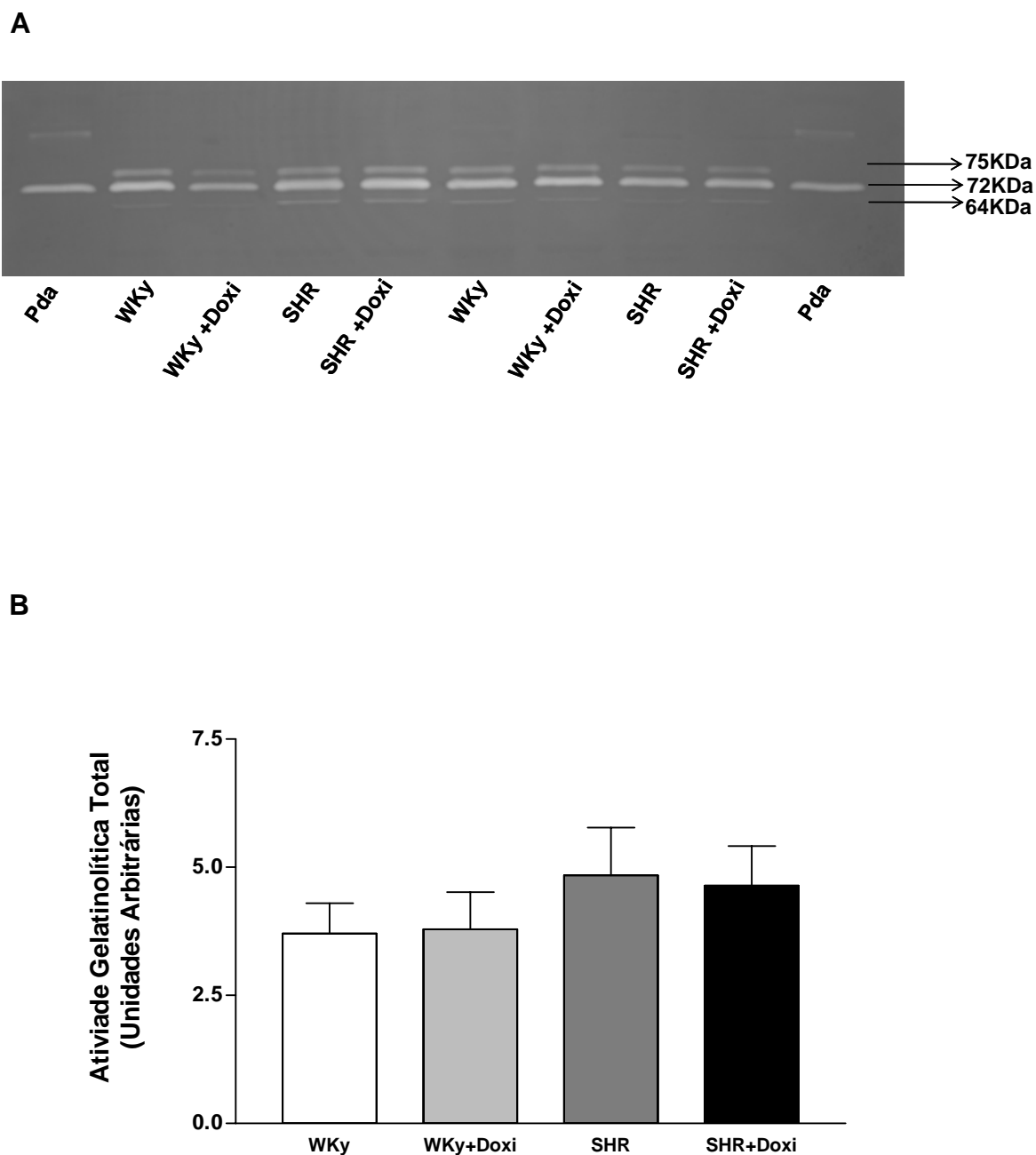


Figura 7: (A) Gel representativo dos extratos de aorta dos animais dos quatro grupos experimentais. As formas pro e ativa da MMP-2, estão indicadas no gel pelas bandas de 72 e 64 KDa, respectivamente. (B) Representação gráfica da atividade gelatinolítica total das concentrações vasculares da MMP-2. Os dados estão representados como média \pm EPM ($n=12/\text{grupo}$) $p>0,05$.

4 – Efeitos da doxíciclina sobre a atividade gelatinolítica *in situ* e presença de MMP-2 localizada no tecido por imunomarcção

Para verificar se há um aumento na atividade gelatinolítica dessas enzimas realizou-se o ensaio de zimografia *in situ*. Diferente da zimografia em gel, este método reflete a atividade gelatinolítica total diretamente nos tecidos. A quantificação é feita a partir dos valores da intensidade de fluorescência verde na camada média e endotélio das aortas dos animais (a atividade gelatinolítica aumenta à medida que ocorre a proteólise do substrato, a DQ-Gelatin). O uso de inibidores das diferentes classes de proteases permite saber qual é a principal classe de proteases responsável pela atividade gelatinolítica encontrada no tecido.

O grupo hipertenso não tratado apresentou maior intensidade de fluorescência verde comparado aos grupos controle ($p < 0.05$; Figura 8A). O tratamento dos animais hipertensos com doxíciclina resultou em menor atividade gelatinolítica (Figura 8B). Do ponto de vista morfológico, ficou evidente que a atividade gelatinolítica mais intensa se restringiu às camadas íntimas e médias das aortas, praticamente não sendo vista na adventícia.

