UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Carla Speroni Ceron

**Tratamento crônico com nebivolol atenua o
remodelamento vascular hipertrófico da hipertensão
renovascular 2-rins, 1-clipe**

Ribeirão Preto – SP

2012

Carla Speroni Ceron

**Tratamento crônico com nebivolol atenua o
remodelamento vascular hipertrófico da hipertensão
renovascular 2-rins, 1-clipe**

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

Área de concentração: Farmacologia

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

Ribeirão Preto

2012

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Ceron, Carla Speroni

Tratamento crônico com nebivolol atenua o remodelamento vascular hipertrófico da hipertensão renovascular 2-rins, 1-clipe. Ribeirão Preto, 2012.

124 p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Tanus-Santos, José Eduardo.

1. Beta-bloqueadores. 2.Hipertrofia vascular. 4. Estresse oxidativo. 5. Hipertensão renovascular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carla Speroni Ceron

Tratamento crônico com Nebivolol atenua o remodelamento vascular hipertrófico da hipertensão renovascular 2-rins, 1-clipe

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora em Ciências.
Área de concentração: Farmacologia**

Aprovado em: _____

Banca examinadora:

Prof. Dr.: José Eduardo Tanus dos Santos

Instituição: FMRP - USP

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a.: Cristina Antoniali Silva

Instituição: FOA – UNESP

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Wilson Nadruz Júnior

Instituição: FCM - UNICAMP

Assinatura: _____

Prof. Dr.: André Schmidt

Instituição: FMRP - USP

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Carlos Renato Tirapelli

Instituição: EERP - USP

Assinatura: _____

Dedico esse trabalho à minha família, ao meu noivo e aos meus amigos, pela dedicação, amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que sempre me deu forças nos momentos difíceis, e abençoou os caminhos que percorri, e me dá forças para continuar.

À minha família, que mesmo distante sempre estive ao meu lado, me apoiando e incentivando em todos os momentos. E ao meu noivo, que sempre me incentivou muito, obrigada pelo apoio e compreensão.

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

À professora Raquel Fernanda Gerlach pelos ensinamentos acadêmicos durante todos esses anos.

Agradeço também aos professores Dr. André Schmidt, Dr. Carlos Renato Tirapelli, Dr^a Cristina Antoniali Silva e Dr. Wilson Nadruz Júnior pela disponibilidade de fazerem parte desta banca e pela atenção concedida.

Ao apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) e do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Ao excelente apoio dos amigos e técnicos Sandra, Junia, Riccardo, Eleni, Tadeu, e Mônica. Que me ajudaram com muita dedicação e responsabilidade. Muito obrigada.

Aos amigos Alisson, Danielle, Elen e Stefany, que se dedicaram muito seriamente a este trabalho, e também pela amizade, carinho e compreensão. Foi um privilégio conviver e trabalhar no nosso “grupo hipertensão”. Obrigada pelo carinho, dedicação, e compreensão. Vocês fizeram a diferença durante esses anos.

Às amigas Camila, Larissa e Paula, pelo carinho e amizade e apoio de sempre. Obrigada pela compreensão, pelas conversas, pelos conselhos e por todos os momentos que convivemos juntas durante mais essa etapa.

Aos amigos do laboratório da professora Raquel, pelo carinho, auxílio e apoio de sempre. Foi muito bom conviver com vocês.

Aos amigos do laboratório de farmacologia Cardiovascular do professor José Eduardo pela amizade, convivência, paciência, carinho e apoio de sempre. Foi muito bom conviver com todos vocês.

Aos funcionários Fátima, Ramon e Sonia pelo excelente auxílio técnico, competência e amizade.

Aos funcionários do biotério da FORP pela competência, profissionalismo e disposição, especialmente ao Sérgio.

Agradeço também a todos os funcionários e amigos do departamento de Farmacologia pela amizade e serviços prestados.

*“Assim meu sonho vai seguindo lentamente
Buscando auroras onde possa amanhecer
E uma esperança me conduz sempre adiante
Pois sei que há ainda muita estrada a conhecer.”*

(Wilson Paim)

RESUMO

Ceron, CS. **Tratamento crônico com nebivolol atenua o remodelamento vascular hipertrófico da hipertensão renovascular 2-rins, 1-clipe.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A hipertensão arterial é uma condição clínica grave acompanhada por alterações estruturais do aparelho cardiovascular. Os antagonistas dos receptores β_1 -adrenérgicos são drogas usadas na terapêutica anti-hipertensiva. O nebivolol é um antagonista seletivo dos receptores β_1 de terceira geração, que estimula a liberação endotelial de NO e diminui a ativação da β -nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato (NAD(P)H) oxidase. O metoprolol é um antagonista seletivo dos receptores β_1 de segunda geração, que não apresenta efeitos vasodilatadores. As metaloproteinases da matriz (MMPs), principalmente a MMP-2, são enzimas que participam ativamente do processo de remodelamento vascular. Elas passam de seu estado latente para seu estado ativo pela ação de proteases e espécies reativas de oxigênio (EROs). Como na hipertensão há aumento de EROs, de MMPs e remodelamento vascular, é possível que o nebivolol impeça o aumento dos níveis de MMPs vasculares e o remodelamento vascular hipertrófico associados à hipertensão, além do seu efeito de antagonismo do receptor β_1 . Primeiro, realizamos uma avaliação das alterações aórticas da hipertensão 2-rins, 1-clipe (2R-1C), pois há poucas informações sobre essas alterações durante o desenvolvimento da hipertensão. Para isso, ratos hipertensos e controles foram estudados com 2, 4, 6 e 10 semanas após a indução da hipertensão. A pressão arterial sistólica foi monitorada semanalmente. As alterações na parede aórtica foram estudadas em hematoxilina/eosina (H&E), picrosirius e orceína. Foram avaliados também a atividade da NAD(P)H oxidase, a produção de ânion superóxido, a atividade

gelatinolítica por zimografia in situ; os níveis e localização de MMP-2, MMP-14 e TIMP-2 por imunofluorescência zimografia e imunohistoquímica. No segundo protocolo, após 6 semanas de hipertensão foi iniciado o tratamento com metoprolol (Meto -20/mg/kg/dia) ou nebivolol (Nebi -10mg/kg/dia), realizado durante 4 semanas. Foram avaliados a pressão arterial sistólica, as alterações na parede aórtica por H&E, a atividade da NAD(P)H oxidase, produção de ânion superóxido, a atividade gelatinolítica, os níveis e localização de MMP-2 por imunofluorescência e zimografia em gel, e os níveis de nitrotirosina por imunohistoquímica. Observamos no protocolo temporal que a pressão foi gradualmente aumentada nos animais hipertensos quando comparado aos controles. Houve hiperplasia e hipertrofia da aorta, com aumento da deposição de colágeno e elastina. Observamos aumento nos níveis de estresse oxidativo, MMPs e atividade gelatinolítica em todas as semanas de estudo. Ao final do tratamento com metoprolol e nebivolol, observamos que a pressão diminuiu nos animais hipertensos, e que essa redução da pressão ocorreu de modo semelhante com os diferentes tratamentos. Os animais hipertensos apresentaram hipertrofia da aorta, aumento nos níveis de EROs, de MMP-2 e da atividade gelatinolítica. Essas alterações foram revertidas apenas pelo tratamento com nebivolol, mas não pelo metoprolol. Assim, o remodelamento da hipertensão 2R-1C parece estar estabelecido com duas semanas de hipertensão arterial, com elevados níveis de espécies reativas de oxigênio e MMPs, e o tratamento com nebivolol, mas não o metoprolol, atenuou o estresse oxidativo e o remodelamento vascular associado à hipertensão.