Para verificar se havia co-localização da atividade gelatinolítica com a presença da MMP-2 no tecido, realizaram-se a imunomarcção das amostras de aorta com anticorpo anti-MMP-2 e as imagens foram sobrepostas. De modo geral, a MMP-2 só foi observada na camada adventícia dos controles e dos animais SHR-doxi. Entretanto, o grupo SHR apresentou além da MMP-2 expressa na adventícia, níveis variáveis de MMP-2 na camada íntima e nas lâminas mais internas da camada média. A foto de uma lâmina do grupo SHR apresentada na Figura 8 é bastante representativa do que foi visto em todo o grupo. É importante ressaltar que

mesmo no grupo SHR a camada adventícia apresentou uma marcação muito mais forte do que a camada média ou íntima para MMP-2. Neste grupo não foi detectada imunomarcção para MMP-2 nas lâminas mais externas da média. Portanto, de modo geral não houve co-localização entre a atividade gelatinolítica no tecido e a expressão de MMP-2, exceção feita às camadas íntima e lâmina mais internas da média dos animais SHR.

Além disso, realizou-se a quantificação da expressão da MMP-2 pela intensidade de fluorescência vermelha emitida no ensaio (Figura 8A). Os animais SHR+veículo apresentaram maiores níveis de MMP-2 em comparação aos animais controle ($p < 0.05$; Figura 8C), os animais hipertensos tratados com doxiciclina apresentaram níveis reduzidos de MMP-2 em comparação aos animais não tratados ($p < 0,05$). A atividade das MMPs foi significativamente aumentada no grupo SHR+veículo quando comparada aos demais grupos ($p < 0,05$; Figura 8 B).

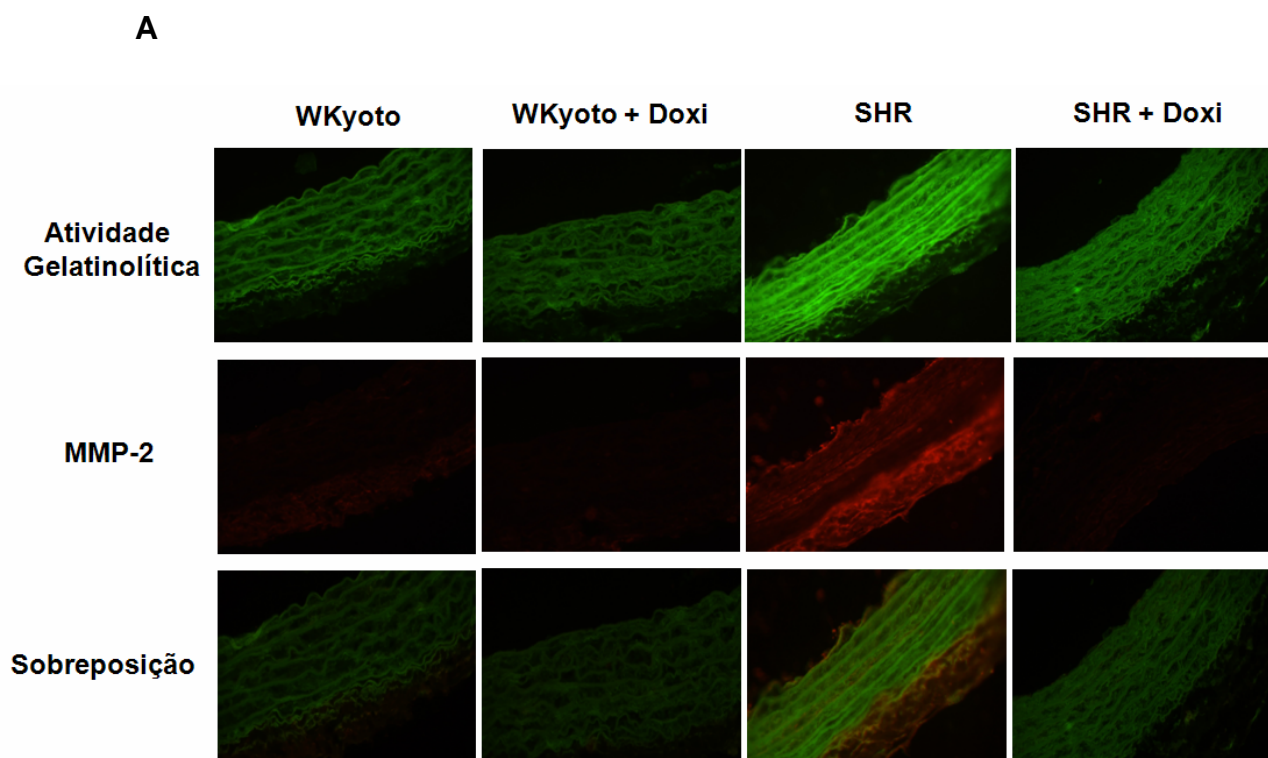


Figura 8: (A) Efeito da doxiciclina sobre a atividade gelatinolítica *in situ* e expressão da MMP-2 (por imuno-localização) nas aortas. Fotografias representativas das lâminas incubadas com DQ gelatin antes da fixação (atividade gelatinolítica), e incubadas com anticorpo anti-MMP-2 após a fixação, seguindo-se a sobreposição das imagens (fotografado em 400x).

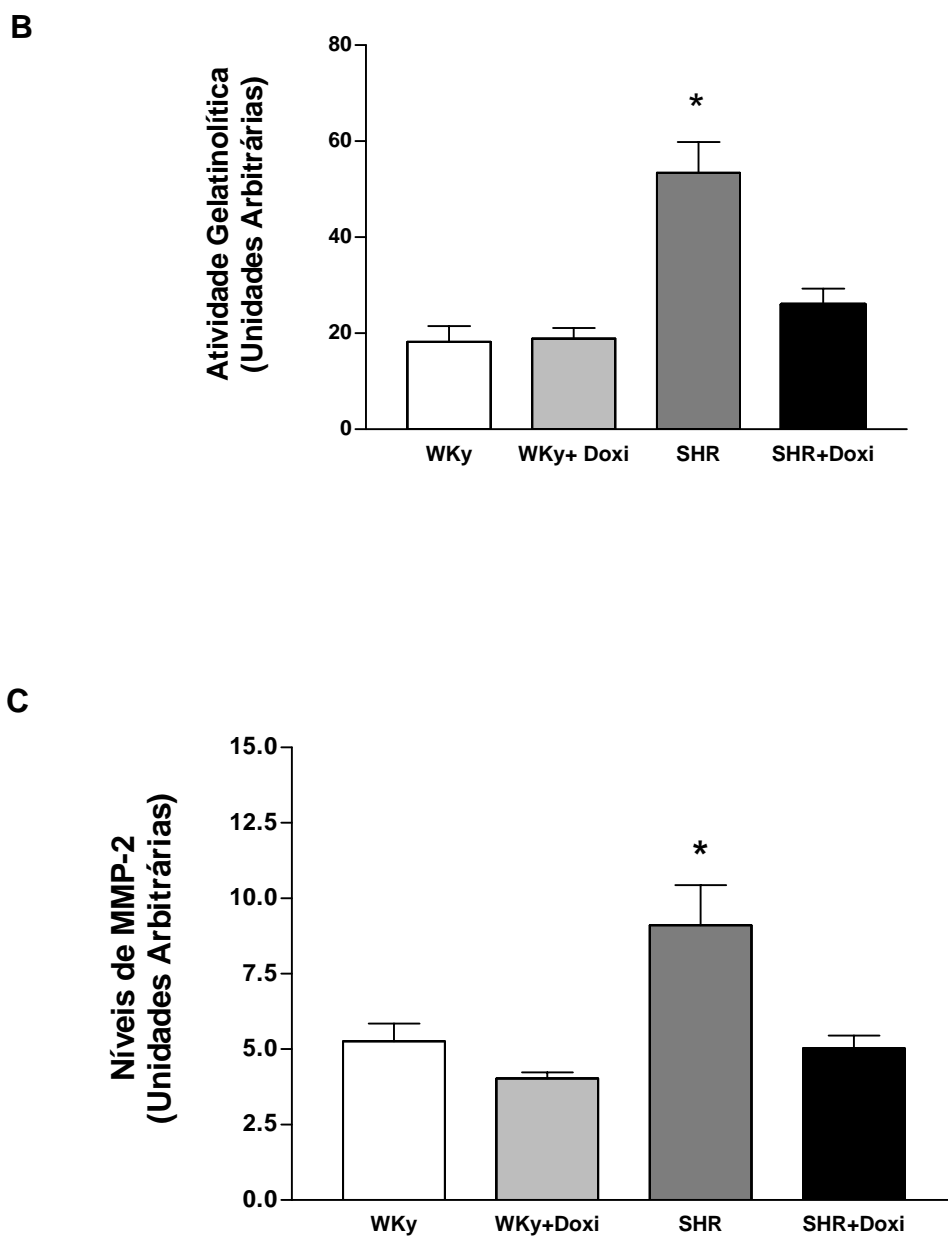


Figura 8: (B) Atividade gelatinolítica na camada média e endotélio das aortas dos animais quantificada pela intensidade de fluorescência verde nas lâminas de zimografia *in situ* (n=6/grupo). (C) Níveis de MMP-2, também avaliados na camada média e endotélio, a partir da intensidade de fluorescência vermelha (n=6/grupo). Valores expressos como média± EPM. *p<0,05 para SHR+veículo *versus* os outros três grupos.

5 - Efeitos da doxíciclina sobre as concentrações vasculares de EROs

Na Figura 9 observa-se que há um aumento nos níveis de EROs na camada média e endotélio das aortas dos animais hipertensos em relação aos controles, observado pela intensidade de fluorescência vermelha produzida na reação do DHE com O_2^- ($p < 0,05$; Figura 9A e 9B). Este aumento foi atenuado pelo tratamento com doxíciclina ($p < 0,05$).