ABSTRACT

Ceron, CS. **Chronic treatment with nebivolol attenuates large arteries hypertrophy in renovascular hypertension 2-kidneys 1-clip.** Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Hypertension is a serious clinical condition with structural changes in the cardiovascular system. Beta-adrenoreceptor antagonists are used in hypertension therapy. Nebivolol is a third-generation selective β_1 -adrenoreceptor antagonist that stimulates endothelial cell NO production and prevents vascular NAD(P)H oxidase activation. Metoprolol is a second-generation selective β_1 -adrenoreceptor antagonist, without vasodilatory effect. The matrix metalloproteinases (MMPs), especially MMP-2, participate actively in the vascular remodeling process, and are activated by reactive oxygen species (ROS). There are increases in ROS, of MMPs, and vascular remodeling in hypertension. Because of these, it's possible that nebivolol prevent MMP increases and vascular remodeling associated with hypertension beyond its β_1 -receptor-blocking properties. First, structural aortic changes in the development of two-kidney, one-clip hypertension (2K-1C) were evaluated. Sham or 2K1C hypertensive rats were studied after 2, 4, 6, and 10 weeks of hypertension. Systolic blood pressure (SBP) was monitored weekly. Morphometry of structural changes in the aortic wall was studied in hematoxylin/eosin, orcein and picrosirius red sections. Aortic NAD(P)H activity and superoxide production was evaluated. Aortic gelatinolytic activity was determined by in situ zymography, and MMP-2, MMP-14, and tissue inhibitor of MMPs (TIMP)-2 levels were determined by gelatin zymography, immunofluorescence and immunohistochemistry. Six weeks after surgery, hypertensive and sham rats were treated with metoprolol (20 mg/kg/ day) or nebivolol

(10 mg/kg/day), for four weeks, in the second-protocol. Systolic blood pressure (SBP) was monitored weekly. Aortic structural were studied in hematoxylin/eosin sections. NAD(P)H oxidase activity and ROS and nitrotyrosine production were evaluated. MMPs levels and activity were determined by zymography and in situ zymography. In the temporal study, 2K-1C hypertension was associated with increased aortic collagen and elastin content in the early phase of hypertension, which was associated with vascular hypertrophy, increased vascular MMPs levels, and increased gelatinolytic activity, possibly as a result of increased vascular NAD(P)H oxidase activity and oxidative stress. In the second-protocol, similar reductions in SBP were found with both metoprolol and nebivolol treatments. However, only Nebi reversed aortic hypertrophy, the increases in aortic NAD(P)H oxidase activity, in aortic ROS levels, in nitrotyrosine staining, in aortic MMP-2 levels and in aortic MMP activity. These results indicate that vascular remodeling of renovascular hypertension is an early process associated with increases in MMPs activities, enhanced matrix deposition and oxidative stress, and that treatment with Nebi attenuate the oxidative stress and the vascular remodeling associated with 2K-1C hypertension.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

2R-1C – Dois-rins, um-clipe

AM- adrenomedulina

ANG II – angiotensina II

ANOVA – Análise de Variância

APO - apocinina

APS- Persulfato de amônio

AST – área de secção transversal

BSA- Albumina do soro bovino

CaCl₂- Cloreto de cálcio

CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

DHE- Dihidroetídio

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

EPM- Erro padrão da média

EROs- Espécies reativas de oxigênio

FEN - fenantrolina

g- Gramas

µg- Microgramas

H⁺ - Hidrogênio

H₂O₂- Peróxido de hidrogênio

HAS – hipertensão arterial sistêmica

i.p.- Intraperitoneal

HCl- Ácido clorídrico

H&E- Hematoxilina e eosina

K⁺ - Potássio

KCl- Cloreto de potássio

kDa- Quilodaltons

Kg- Quilograma

KH₂PO₄- Hidrogenofosfato de potássio

L- Litro

μL- Microlitros

M- Molar

mmol/L- Milimolar

μmol- Micromol

mmol – Milimol

mL- Mililitros

mg- Miligramas

mmHg – Milímetros de mercúrio

MEC – matriz extracelular

Meto – metoprolol

M/L - razão média por lúmen

MMPs- Metaloproteinases

MgSO₄- Sulfato de magnésio

MT-MMPs- MMP de membrana

N- Número

nmol- Nanomol

Na⁺- Sódio

NaCl- Cloreto de sódio

NAD(P)H - β-nicotinamida adenosina dinucleotído fosfato

NEM – N-etilmaleimida

NaHCO₃- Bicarbonato de sódio

Nebi – nebivolol

NO – óxido nítrico

·O₂-Ânion superóxido

OCT- Composto para congelar tecidos

OH⁻- Radical hidroxil

OONO⁻- Peroxinitrito

PA- Pressão arterial

PAD- Padrão interno

PBS- Tampão salina fosfato

PFA- Paraformaldeído

pH- Potencial hidrogeniônico

PMSF- Fenilmetilsulfonil

rhMMP-2 – MMP-2 recombinante humana

URL- Unidades relativas de luminescência

RNAm- Ácido ribonucleico mensageiro

SDS- Dodecil sulfato de sódio

Sham- Rato controle

SHR- Ratos espontaneamente hipertensos

SRAA- Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TBA- Ácido tiobarbitúrico

TBARS- Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico

TEMED- Tetrametil etilenodiamina

TIMPs- Inibidores endógenos de MMPs

ZnCl₂- Cloreto de zinco

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática do remodelamento hipertrófico de vasos de condutância	23
Figura 2 – MMPs e suas características estruturais.....	25
Figura 3 – Esquema ilustrativo da ativação de MMPs por EROs e proteinases	29
Figura 4 – Pressão arterial sistólica e peso corporal dos animais durante as 10 semanas do estudo.	60
Figura 5 – Atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) no plasma dos animais durante as 10 semanas de estudo.....	61
Figura 6 – Alterações estruturais na aorta associadas à hipertensão 2R-1C.....	63
Figura 7 – Deposição vascular de colágeno e de elastina durante as 10 semanas de hipertensão.....	64
Figura 8 – Níveis vasculares de EROs durante a hipertensão 2R-1C.....	66
Figura 9 – Produção vascular de EROs e níveis de peroxidação lipídica plasmáticos durante a hipertensão 2R-1C.	67
Figura 10 – Níveis vasculares de MMP-2 durante a hipertensão 2R-1C.	69
Figura 11 – Atividade gelatinolítica <i>in situ</i> e níveis de MMP-2 nas aortas durante o desenvolvimento da hipertensão.....	70
Figura 12 – Expressão da MMP-2 em aortas durante o desenvolvimento da hipertensão.....	73
Figura 13 – Expressão do MMP-14 em aortas durante o desenvolvimento da hipertensão.....	74
Figura 14 – Expressão do TIMP-2 em aortas durante o desenvolvimento da hipertensão.....	75
Figura 15 – Avaliação temporal de níveis de EROs <i>in situ</i> , observados na presença e na ausência de angiotensina II.....	78
Figura 16 – Avaliação temporal da atividade gelatinolítica <i>in situ</i> , observada na presença e na ausência de angiotensina II.....	79
Figura 17 – Efeitos dos tratamentos sobre a pressão arterial sistólica e sobre o peso corporal na hipertensão 2R-1C.	82
Figura 18 – Efeitos dos tratamentos sobre as alterações estruturais da aorta associadas à hipertensão 2R-1C.....	84

Figura 19 – Efeito dos tratamentos nos níveis de EROs vasculares na hipertensão 2R-1C.	86
Figura 20 – Efeito dos tratamentos na produção vascular de EROs e níveis de peroxidação lipídica plasmáticos na hipertensão 2R-1C.....	87
Figura 21 – Efeito dos tratamentos nos níveis de nitrotirosina vasculares na hipertensão 2R-1C	89
Figura 22 – Efeito dos tratamentos sobre os níveis de MMP-2 vasculares na hipertensão 2R-1C.....	91
Figura 23 – Efeito dos tratamentos na atividade gelatinolítica <i>in situ</i> e nos níveis de MMP-2 vasculares na hipertensão 2R-1C	92
Figura 24 – Efeito de diferentes concentrações de metoprolol e nebivolol (0,001 a 10 mmol/L) sobre a atividade da MMP-2 recombinante humana <i>in vitro</i>	94

Tabelas

Tabela 1 – Correlações de Pearson (coeficiente <i>r</i> e valor de <i>P</i>) para associações entre parâmetros histológicos e bioquímicos avaliados nos diferentes tempos do estudo.	75
---	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
1 - Hipertensão arterial	21
2 - Remodelamento hipertrófico associado à hipertensão	22
3 - Metaloproteinases (MMPs), hipertensão e remodelamento vascular	24
4 - Relações entre espécies reativas de oxigênio (EROs), metaloproteinases e hipertensão.....	27
5. O modelo de hipertensão renovascular 2 rins, 1-clipe (2R-1C).....	30
6. Antagonistas dos receptores β_1 adrenérgicos	32
 HIPÓTESE	 37
 OBJETIVOS.....	 39
 MATERIAIS E MÉTODOS	 41
1 - Considerações gerais	41
1.1 - Hipertensão arterial - técnica de Goldblatt:	41
1.2 - Grupos experimentais	42
2 - Materiais.....	44
2.1 - Soluções utilizadas nos experimentos:	44
2.2 - Drogas administradas diretamente nos animais:	45
2.3 - Equipamentos utilizados nos experimentos:	45
2.4 - Programas de aquisição de dados:	46
3 - Métodos	46
3.1 - Parâmetros hemodinâmicos.....	46
3.1.1 - Avaliação da pressão arterial sistólica e peso corporal.....	46

3.2 - Parâmetros estruturais	47
3.2.1 - Análise morfológica da aorta	47
3.3 - Parâmetros bioquímicos e moleculares	48
3.3.1 - Atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA)	48
3.3.2 - Determinação de espécies reativas de oxigênio <i>in situ</i>	49
3.3.3 - Atividade da NAD(P)H oxidase vascular	49
3.3.4 - Peroxidação lipídica plasmática	50
3.3.5 - Determinação dos níveis de MMP-2 por zimografia em gel	51
3.3.5.A - Dosagem de proteína pelo método de Bradford	51
3.3.5.B - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%	52
3.3.6 - Determinação da atividade gelatinolítica por zimografia <i>In situ</i> e imunofluorescência para MMP-2	53
3.3.7 - Imunohistoquímica para MMP-2, MMP-14, TIMP-2 e nitrotirosina	54
3.3.8 - Determinação de níveis de EROs e da atividade gelatinolítica induzidos por Angiotensina II em animais controles	55
3.3.9 - Efeito das drogas na atividade gelatinolítica da MMP-2 recombinante humana <i>in vitro</i>	56
4 - Análise estatística	57
RESULTADOS	59
1 - PROTOCOLO 1: Análise temporal do modelo 2R-1C de hipertensão renovascular	59
1.1 - Alterações na pressão arterial sistólica, no peso corporal e na atividade da enzima conversora de angiotensina plasmática (ECA) durante o desenvolvimento da hipertensão 2R-1C	59
1.2 - Análise do remodelamento vascular hipertrófico em animais 2R-1C durante as 10 semanas de hipertensão	62
1.3 - Níveis vasculares de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de peroxidação lipídica plasmáticos durante o desenvolvimento da hipertensão 2R-1C	65
1.4 - Atividade gelatinolítica e níveis de MMPs e de TIMP-2 durante o desenvolvimento da hipertensão 2R-1C	68

1.5 - Efeito da Angiotensina II nos níveis de estresse oxidativo e na atividade gelatinolítica in situ na aorta de animais controle	77
2 - PROTOCOLO 2: Tratamento crônico com nebivolol atenua o remodelamento vascular hipertrófico da hipertensão renovascular 2-rins, 1-clipe.....	81
2.1 - Efeitos dos tratamentos com metoprolol e nebivolol na pressão arterial sistólica e peso corporal na hipertensão 2R-1C	81
2.2 - Efeitos dos tratamentos com metoprolol e nebivolol sobre o remodelamento vascular hipertrófico na hipertensão 2R-1C	83
2.3 - Efeitos dos tratamentos com metoprolol e nebivolol sobre os níveis vasculares de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de peroxidação lipídica plasmáticos na hipertensão 2R-1C	85
2.4 - Efeitos dos tratamentos com metoprolol e nebivolol sobre os níveis e atividade de MMP-2 vasculares na hipertensão 2R-1C	88
2.5 - Efeitos de diferentes concentrações de metoprolol e nebivolol sobre a atividade da MMP-2 recombinante humana <i>in vitro</i>	90
 DISCUSSÃO	96
 CONCLUSÃO	112
 REFERÊNCIAS.....	114
 ANEXOS	126

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1 - Hipertensão arterial

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um problema de saúde pública associado à elevada morbidade e mortalidade (Chobanian, Bakris et al. 2003), que afeta aproximadamente 25% da população mundial (Kearney, Whelton et al. 2005). Em 2025, estima-se que cerca de 1,56 bilhões de indivíduos serão acometidos pela doença em todo o mundo (Chobanian, Bakris et al. 2003).

Para fins de diagnóstico, indivíduos com pressão sistólica entre 140 e 159 mmHg e diastólica entre 90 e 99 mmHg estão classificados no estágio 1 da hipertensão arterial, indivíduos com pressão sistólica entre 120 e 139 mmHg e diastólica entre 80 e 89 mmHg estão classificados como pré-hipertensos, e aqueles com pressão sistólica menor que 130 mmHg e diastólica menor que 85 mmHg não apresentam hipertensão (Brandão, Rodrigues et al. 2010).

A HAS é uma doença poligênica e multifatorial, que envolve componentes ambientais e hereditários. Caracteriza-se por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA), e está frequentemente associada a alterações estruturais e funcionais de órgãos-alvo, como vasos sanguíneos, coração, rins e encéfalo (Brandão, Rodrigues et al. 2010).

Dentre os diferentes fatores associados a essa condição clínica, é crescente o número de evidências que sugerem a participação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Cai e Harrison 2000; Griendling, Sorescu et al. 2000; Lassegue e Griendling 2004; Escobales e Crespo 2005) e de vias proteolíticas como a das metaloproteinases (MMPs) no desenvolvimento dessas alterações morfofuncionais

no sistema cardiovascular (Galis e Khatrri 2002; Lehoux, Lemarie et al. 2004; Raffetto e Khalil 2008).