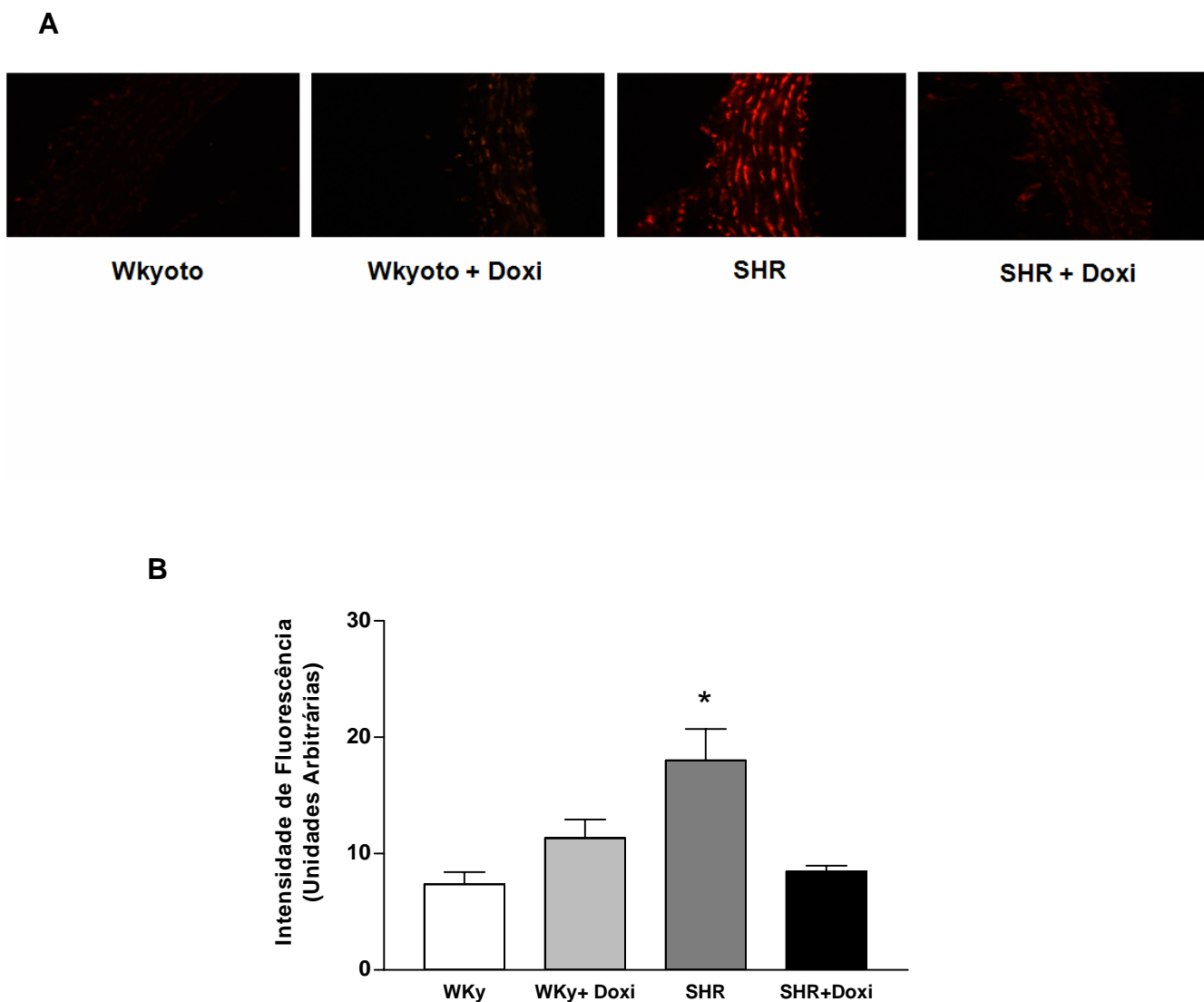


Figura 9: Efeito da doxiciclina sobre a produção vascular de EROs. (A) Fotografias representativas de aortas 400x, incubadas com DHE. (B) Representação gráfica da intensidade de fluorescência vermelha dos produtos da reação do DHE com O_2^- . Valores expressos como média \pm EPM (n=6/grupo) *p<0,05 para SHR+veículo *versus* os três outros grupos.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A hipertensão arterial é classificada como uma condição multifatorial e está relacionada a alterações morfológicas e funcionais no aparelho cardiovascular que são importantes para a manutenção e para o desenvolvimento e progressão de doenças cardiovasculares (Lassegue; Griending, 2004). Dentre vários fatores associados à hipertensão, o aumento da atividade de algumas enzimas, como as MMPs pode estar amplamente relacionado com às alterações cardiovasculares observadas (Galis; Khatri 2002; Lehoux et al. 2004; Raffetto; Khalil, 2008; Spinale, 2007; Lopez et al., 2004). Neste estudo, foi avaliada a hipótese de haver aumento da atividade gelatinolítica, particularmente da MMP-2, em aortas de ratos SHR, além de observarmos o efeito do tratamento com doxiciclina nos seguintes parâmetros: peso corporal, pressão arterial sistólica, alterações morfológicas das aortas e quantidade de espécies reativas de oxigênio nas aortas.

Para comparar a espessura das aortas, a atividade gelatinolítica total, a expressão de MMP-2 e atividade de EROs em SHR e ratos controles do nosso estudo tratados ou não com doxiciclina (inibidor não seletivo de MMPs). Estudos anteriores mostraram que a dose de 30mg/kg/dia de doxiciclina diminui a atividade das MMPs de forma independente de seus efeitos antibióticos (Golub et al., 1998; Lee et al., 2004). A doxiciclina pode inibir as MMPs por ser um quelante de zinco e cálcio que são fundamentais para a atividade das MMPs. Além disso, a doxiciclina também pode interagir com o zinco no sítio ativo da enzima deixando a enzima inativa (Garcia et al., 2005).

Neste trabalho, observou-se que o tratamento dos animais hipertensos com doxiciclina produziu uma diminuição da pressão arterial sistólica nos animais hipertensos. Possivelmente este estudo esteja associado a diminuição da atividade gelatinolítica e do estresse oxidativo também observado nestes animais. Este efeito anti-hipertensivo também foi demonstrado em outros estudos com administração de doxiciclina (30mg/kg/dia) inferior ao usado no nosso estudo (19,2mg/kg/dia) por via intraperitoneal em animais SHR de sete semanas de vida (Hao et al., 2004).

Como descrito anteriormente, as metaloproteinases podem promover a degradação de várias proteínas da matriz extracelular participando ativamente do processo de remodelamento tecidual (Page-McCaw et al., 2007). Desse modo, podem promover alterações como remodelamento vascular, que ocorre nos vasos sanguíneos em resposta às alterações hemodinâmica crônicas (Galis; Khatri, 2002).