2- Remodelamento hipertrófico associado à hipertensão

A rigidez arterial é comumente descrita como redução de complacência arterial. E complacência é a capacidade de distensão da parede arterial, que determina a velocidade com que varia a pressão no interior do vaso (Lemarie, Tharaux et al. 2010; Vardoulis, Papaioannou et al. 2012). O aumento da rigidez arterial promove elevação da pressão sistólica e redução da pressão diastólica, com conseqüente aumento da pressão de pulso. Isso ocasiona o aumento da pós-carga cardíaca, podendo levar à hipertrofia ventricular esquerda e conseqüente redução da perfusão coronariana (Malachias 2004). Nesse contexto, estudos recentes evidenciam a rigidez arterial está associada a maiores taxas de morbidade e mortalidade nas doenças cardiovasculares como a hipertensão (Laurent, Boutouyrie et al. 2001; Laurent, Katsahian et al. 2003; Cunha 2004).

A rigidez arterial é decorrente do processo de remodelamento vascular, que consiste em uma resposta adaptativa ao aumento da pressão arterial, com o objetivo de normalizar a tensão da parede do vaso (Mayet e Hughes 2003) e segue a teoria de La Place ($T=P \times R$, em que T =tensão, P = pressão e R =raio). O remodelamento vascular é classificado em hipertrófico (artérias de condutância) e eutrófico (artérias de resistência) (Intengan e Schiffrin 2001; Duprez 2006; Humphrey 2008).

Em sua fase inicial, o remodelamento é considerado um processo adaptativo, porém torna-se crônico e prejudicial com aumentos constantes de pressão. No remodelamento hipertrófico (Figura 1) há alterações no número de células e acúmulo de proteínas da matriz extracelular como o colágeno e fibronectina, o que

leva ao aumento da rigidez arterial. Observa-se aumento da espessura da camada média, sem alteração do tamanho do lúmen. Esse tipo de remodelamento é avaliado por algumas medidas básicas, dentre elas a área da secção transversal (AST) e a razão entre a camada média e o diâmetro do lúmen (M/L) (Duprez 2006; Lemarie, Tharaux et al. 2010).

Figura1- Representação esquemática do remodelamento hipertrófico de vasos de condutância (Adaptado de Lemarie, Tharaux et al. 2010). L=lúmen

A angiotensina II está entre os principais fatores que levam ao remodelamento vascular. Sua ação, principalmente via ligação a receptores AT1, ativando diversas cascatas de sinalização que levam a ativação de fatores pró-fibróticos e de proliferação celular. A angiotensina II também aumenta a atividade de algumas enzimas pró-oxidantes, levando ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e à ativação de metaloproteinases (MMPs) (Duprez 2006; Humphrey 2008; Lemarie, Tharaux et al. 2010). As MMPs são importantes proteases que participam da degradação da matriz extracelular (MEC), contribuindo para o aumentando da complacência em condições de pressão elevada. Com aumentos constantes de pressão, contudo, as proteínas da MEC são re-sintetizadas, e novas ligações são formadas entre as proteínas da matriz, as artérias assim tornam-se

mais rígidas, o que prejudica os benefícios iniciais do remodelamento vascular (Lemarie, Tharaux et al. 2010).

3- Metaloproteinases, hipertensão e remodelamento vascular

As metaloproteinases são endopeptidases cálcio-dependentes que contém zinco em seu sítio ativo. A família das MMPs apresenta mais de 20 subtipos, que se subdividem em famílias como collagenases, estromelisinases, matrilisinas, MMPs de membrana (MT-MMPs) e gelatinases. Elas apresentam domínios estruturais semelhantes (Figura 2), e diferem pela especificidade em relação aos seus substratos (Nagase, Visse et al. 2006).

Essas enzimas são expressas em várias células e tecidos, como células da musculatura vascular lisa, endotélio, fibroblastos e células inflamatórias. São sintetizadas e secretadas como zimogênios (pró-forma latente), e adquirem atividade após o rompimento da ligação com seus domínios pró-peptídicos, que cobrem o sítio ativo da enzima (Visse e Nagase 2003; Schulz 2007).

A ativação das MMPs pode ser realizada por proteases, como plasmina e MT-MMPs (Kandasamy, Chow et al. 2010). Outros fatores também podem regular a atividade das MMPs como citocinas, angiotensina II, fatores de crescimento, estresse de cisalhamento e estresse oxidativo (Griendling, Lassegue et al. 1996).

A atividade das MMPs ainda pode ser regulada pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (Spinale 2002; Schulz 2007). Os TIMPs são os principais inibidores das MMPs, e sua família é composta por 4 membros – TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. Esses inibidores exibem diferentes eficácias contra diferentes MMPs. Eles se encontram em equilíbrio com as MMPs (estequiometria 1:1), e uma alteração desse equilíbrio pode resultar em doenças como artrite reumatóide,

arteriosclerose, insuficiência cardíaca, fibrose, enfisema pulmonar crescimento tumoral e metástases (Bode e Maskos 2003; Kandasamy, Chow et al. 2010). O TIMP-1 é o principal inibidor endógeno da MMP-9, já o TIMP-2 é o principal inibidor MMP-2, entretanto, quando complexado com a MT1-MMP ou MMP-14 pode causar a ativação da MMP-2 (Bernardo e Fridman 2003).

Uma vez em sua forma ativa, as MMPs participam do processo fisiológico de remodelamento da MEC por degradarem componentes da matriz extracelular, como componentes da membrana basal, colágeno intersticial, fibronectina e proteoglicanos, sendo essenciais na modulação do crescimento, adesão e migração celular (Ohbayashi 2002; Visse e Nagase 2003).

Figura 2 - MMPs e suas características estruturais. A MMP-2 e a MMP-9 se apresentando três domínios fibronectina (Adaptado de Chow, Cena et al. 2007).

No entanto, algumas evidências têm mostrado que aumentos na atividade e expressão dessas enzimas estão associados a condições de doença. Nesse

sentido, um crescente grupo de evidências tem demonstrado que as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) são as principais MMPs implicadas nas alterações cardiovasculares (Schulz 2007; Kandasamy, Chow et al. 2010).

Conforme descrito anteriormente, as MMPs são proteases que participam da degradação da MEC. Essa degradação as torna importantes para o processo de remodelamento adaptativo, pois contribui para o aumento do diâmetro e da complacência arterial observados nesta fase (Flamant, Placier et al. 2007). Todavia, a degradação constante das proteínas da MEC pelas MMPs promove uma intensa migração e proliferação de células musculares lisas, além de hipertrofia celular e re-síntese protéica, caracterizando o remodelamento crônico e mal-adaptativo (Intengan e Schiffrin 2001; Newby 2006; Watts, Rondelli et al. 2007). Quando a membrana basal é degradada, constituintes da MEC, como a trombospondina-1, a fibronectina e produtos de degradação do colágeno, podem interagir com integrinas, por exemplo, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular essenciais para os processos de hipertrofia, proliferação, migração celular e re-síntese protéica observados durante o remodelamento crônico (Intengan e Schiffrin 2001; Willis, Pierre-Paul et al. 2004; Newby 2006).

Nesse sentido, estudos clínicos e em modelos animais de hipertensão mostraram um aumento significativo da expressão e atividade das MMP-2 no plasma e em tecidos cardíacos e vasculares (Derosa, D'Angelo et al. 2006; Martinez, Lopes et al. 2006; Castro, Rizzi et al. 2008; Martinez, Castro et al. 2008; Guimaraes, Rizzi et al. 2011). Este aumento foi associado a uma degradação excessiva das proteínas da matriz extracelular, além de acentuar a migração e proliferação de células musculares lisas e cardiomiócitos (Newby 2006).

Somado a essas observações, trabalhos recentes que utilizam inibidores não-seletivos de MMPs, como a doxíciclina, observaram que a inibição dessas enzimas promoveu efeitos benéficos em modelos animais de hipertensão, como a redução das alterações funcionais e estruturais dos vasos sanguíneos (Bouvet, Gilbert et al. 2005; Castro, Rizzi et al. 2008; Guimaraes, Rizzi et al. 2011). Parte destes efeitos foi evidenciada por um aumento do relaxamento dependente do endotélio e diminuição das concentrações teciduais de colágeno e elastina (Castro, Rizzi et al. 2008).

Sabe-se ainda que, além de participar destes processos crônicos de remodelamento tecidual, a MMP-2 pode produzir ações vasoconstritoras ao afetar as concentrações teciduais de alguns peptídeos vasoativos (Fernandez-Patron, Radomski et al. 1999; Fernandez-Patron, Stewart et al. 2000; Martinez, Oh et al. 2004). Ela pode clivar a big endotelina-1, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a adrenomedulina (AM), gerando potentes metabólitos vasoconstritores, o que pode aumentar a resistência vascular periférica característica da hipertensão.

4- Relações entre espécies reativas de oxigênio (EROs), metaloproteinases e hipertensão

EROs são derivados reativos do metabolismo do oxigênio, que são produzidas de maneira controlada em condições fisiológicas, sendo consideradas essenciais a processos de regulação e sinalização intracelular, e participam de mecanismos de síntese protéica e transcrição gênica (Touyz e Schiffrin 1999; Griendling, Sorescu et al. 2000). O desequilíbrio que ocorre devido a um aumento da formação de EROs e/ou uma diminuição de sua inativação por sistemas

antioxidantes endógenos é conhecido como estresse oxidativo (Touyz e Schiffrin 2004).

Em condições fisiopatológicas, o aumento da produção de EROs tem sido associado a problemas cardiovasculares, como aterosclerose, hipertensão, insuficiência cardíaca, entre outras (Warnholtz, Nickenig et al. 1999; Rueckschloss, Duerrschmidt et al. 2003). Esse desequilíbrio da produção de EROs pode promover disfunção endotelial, aumento da contratilidade dos vasos, proliferação das células da musculatura vascular lisa e peroxidação lipídica, resultando em remodelamento vascular (Rao e Berk 1992; Harrison 1997).

O ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$) são as EROs mais estudadas, assim como o peroxinitrito ($ONOO^-$) e o óxido nítrico (NO) são as espécies reativas de nitrogênio mais conhecidas (Touyz e Schiffrin 2004). O ânion superóxido é a principal espécie reativa de oxigênio produzida nos vasos sanguíneos, principalmente, pela enzima β -Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato (NAD(P)H) oxidase (Griendling, Sorescu et al. 2000).

A reação do ânion superóxido com o óxido nítrico forma o radical peroxinitrito ($ONOO^-$). O $ONOO^-$ leva à peroxidação lipídica e nitrosilação de proteínas. Os produtos de lesão oxidativa nos tecidos utilizados como marcadores incluem a 3-nitrotirosina (a partir de reação com a tirosina ligada a proteínas) e malonaldeído (os produtos de peroxidação lipídica) (Beckman e Koppenol 1996; Griendling e FitzGerald 2003).

Conforme descrito anteriormente, as MMPs são sintetizadas e secretadas como pró-formas latentes. O sítio catalítico dessas enzimas contém o zinco que interage com a cisteína da região do pró-peptídeo. A manutenção dessa

conformação estrutural é requerida para que a enzima mantenha-se inativa (Visse e Nagase 2003; Schulz 2007).

Estudos sugerem que EROs, especialmente OONO^- , podem interagir com o resíduo de cisteína do pró-peptídeo, levando a ruptura da interação do grupo tiol com o zinco. Essas alterações expõem o sítio catalítico, resultando na ativação das MMPs mesmo na presença do pró-peptídeo, caracterizando um modo de ativação pós-traducional dessas enzimas (S-nitrosilação). Quando na presença de glutatona, o OONO^- também pode causar a ruptura da interação do grupo tiol com o zinco, levando a ativação das MMPs (S-glutationação) (Figura 3) (Okamoto, Akaike et al. 2001; Viappiani, Nicolescu et al. 2009; Kandasamy, Chow et al. 2010). Esse tipo de ativação das MMPs foi observado *in vitro* e *in vivo* (Okamoto, Akaike et al. 1997; Viappiani, Nicolescu et al. 2009).

Além disso, espécies reativas de nitrogênio podem causar a inativação dos TIMPs (Frears, Zhang et al. 1996; Donnini, Monti et al. 2008), contribuindo para o aumento da atividade das metaloproteinasas.

Figura 3 - Esquema ilustrativo da ativação de MMPs por EROs e proteinases (Adaptado de Kandasamy, Chow et al. 2010).

Além disso, o estresse oxidativo também pode ativar fibroblastos, que são células responsáveis por produzir constituintes da MEC, como as MMPs (Sorescu e Griending 2002). Trabalhos mostram que fibroblastos cardíacos estimulados com EROs apresentaram aumento na atividade de MMPs-2, -9 e -13 (Siwik, Pagano et al. 2001).

Nesse sentido, é crescente o número de trabalhos que associa o aumento de EROs com a ativação das MMPs (Grote, Flach et al. 2003; Luchtefeld, Grote et al. 2005; Castro, Rizzi et al. 2009; Ceron, Castro et al. 2010). Esses estudos sugerem que a ativação dessas enzimas por EROs contribui para as alterações observadas no remodelamento hipertrófico. Do mesmo modo, animais hipertensos tratados com antioxidantes apresentaram uma reversão do remodelamento cardiovascular (Rugale, Delbosc et al. 2007; Chess, Xu et al. 2008; Castro, Rizzi et al. 2009; Rizzi, Castro et al. 2012).

5– O modelo de hipertensão renovascular 2 rins, 1-clipe (2R-1C)

O modelo de hipertensão 2R-1C foi o primeiro modelo animal de hipertensão renovascular, desenvolvido em 1934 por Harry Goldblatt, que realizou a constrição da artéria renal de cães com auxílio de um clipe, sendo que o rim contra lateral permanece intacto. O clampeamento de um dos rins promove ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) (Goldblatt, Lynch et al. 1934).

Dados da literatura mostram que, nesse modelo de hipertensão, os níveis plasmáticos de renina e angiotensina II aumentam até a quinta semana após a indução da hipertensão, podendo diminuir com o tempo. Porém, até a oitava semana, as ações exercidas pela angiotensina II continuam elevadas, contribuindo para a manutenção do quadro hipertensivo (Martinez-Maldonado 1991; Lerman,

Chade et al. 2005). Sabe-se ainda que a atividade de renina plasmática é maior nas primeiras semanas após a indução da hipertensão (Salguero, Akin et al. 2008; Reinhold, Uihlein et al. 2009). Em um recente trabalho de nosso laboratório, animais 2R-1C com seis semanas de hipertensão arterial apresentaram atividade de renina plasmática diminuída em relação aos animais controles (Martins-Oliveira, Castro et al. 2012).

Sabe-se que a angiotensina II tem sido descrita como um dos principais mediadores envolvidos nas alterações cardiovasculares observada nesse modelo de hipertensão (Martinez-Maldonado 1991). Dentre as suas principais ações, destaca-se a ativação da NAD(P)H oxidase e formação de O_2^- (Heitzer, Wenzel et al. 1999; Seshiah, Weber et al. 2002; Touyz 2004). Nesse sentido, trabalhos tem mostrado o aumento da produção de O_2^- nas aortas dos animais 2R-1C, o que está associado a um aumento na atividade da NAD(P)H oxidase vascular, promovida pela ação da angiotensina II (Heitzer, Wenzel et al. 1999; Jung, Schreiber et al. 2004; Oliveira-Sales, Dugaich et al. 2008; Salguero, Akin et al. 2008; Montenegro, Amaral et al. 2011).