Nosso estudo mostrou que, a administração de doxiciclina nos animais hipertensos reduziu a PAS, porém este efeito não foi associado a alterações na estrutura vascular. Isto foi evidenciado por um aumento do CSA e da razão M/L nos animais hipertensos e que não apresentaram uma diminuição destas alterações estruturais quando tratados com doxiciclina. Grande parte do espessamento da camada média observada nas aortas dos SHR pode ter ocorrido como conseqüente de uma hiperplasia de células musculares lisas. Isto porque, proporcionalmente ao aumento do CSA, houve também um aumento da proliferação celular. Em estudos com ratos tratados com L-NAME, a doxiciclina não modificou a evolução do processo de remodelação eutrófico (Bouvet et al., 2005). Resultados semelhantes foram observados no estudo realizado com ratos stroke-prone SHR (SHRSP) tratados com antioxidantes, em que não houve a diminuição no espessamento da camada média arterial (Contard et al., 1993). Entretanto outros estudos com

modelos animais de hipertensão (2R-1C; WKyoto induzidos a hipertensão; SHR) mostraram efeitos vasculares benéficos causados pelo tratamento com doxiciclina, antioxidantes (Castro et al., 2008; Mougnot et al., 2005; Hu et al., 2008; Pauletto et al., 1994; Vasdev et al., 2003). É provável que estas contradições se devam a diferenças entre os modelos animais de hipertensão utilizados.

Como pode ser observado nos resultados bioquímicos (métodos de zimografia em gel, zimografia *in situ* e imunofluorescência para MMP-2), mostraram um aumento na expressão vascular dessa enzima nos animais hipertensos. Para avaliar os efeitos da doxiciclina sobre esta atividade foi utilizado método da zimografia convencional. A atividade gelatinolítica total na zimografia em gel mostrou que há um aumento neste modelo animal, porém esta atividade não foi reduzida pela administração da doxiciclina.

Para verificar se houve um aumento destas enzimas, realizou-se o ensaio de zimografia *in situ*. Diferente da zimografia em gel, este método reflete a atividade gelatinolítica total diretamente nos tecidos (Lalu et al., 2006). A quantificação foi feita a partir dos valores da intensidade de fluorescência verde na camada média e endotélio das aortas dos animais, a fluorescência verde reflete a atividade enzimática via degradação do substrato, a gelatina, resultando no fluoróforo, protocolo utilizado em outros estudos com modelos animais de hipertensão (Castro et al. 2008; Ceron et al. 2010; Castro et al., 2010).

O grupo hipertenso não tratado apresentou maior intensidade de fluorescência verde comparado aos grupos controle, indicando maior atividade proteolítica. O tratamento dos animais hipertensos com doxiciclina resultou na diminuição desta atividade. Do ponto de vista morfológico, ficou evidente que a

atividade gelatinolítica mais intensa se restringiu às camadas íntimas e médias das aortas, praticamente quase não sendo vista na adventícia.

Além da determinação da atividade gelatinolítica *in situ*, foi verificado se havia co-localização desta atividade com a presença da MMP-2. Para isto, foi realizado a imunomarcação das amostras de aorta com anticorpo anti-MMP-2. A quantificação da expressão da MMP-2 foi feita a partir da intensidade de fluorescência vermelha emitida no ensaio (Galis et al., 1995; Ceron et al. 2010; Castro et al., 2010). Em seguida as imagens foram sobrepostas. De modo geral, a MMP-2 só foi observada na camada adventícia dos controles e dos animais SHR tratados. Entretanto, o grupo SHR apresentou além da MMP-2 expressa na adventícia, níveis variáveis de MMP-2 na camada íntima e nas lâminas mais internas da camada média. É importante ressaltar que mesmo no grupo SHR a camada adventícia apresentou uma marcação muito mais forte do que a camada média ou íntima para MMP-2. Neste grupo não foi detectada imunomarcação para MMP-2 nas lâminas mais externas da média. Portanto, de modo geral, não houve co-localização entre a atividade gelatinolítica no tecido e a expressão de MMP-2, exceção feita às camadas íntima e lâmina mais internas da média dos animais SHR.

Os animais SHR apresentaram maiores níveis de MMP-2 em comparação aos animais controle, os animais hipertensos tratados com doxiciclina apresentaram níveis reduzidos de MMP-2 em comparação aos animais não tratados.

A atividade das MMPs (observada como atividade gelatinolítica total não passível de inibição por phenatrolina ou doxiciclina, que são inibidores da classe das metaloproteases) foi significativamente aumentada no grupo SHR quando comparada aos demais grupos, e este aumento não parece (morfologicamente) ser

diretamente correlacionado com a expressão unicamente da MMP-2. Portanto, provavelmente outras MMPs também estejam aumentadas nas aortas de ratos SHR e participem das disfunções vasculares associadas à hipertensão nestes animais SHR.

O tratamento com doxiciclina também tem ação sobre outras MMPs, o que explicaria a quase supressão da atividade gelatinolítica vista pela zimografia *in situ* nos animais tratados. O aumento da atividade gelatinolítica pode decorrer da ativação direta de MMPs por EROs ou pela inativação dos TIMPs por estas.

Por isso, outro parâmetro foi avaliado, o estresse oxidativo. Como já citado, fisiologicamente existe um equilíbrio entre a ativação e a inativação das MMPs pelos TIMPs, inibidores endógenos das MMPs (Visse; Nagase, 2003). Porém, o mecanismo responsável pelo aumento da atividade gelatinolítica nos ratos SHR ainda não está claro. Como citado na introdução, EROs pode levar a várias alterações vasculares observadas na hipertensão, dentre elas o processo de remodelamento vascular, podem aumentar a atividade das MMPs indiretamente, aumentando as concentrações de MMPs, e diretamente, ativando MMPs (Visse; Nagase, 2003; Kandasamy et al., 2009; Luchtefeld et al., 2005; Castro et al., 2009; Schulz, 2009; Rajagopalan et al., 1996; Siwik et al., 2001; Martinez et al., 2006; Lu et al., 2008) Como descrito, a capacidade de inibição das MMPs pelos TIMPs pode ser perdida na presença dos EROs, como ONOO⁻ ou HOCl (Frears et al., 1996; Brown, 2008; Donnini et al., 2008), assim favorecendo um aumento na atividade das MMPs quando EROs está aumentado. Consequentemente, mesmo se as concentrações de TIMPs estiverem aumentadas na hipertensão contrabalançando o aumento na atividade das MMPs, não seria possível saber se estes inibidores teciduais seriam capazes de inibir as MMPs, por que EROs aumentado pode

diminuir sua capacidade de inibição mesmo não diminuindo a concentração destes inibidores (Frears et al., 1996; Brown, 2008). Isto sugere que estresse oxidativo poderia contribuir para a ativação das MMPs e as disfunções vasculares associadas à hipertensão SHR.

Observamos um aumento nos níveis de EROs na camada média e endotélio das aortas, o que sugere que grande parte da atividade gelatinolítica observada nos animais hipertensos pode ser decorrente deste aumento de EROs. O tratamento com doxiciclina pode ter produzido efeitos antioxidantes por diminuir a produção do ânion superóxido *in situ*, observada pelo método de DHE, estes mesmos resultados foram observados em outros modelos experimentais de hipertensão (Castro et al., 2008; Ceron et al., 2010). Esta diminuição de EROs pelo tratamento com doxiciclina acompanhada da redução nos níveis e atividade gelatinolítica sugere que a doxiciclina apresenta mecanismos antioxidantes que podem ter efeitos que regulam a atividade da MMP-2. Entretanto, esta afirmação é bastante especulativa e precisa ser adequadamente testada.

Embora o tratamento com doxiciclina não tenha afetado as concentrações de MMP-2 no extrato de aorta (zimografia em gel), tem sido descrito que EROs podem ativar MMPs mesmo na presença do propeptídeo. Como já descrito, estresse oxidativo pode interagir com o grupo tiol presente no propeptídeo e com o zinco presente no domínio catalítico, assim resultando na ativação da enzima mesmo na presença do propeptídeo (Okamoto et al., 2001; Schulz, 2007; Viappiani et al., 2009).

Estes resultados são confirmados por estudos anteriores, em que a doxiciclina preveniu o aumento da atividade gelatinolítica, particularmente da MMP-

2, neste e em outros modelos de hipertensão (Castro et al., 2009; Delano et al., 2008; Bouvet et al, 2005).

Este trabalho mostrou alguns aspectos bioquímicos e morfológicos interessantes sobre o que ocorre nas aortas de ratos SHR com oito semanas de vida no início do tratamento a treze semanas de vida no final do tratamento e qual o efeito que a administração de doxiciclina (30mg/Kg/dia) por cinco semanas tem sobre estes aspectos.

CONCLUSÃO

CONCLUSÕES

Os animais SHR de oito semanas no início do tratamento e de treze semanas no final do tratamento apresentam hipertrofia da aorta (caracterizada pelo aumento da razão Média/Lúmen e Área de Secção Transversal), além de atividade gelatinolítica total e EROs aumentados em toda a camada média e íntima das aortas, e aumento da MMP-2 na camada íntima e porção mais interna da média em relação a controles WKyoto de mesma idade.

O tratamento com doxiciclina (30mg/Kg/dia) leva à diminuição da pressão arterial sistólica, diminuição da atividade gelatinolítica total e EROs na camada média e íntima das aortas, diminuição da MMP-2 na camada íntima e porção mais interna da média em relação aos ratos SHR tratados com veículo.

O tratamento com doxiciclina não afetou a expressão e atividade de MMP-2 vista por zimografia em gel, nem a expressão de MMP-2 na camada adventícia das aortas, onde ela é mais intensa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bode, W. e K. Maskos. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. Biol Chem, v.384, n.6, p.863-72. 2003.

Bouvet C., Gilbert L. A. et al. Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition. Hypertension, v. 45, n. 3, p. 432–7, 2005.

Brown, N. J. Aldosterone and vascular inflammation. Hypertension, v. 51, n. 2, p. 161-167, 2008.

Camp T M, Smiley L M, Hayden M R, Tyagi S C. Mechanism of matrix accumulation and glomerulosclerosis in spontaneously hypertensive rats. J Hypertens, v. 21, p.1719 -1727, 2003.

Castro, M. M., Rizzi, E. et al. Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling. Matrix Biology, v. 29, p. 194-201, 2010.

Castro, M. M., Rizzi, E. et al. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. Atherosclerosis, v.198, n. 2, p. 320-3, 2008.

Castro, M. M., Rizzi, E. et al. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. Free Radic Biol Med, v. 46, n. 9, p. 1298-307, 2009.

Ceron, C. S., Castro, M. M. 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, v. 160, n. 1, p. 77-87, 2010.

Chow, A. K., Cena, J. et al. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. Br J Pharmacol, v. 152, n.2, p. 189-205, 2007.

Contard, F., A. Sabri, *et al.* Arterial smooth muscle cell phenotype in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Hypertension, v.22, n.5, p.665-76. 1993.

Dao, H. H., J. Lemay, *et al.* Norepinephrine-induced aortic hyperplasia and extracellular matrix deposition are endothelin-dependent. J Hypertens, v.19, n.11, p.1965-73. 2001.

DeLano F. A., Schmid-Schönbein, G. W. Proteinase activity and receptor cleavage: mechanism for insulin resistance in the spontaneously hypertensive rat. Hypertension, v. 52, p. 415–423, 2008.

Donnelly, R., Collinson, D. J., *et al.* Hypertension, matrix metalloproteinases and target organ damage. J Hypertens, v. 21, n. 9, p. 1627-30, 2003.