Conforme descrito anteriormente, EROs podem ativar as MMPs por uma modificação pós-traducional. Nesse sentido, o aumento da produção de O_2^- pela ativação da NAD(P)H oxidase foi associado ao aumento da atividade das MMPs e à hipertrofia de aorta em ratos com hipertensão 2R-1C (Ceron, Castro et al. 2010).

Além disso, o tratamento de animais hipertensos 2R-1C com o antioxidante tempol reduziu os níveis de EROs e a expressão da MMP-2, com conseqüente redução do remodelamento vascular (Castro, Rizzi et al. 2009). Do mesmo modo, o inibidor de MMPs doxíciclina foi capaz de reverter essas alterações (Castro, Rizzi et al. 2008; Guimaraes, Rizzi et al. 2011).

Esse modelo de hipertensão foi utilizado neste estudo por apresentar elevados níveis de EROs associados ao aumento de angiotensina II (Lerman, Nath et al. 2001; Castro, Rizzi et al. 2009; Castro, Rizzi et al. 2010; Ceron, Castro et al. 2010). De modo geral, a participação desses fatores foi avaliada apenas em um estágio crônico da hipertensão 2R-1C. Existem poucas informações na literatura sobre a participação das MMPs e seus inibidores nas alterações vasculares observadas nas fases iniciais desse modelo de hipertensão.

6 - Antagonistas dos receptores β_1 -adrenérgicos

Os antagonistas dos receptores β_1 -adrenérgicos constituem uma classe terapêutica de anti-hipertensivos que apresenta como mecanismo de ação comum o bloqueio desses receptores. Essas drogas inibem as respostas cronotrópicas, inotrópicas das catecolaminas nesses receptores, reduzem a secreção de renina por ação nas células justaglomerulares renais, e levam à readaptação dos barorreceptores e diminuição das catecolaminas nas sinapses nervosas (Bakris 2009; Brandão, Rodrigues et al. 2010).

Os antagonistas dos receptores β de primeira geração são não-seletivos para os receptores β_1 (presentes principalmente no miocárdio, sistema nervoso e rins) e β_2 (presentes principalmente no músculo liso, nos pulmões, nos vasos sanguíneos e em outros órgãos), como o propranolol e timolol. Por isso apresentam efeitos periféricos acentuados, como o aumento da resistência arterial periférica e a constrição brônquica (Bakris 2009; Remme 2010). Os antagonistas dos receptores β de segunda geração, como o metoprolol e atenolol, são considerados β_1 -seletivos, desprovidos de atividade simpatomimética intrínseca, por isso não apresentam

tantos efeitos indesejáveis quanto os da primeira geração (Bakris 2009; Fang, Nicol et al. 2011).

Os antagonistas dos receptores β de terceira geração, como o carvedilol e o nebivolol, são seletivos para os receptores β_1 e apresentam propriedades vasodilatadoras adicionais. No caso do carvedilol, a vasodilatação ocorre porque a droga também antagoniza o receptor α_1 -adrenérgico (Bakris 2009; Remme 2010). O nebivolol pode causar vasodilatação por liberação de óxido nítrico (Guerrero, Voces et al. 2003; Gupta e Wright 2008), que é quase completamente bloqueada por inibidores da sintase de NO (Dawes, Brett et al. 1999).

O nebivolol é uma mistura racêmica de dois enantiômeros (*d*- nebivolol e *l*- nebivolol). O *d*- nebivolol é o principal responsável pelo antagonismo do receptor β_1 -adrenérgicos, e o *l*-nebivolol o principal responsável pelas propriedades vasodilatadoras (Tran Quang, Rozec et al. 2009). Os mecanismos sugeridos para a produção de NO pelo nebivolol parecem envolver vários receptores. Alguns estudos sugerem que a liberação de NO seja devido a um efeito agonista do receptor β_3 -adrenérgico endotelial (de Groot, Mathy et al. 2003; Dessy, Moniotte et al. 2004; Balligand 2009), ou efeito agonista do receptor β_2 -adrenérgico (Broeders, Doevendans et al. 2000; Georgescu, Pluteanu et al. 2005; Tran Quang, Rozec et al. 2009). Além disso, o nebivolol pode levar a vasodilatação por interação com receptor de estrógeno (Garban, Buga et al. 2004), e por antagonismo dos receptores α_1 -adrenérgicos periféricos (Tran Quang, Rozec et al. 2009).

Devido a essas propriedades vasodilatadoras adicionais, mesmo que de mecanismo não completamente elucidado, o nebivolol tem sido utilizado no tratamento de diversas desordens cardiovasculares, apresentando vantagens em comparação ao uso dos antagonistas dos receptores β_1 de segunda geração como o

metoprolol. Em estudos clínicos de hipertensão (Dawes, Brett et al. 1999; Tzemos, Lim et al. 2001) e em modelos animais da doença (Cosentino, Bonetti et al. 2002; Guerrero, Voces et al. 2003), o nebivolol melhora o relaxamento dependente do endotélio dos vasos sanguíneos. Adicionalmente, animais apresentando disfunção endotelial também mostram um aumento da biodisponibilidade do NO quando tratados com a droga (Cosentino, Bonetti et al. 2002).

Estudos recentes com pacientes hipertensos mostram que o tratamento com nebivolol pode aumentar a distensibilidade e diminuir a rigidez arterial (McEniery, Schmitt et al. 2004; Kampus, Serg et al. 2011; Soanker, Naidu et al. 2012). No entanto, pacientes tratados com antagonistas dos receptores β_1 de segunda geração, como o metoprolol e o atenolol, não apresentam melhora dessa condição (McEniery, Schmitt et al. 2004; Kampus, Serg et al. 2011; Shirai, Song et al. 2011). Além disso, trabalhos mostram que o nebivolol foi capaz de atenuar o remodelamento cardíaco em diferentes desordens cardiovasculares. Essas ações parecem não acontecer com antagonistas de receptores β de segunda geração, como o metoprolol (de Groot, Mathy et al. 2004; Oelze, Daiber et al. 2006; Sorrentino, Doerries et al. 2011).

É amplamente descrito na literatura que o nebivolol pode reduzir os níveis de EROs, o que pode ocorrer de maneira direta (de Groot, Mathy et al. 2004; Zhou, Ma et al. 2010) ou pela redução da atividade da NAD(P)H oxidase vascular em doenças cardiovasculares. Esse efeito não é observado com antagonistas de receptores β_1 de segunda geração (Oelze, Daiber et al. 2006; Sorrentino, Doerries et al. 2011). Além disso, células endoteliais humanas (HUVEC) que receberam estímulo oxidante, apresentam níveis elevados de MMP-2 e MMP-9. Quando essas células foram tratadas com nebivolol, observou-se uma redução dos níveis das MMPs

(Garbin, Fratta Pasini et al. 2008). Como descrito anteriormente, MMPs são enzimas ativadas por estresse oxidativo e que participam do processo de rigidez arterial. No entanto, não há trabalho que avalie *in vivo* se alguma alteração na atividade das MMPs possa estar entre os efeitos observados no tratamento com nebivolol.

HIPÓTESE

HIPÓTESE

Levando-se em consideração que:

1. no modelo 2R-1C de hipertensão há um aumento nos níveis de angiotensina II, e esse peptídeo participa do desenvolvimento das alterações vasculares estruturais e pode aumentar a produção de ânion superóxido pela ativação da NAD(P)H oxidase vascular;
2. EROs podem ativar MMPs, e ambos participam do processo de remodelamento vascular hipertrófico;
3. o uso de nebivolol (antagonista do receptor β_1 -adrenérgico de terceira geração) tem sido associado à redução de estresse oxidativo em condições de alterações cardiovasculares e apresenta outros efeitos benéficos em comparação ao tratamento com metoprolol (antagonista do receptor β_1 -adrenérgico de segunda geração);

formulamos a hipótese de que o tratamento com nebivolol diminua as alterações vasculares, os níveis de EROs e a atividade das MMPs associadas ao modelo 2R-1C de hipertensão, o que não aconteceria no tratamento com o antagonista do receptor β_1 -adrenérgico de segunda geração.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1- Avaliação da pressão arterial, dos níveis de EROs, da expressão e atividade das MMPs, da expressão dos inibidores teciduais endógenos (TIMPs) e das alterações morfológicas hipertróficas que ocorrem durante o desenvolvimento do modelo 2R-1C de hipertensão arterial.

2- Observar os efeitos do tratamento com nebivolol (antagonista do receptor β_1 -adrenérgico de terceira geração) e metoprolol (antagonista do receptor β_1 -adrenérgico de segunda geração) na pressão arterial, níveis de EROs, ativação das metaloproteinases, e no remodelamento vascular hipertrófico associados à hipertensão 2R-1C.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Considerações gerais

Para os experimentos foram utilizados ratos Wistar (180 a 200 gramas), provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em salas com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada (22-25 °C), com livre acesso à ração e água. Este estudo recebeu a aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), com os seguintes números de protocolo (160/2009 e 123-2011).

1.1 - Hipertensão arterial - técnica de Goldblatt:

A hipertensão arterial foi induzida pela inserção de um clipe de prata (abertura de 0,2 milímetros) na artéria renal esquerda. Esse procedimento leva a estenose da artéria e ativação do sistema renina-angiotensina, com conseqüente aumento da pressão arterial (Goldblatt, Lynch et al. 1934). Os animais controle foram submetidos apenas à laparotomia abdominal, sem introdução do clipe. O anestésico e o relaxante muscular utilizados foram ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), respectivamente, via intraperitoneal (i.p.).

1.2 - Grupos experimentais

Protocolo 1

Análise temporal das alterações vasculares no modelo 2R-1C de hipertensão renovascular

- Sham 2 semanas: animais controle, submetidos apenas à laparotomia e que receberam água durante 2 semanas;
- Sham 4 semanas: animais controle, submetidos apenas à laparotomia e que receberam água durante 4 semanas;
- Sham 6 semanas: animais controle, submetidos apenas à laparotomia e que receberam água durante 6 semanas;
- Sham 10 semanas: animais controle, submetidos apenas à laparotomia e que receberam água durante 10 semanas;
- 2R-1C 2 semanas: animais submetidos à estenose da artéria renal, que receberam água durante 2 semanas;
- 2R-1C 4 semanas: animais submetidos à estenose da artéria renal, que receberam água durante 4 semanas;
- 2R-1C 6 semanas: animais submetidos à estenose da artéria renal, que receberam água durante 6 semanas;
- 2R-1C 10 semanas: animais submetidos à estenose da artéria renal, que receberam água durante 10 semanas;

Protocolo 2

Tratamento crônico com nebivolol atenua o remodelamento vascular hipertrófico da hipertensão renovascular 2-rins, 1-clipe

Sham: animais controle, submetidos apenas à laparotomia, que receberam veículo (etanol 2%);

Sham+metoprolol (Sham+Meto): animais controle, submetidos apenas à laparotomia e que receberam 20 mg/Kg/dia de metoprolol (antagonista β_1 de segunda geração);

Sham+nebivolol (Sham+Nebi): animais controle, submetidos apenas à laparotomia e que receberam 10 mg/Kg/dia de nebivolol (antagonista β_1 de terceira geração);

2R-1C: animais submetidos à estenose da artéria renal, que receberam água veículo (etanol 2%);

2R-1C+ metoprolol (2R-1C+Meto): animais submetidos à estenose da artéria renal e que receberam 20 mg/Kg/dia de metoprolol (antagonista β_1 de segunda geração);

2R-1C+nebivolol (2R-1C +Nebi): animais submetidos à estenose da artéria renal e que receberam 10 mg/Kg/dia de nebivolol (antagonista β_1 de terceira geração).

Observações

Somente os animais 2R-1C que apresentaram pressão arterial sistólica acima de 160 mmHg foram utilizados no estudo. Os animais que ficaram hipertensos foram distribuídos aleatoriamente nos grupos experimentais citados acima. Os tratamentos tiveram início seis semanas após a indução da hipertensão arterial renovascular e foram realizados por gavagem durante quatro semanas. A escolha das doses das drogas foi baseada em estudos prévios (Cosentino, Bonetti et al. 2002; Sorrentino,

Doerries et al. 2011). Após o tempo determinado foi realizada a da coleta de plasma e tecidos para análises estruturais, bioquímicas e moleculares.

2 - Materiais

2.1 - Soluções utilizadas nos experimentos:

- Solução de krebs modificada (em mmol/L: NaCl 130; CaCl₂ 1,6; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,2; KCl 4,7; NaHCO₃ 14,9 e glicose 5,5);
- 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 n-etilmaleimida (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);
- Etanol 2%: veículo das drogas administradas nos animais;
- 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: SDS2%, 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- CaCl_2 (tris 50 mmol/L, CaCl_2 10 mmol/L, ZnCl_2 1 $\mu\text{mol/L}$);
- Solução de DQ gelatin 5 $\mu\text{g/mL}$ (Molecular Probes, Oregon, USA)
- DHE (dihidroetídeo) 10 $\mu\text{mol/L}$
- PBS (tampão salina fosfato);
- Anticorpos monoclonais: anti-MMP-2 (MAB 3308), anti-MMP-14 (MAB 3317) anti-TIMP-2 (MAB 13446), anti-nitrotirosina (06-284), diluição 1:1000 em PBS, a partir da solução inicial de 1 mg/mL (Chemicon, Termeccula, CA USA);
- Anticorpo secundário rodamina (AP 160P), diluição 1:200 em PBS, a partir da solução inicial de 1 mg/mL (Chemicon, Termeccula, CA USA); Os demais reagentes não específicos foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.2 - Drogas administradas diretamente nos animais:

- Selozok (AstraZeneca - succinato de metoprolol) 20 mg/kg/dia e Nebilet (Biolab – nebivolol) 10 mg/kg/dia, foram diluídas em etanol 2% e administradas por gavagem;
- Ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) foram administradas por via intraperitoneal.

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);
- Micrótomo (Leica RM2025) e criostato (CM 1900; Leica, Alemanha);
- Microscópio de luz branca e fluorescência (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado a câmara fotográfica;
- Espectrofotômetro;
- Fonte de eletroforese (Electrophoresis Power Supply – EPS 301);
- Sistema de documentação de eletroforese Kodak (Kodak, Rochester, NY);

2.4 - Programas de aquisição de dados:

- ImageJ Program (NIH – National Institutes of Health);
- Analysis System (EDAS) 290 (Kodak, Rochester, NY);
- KCJunior (Molecular Devices, Sunnyvale, CA);
- SigmaStat for Windows (Jandel Scientific, USA).