Donnini, S., Monti, M. *et al.* Peroxynitrite inactivates human-tissue inhibitor of metalloproteinase-4. Febs Lett, v. 582, n. 7, p. 1135-40, 2008.

Duprez, D. A. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in vascular remodeling and inflammation: a clinical review. J Hypertens, v.24, n.6, p.983-91. 2006.

Fernandez-Patron, C., M. W. Radomski, *et al.* Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. Circ Res, v.85, n.10, p.906-11. 1999.

Fernandez-Patron, C., K. G. Stewart, *et al.* Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. Circ Res, v.87, n.8, p.670-6. 2000.

Folkow, B. Physiological aspects of primary hypertension. Physiological Reviews, v. 62, p. 347–504, 1982.

Fortuno, G. S. J., Mu, M., Fau, D. J., Zalba, G. Oxidative stress and vascular remodeling. Exp Physiol, v. 90, p. 457-462, 2005

Frears, E. R., Zhang, Z. *et al.* Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by peroxynitrite. Febs Lett, v. 381, n.1-2, p. 21-4, 1996.

Freitas, F. R. C., Bulgarelli Bestetti, R. *et al.* Prevalence of hypertension in the urban population of Catanduva, in the State of São Paulo. Brazil. Arq Bras Cardiol, v. 77, p. 9-21, 2001.

Frohlich, E. D. Is the spontaneously hypertensive rat a model for human hypertension? Journal of Hypertension, v. 4, suppl. 3, S15–S19, 1986.

Galis, Z. S., Khatri, J. J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. Circ Res, v. 90, n. 3, p. 251-62, 2002.

Galis, Z. S., Sukhova, G. K. et al. Microscopic localization of active proteases by in situ zymography: detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue. Faseb J, v. 9, n. 10, p. 974-80, 1995.

Garcia, R. A., Pantazatos, D. P. et al. Molecular interactions between matrilysin and the matrix metalloproteinase inhibitor doxycycline investigated by deuterium exchange mass spectrometry. Mol Pharmacol, v. 67, n. 4, p. 1128-36, 2005.

Gerlach, R. F., Demacq, C. et al. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (mmp)-9 levels in serum versus plasma. Clin Biochem, v. 40, n. 1-2, p. 119-23, 2007.

Gerlach, R. F., Uzuelli, J. A. et al. Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (mmp)-2 and mmp-9 activities. Anal Biochem, v. 344, n. 1, p. 147-9, 2005.

Goldblatt, H. Experimental renal hypertension; mechanism of production and maintenance. Circulation, v. 17, n. 4, part 2, p. 642-7, 1958.

Golub L. M., Lee, H. M., Ryan, M. E. et al. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. Adv Dent Res, v. 12, p.12–26, 1998.

Golub, L. M., McNamara, T. F., D'Angelo, G. et al. A non-antibacterial chemically-modified tetracycline inhibits mammalian collagenase activity. J Dent Res, v.66, p. 1310–1314, 1987.

Griendling, K. K., FitzGerald, G. A. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. Circulation, v. 108, p. 2034-2040, 2003.

Griendling, K. K., Sorescu, D. et al. NADPH oxidase: role in cardiovascular biology and disease. Circ Res, v. 86, n. 5, p. 494-501, 2000.

Hao, L., Du, M., Lopez-Campistrous, A., Fernandez-Patron, C. Agonist-induced activation of matrix metalloproteinase-7 promotes vasoconstriction through the epidermal growth factor receptor pathway. Circ Res, v. 94, p. 68-76, 2004.

Hu, J. et al. Time courses of growth and remodeling of porcine aortic media during hypertension: a quantitative immunohistochemical examination. J Histochem Cytochem, v. 56, p. 359-370, 2008.

Humphrey, J. D. Mechanisms of arterial remodeling in hypertension: coupled roles of wall shear and intramural stress. Hypertension, v.52, n.2, p.195-200. 2008.

Intengan, H. D. e E. L. Schiffrin. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. Hypertension, v.38, n.3 Pt 2, p.581-7. 2001.

Kandasamy, A. D., Chow, A. K. et al. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. Cardiovasc Res, v. 20, n. 20, 2009.

Kearney, P. M., Whelton, M. et al. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. Lancet, v. 365, n. 9455, p. 217-23, 2005.

Lalu, M. M., J. Cena, *et al.* Matrix metalloproteinases contribute to endotoxin and interleukin-1beta induced vascular dysfunction. Br J Pharmacol, v.149, n.1, p.31-42. 2006.

Lawes, C. M., S. Vander Hoorn, *et al.* Blood pressure and the global burden of disease 2000. Part 1: estimates of blood pressure levels. J Hypertens, v.24, n.3, p.413-22. 2006.

Lassegue, B., Griendling, K. K. Reactive oxygen species in hypertension; an update. Am J Hypertens, v. 17, n. 9, p. 852-60, 2004.

Lee, H. M., Ciancio, S. G., Tuter, G. et al. 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, v. 75, p. 453-463, 2004.

Lehoux, S., Lemarie, C. A. et al. Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. Circulation, v. 109, n. 8, p. 1041-7, 2004.

Lopez, B., et al. Role of matrix metalloproteinases in hypertension associated cardiac fibrosis. Curr Opin Nephrol Hypertens, v.13, p. 197-204, 2004.

Lu, Z., Xu, X. et al. Extracellular superoxide dismutase deficiency exacerbates pressure overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction. Hypertension, v. 51, n. 1, p. 19-25, 2008.

Luchtefeld, M., Grote, K. et al. Angiotensin ii induces mmp-2 in a p47phox-dependent manner. Biochem Biophys Res Commun, v. 328, n. 1, p. 183-8, 2005.

Martinez, M. L., Lopes, L. F. et al. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-9 activity in patients with hypertension. J Cardiovasc Pharmacol, v. 47, n. 1, p. 117-22, 2006.

Martinez, A., H. R. Oh, *et al.* Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. Biochem J, v.383, n.Pt. 3, p.413-8. 2004.

Mayet, J. e A. Hughes. Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. Heart, v.89, n.9, p.1104-9. 2003.

Mougenot, N., O. Mediani, *et al.* Bisoprolol and hydrochlorothiazide effects on cardiovascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. Pharmacol Res, v.51, n.4, p.359-65. 2005.

Nagase, H., Woessner, Jr. J. F. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem, v. 274, n.31, p. 21491-4, 1999.

Nagase, H., Visse, R. et al. Structure and function of matrix metalloproteinases and timp. Cardiovasc res, v. 69, n. 3, p. 562-73, 2006.

Novak, M. J., Johns, L. P., Miller, R. C., Bradshaw, M. H. Adjunctive benefits of subantimicrobial dose doxycycline in the management of severe, generalized, chronic periodontitis. J Periodontol, v. 73, p. 762–769, 2002.

Okamoto, K., Aoki, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. Japanese Circulation Journal, v. 27, p. 282–293, 1963.

Okamoto, T., Akaike, T. et al. Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein s-glutathiolation via disulfide s-oxide formation. J Biol Chem, v. 276, n. 31, p. 29596-602, 2001.

Page-McCaw, A., Aj, E., Werb, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. Nat Rev Mol Cell Biol, v. 8, p. 221-233, 2007.

Pauletto, P., Rappelli, A., et al. Hyperplastic growth of aortic smooth muscle cells in renovascular hypertensive rabbits is characterized by the expansion of an immature cell phenotype. Cir Res, v. 74, p. 774-788, 1994.

Peterson, J. T., Hallak, H. et al. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure. Circulation, v. 103, n. 18, p. 2303-9. 2001.

Peterson, J. T. Matrix Metalloproteinase Inhibitor Development and the Remodeling of Drug Discovery. Heart Fail Rev, v. 9, n. 1, p. 63-79, 2004.

Raffetto, D. J., Khalil, R. A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. Biochem Pharmacol. v.2, n.75, p.346-359, 2008.

Rjagopalan, S., Meng, X. P. et al. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. implications for atherosclerotic plaque stability. J Clin Invest, v. 98, n. 11, p. 2572-9, 1996.

Rizzi, E., Castro M. M., Fernandes K. et al. Evidence of early involvement of matrix metalloproteinase-2 in lead-induced hypertension. Arch Toxicol, v. 83, p.439-449, 2009.

Shulz, R. Activation of mmp-2 as a key event in oxidative stress injury to the heart. Front Biosci, v. 14, p. 699-716, 2009.

Schulz, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v. 47, p. 211-42, 2007.

Siwik, D. A., Pagano, P. J. et al. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. Am J Physiol Cell Physiol, v. 280, n. 1, p. c53-60, 2001.

Spinale, F. G. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. Circ Res, v. 90, n. 5, p. 520-30, 2002.

Spinale, F. G. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function." Physiol Rev, v. 87, n. 4, p. 1285-342, 2007.

Souza-Tarla, C. D., J. A. Uzuelli, et al. Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. Clin Biochem, v.38, n.5, p.410-4. 2005.

Tran, E. D., DeLano, F. A., Schmid-Schönbein, G. W. Enhanced Matrix Metalloproteinase Activity in the Spontaneously Hypertensive Rat: VEGFR-2 Cleavage, Endothelial Apoptosis, and Capillary Rarefaction. J Vasc Res, v. 47, p. 423-431, 2010.

Touyz, R. M. Reactive oxygen species and angiotensin ii signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. Braz J Med Biol Res, v. 37, n. 8, p. 1263-73, 2004.

Touyz, R. M., Shiffrin, E. L. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. Histochem Cell Biol, v. 122, n. 4, p. 339-52, 2004.

Van Wart, H. E., Birkedal-Hansen, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. Proc Natl Acad Sci USA, v. 87, n. 14, p. 5578-82, 1990.

Vasdev, S., Gadag, V., Salt-induced hypertension in WKY rats: prevention by alphalipoic acid supplementation. Mol Cell Biochem, v. 254, p. 319-326, 2003

Viappiani, S., Nicolescu, A. C. et al. Activation and modulation of 72kda matrix metalloproteinase-2 by peroxyntirite and glutathione. Biochem Pharmacol, v. 77, n 5, p. 826-34, 2009.

Viel, E. C., Benkirane K. et al. Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in doca-salt hypertensive rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v. 295, n. 1, p. h281-8, 2008.

Visse, R., Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res, v. 92, n. 8, p. 827-39, 2003.

Wang, X., Chow, F.L., Oka, T., Hao, L., Lopez-Campistrous, A., Kelly, S. et al. Matrix metalloproteinase-7 and ADAM-12 (a disintegrin and metalloproteinase-12) define a signaling axis in agonist induced oxidase in endothelial cells: hypertension and cardiac hypertrophy. Circulation. v.119, p. 2480–2489, 2009

Ward, M. R., G. Pasterkamp, *et al.* Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. Circulation, v.102, n.10, p.1186-91. 2000.

Woessner J. F. Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEB J, v.5, p. 2145–2154, 1991.

Zhu, Z., S. Zhu, *et al.* Thiazide-like diuretics attenuate agonist-induced vasoconstriction by calcium desensitization linked to Rho kinase. Hypertension, v.45, n.2, p.233-9. 2005.

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](#)