3 - Métodos

3.1 - 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 cabinets

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., Csdtle 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 10 semanas do estudo.

3.2 - Parâmetros estruturais

3.2.1 - Análise morfológica da aorta

As 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 elas foram 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 uma chapa de aquecimento a temperatura de 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.

Algumas lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para determinação dos parâmetros estruturais da aorta: área de secção transversal do corte (AST), 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. Enquanto outras lâminas foram coradas com Sirius Red e com Orceína para determinação

quantitativa de colágeno e elastina na camada média da aorta (Dao, Lemay et al. 2001).

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 AST ($A_e - A_i$), 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 ($2 \times \text{média}/DI$). 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 (Dao, Lemay et al. 2001).

3.3 - Parâmetros bioquímicos e moleculares

3.3.1 – Atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA)

A atividade da enzima conversora da angiotensina plasmática foi avaliada utilizando um método fluorimétrico que mede a hidrólise do substrato sintético Hipuril-His-Leu, como descrito anteriormente (Montenegro, Pessa et al. 2009). Resumidamente, 5 μ l de plasma foram incubados com 245 μ l de solução de ensaio contendo 5 mmol/L hipuril-his-leu em 0,4 M tampão borato de sódio, pH 8,3 e 0,9 M de NaCl por 15 min. a 37 ° C. A reação foi interrompida pela adição de 600 μ l de 0,34 M NaOH. O produto dessa hidrólise (his-leu) foi medido fluorimetricamente (excitação 365 nm e 495 nm de emissão), após a adição de 50 μ l de o- ftalaldeído

(20 mg ml em metanol), sobre agitação durante 10 minutos, em seguida foi adicionado 100 µl de HCl 3 M e centrifugação a 800 g por 5 min. Uma curva padrão foi obtida com His-Leu (0,1-30 mmol/L), que produziu uma relação linear de fluorescência relativa e concentrações de His-Leu (dados não mostrados).

3.3.2 – Determinação de espécies reativas de oxigênio *in situ*

As concentrações vasculares de EROs foram analisadas *in situ*, na camada média das aortas, utilizando dihidroetídeo (DHE) na concentração de 10 µmol/L (Hao, Nishimura et al. 2006; Viel, Benkirane et al. 2008). Essa sonda reage com o O_2^- presente nos tecidos, resultando na formação de 2-hidroxi-etídeo 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. Eles foram cortados em criostato, a 4 µm de espessura, 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 um microscópio de fluorescência (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado a câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram fotografadas num aumento de 400x. A quantificação da intensidade de fluorescência vermelha emitida foi realizada utilizando o programa ImageJ.

3.3.3 – Atividade da NAD(P)H oxidase vascular

Para a determinação da atividade da enzima NAD(P)H oxidase, utilizou-se a técnica de luminescência com a sonda Lucigenina. Em resumo, anéis de aorta provenientes de animais dos diferentes grupos experimentais foram transferidos

para frascos de luminescência contendo 1 ml de tampão krebs-HEPES, pH 7,2 e 5 $\mu\text{mol/l}$ de lucigenina. Após avaliação dos valores da linha de base, o substrato enzimático $\beta\text{-NAD(P)H}$ (100 $\mu\text{mmol/L}$) foi adicionado à solução e as contagens de luminescência foram medidas continuamente durante 15 minutos em luminômetro marca Berthold 9505 (EG&G Instruments GmbH, Munich, Germany) a 37 °C. Os valores da linha de base obtidos na ausência de $\beta\text{-NAD(P)H}$ foram descontados dos valores obtidos na presença de $\beta\text{-NAD(P)H}$. Os resultados foram normalizados pelo peso seco dos anéis de aorta e expressos em unidades relativas de luminescência (URL)/mg/minuto, como descrito previamente (Janiszewski, Souza et al. 2002). Esse ensaio foi padronizado em nosso laboratório utilizando anéis de aorta de animais 2R-1C previamente incubados com PEG-SOD (200 U/ml - um análogo da SOD permeável à membrana), DPI (10 $\mu\text{mol/L}$ - inibidor de flavoproteínas), apocinina (1mmol/L – inibidor não seletivo de NAD(P)H oxidase), alopurinol (10 $\mu\text{mol/L}$ – inibidor de xantina oxidase) ou rotenona (10 $\mu\text{mol/L}$ – inibidor da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial) para excluir a formação de superóxido vascular proveniente de outras fontes (Montenegro, Amaral et al. 2011).

3.3.4 – Peroxidação lipídica plasmática

A peroxidação lipídica foi o parâmetro utilizado para avaliar o estresse oxidativo no plasma. Esse processo pode ser analisado pela quantificação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Cau, Dias-Junior et al. 2008). Basicamente, esse ácido reage com aldeídos formados na lipoperoxidação, como malonaldeído (MDA), formando espécies facilmente quantificadas por espectrofotometria ou fluorimetria.

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

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

O zimograma em gel é um método muito utilizado para determinação dos níveis de MMPs no plasma e amostras de tecidos biológicos (Gerlach, Uzuelli et al. 2005; Gerlach, Demacq et al. 2007; Castro, Rizzi et al. 2008). 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.

3.3.5. 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 VE foram triturados e

homogeneizados em tampão de extração de proteínas (CaCl₂ 10 mmol/L, Tris 50 mmol/L pH 7,4, Brij 1%, NaCl 0,5%, fenantrolina 1 mmol/L, PMSF 1 mmol/L, NEM 1 mmol/L) e incubadas por 16 horas em geladeira. Para cada 0,1 g de tecido foram acrescentados 300 µL do tampão. Após as 16 horas, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos (10000 G) e os sobrenadantes retirados para determinação protéica. A curva padrão foi realizada com albumina do soro bovino (BSA) diluído em água destilada nas seguintes concentrações em mg/mL: 0,0875; 0,175; 0,35; 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 canaleta do gel.

3.3.5.B - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%

As amostras foram previamente misturadas ao tampão de amostra (SDS 2%, Tris-HCl 125 mmol/L, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,001%) e aplicadas em géis de poliacrilamida a 12% contendo 1mg/mL de gelatina e separadas por eletroforese, conforme a técnica SDS-PAGE. Concluída a 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 mmol/L, 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%. 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 padrão (Pad). Por ele foi possível normalizar as eventuais variações nas bandas decorrentes de diferenças na intensidade de coloração dos géis. Essa normalização é necessária para que se possa comparar resultados obtidos em diferentes géis. A quantificação das bandas da MMP-2 foi feita utilizando-se o sistema Kodak Elettrophoresis Documentation e 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.

3.3.6 - Determinação da atividade gelatinolítica por zimografia *In situ* e imunofluorescência para MMP-2

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 (Galis, Sukhova 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 mmol/L. Os tecidos foram congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), utilizando acetona e gelo seco. Eles foram cortados em criostato, a 4 µm de espessura, e incubados com o substrato DQ gelatin por 30 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 a 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.

Para co-localizar a atividade gelatinolítica *in situ* com os níveis de MMP-2 foi realizada uma imunofluorescência (Ceron, Castro et al. 2010). 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.

3.3.7 - Imunohistoquímica para MMP-2, MMP-14, TIMP-2 e nitrotirosina

Método utilizado para determinar a expressão e localização de MMP-2, de TIMP-2 e de 3-nitrotirosina diretamente nos tecidos. Para isso foi utilizado o kit de imunohistoquímica: Anti-mouse poly horseradish peroxidase (HRP) (Chemicon, USA). Os tecidos foram congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), utilizando acetona e gelo seco. Eles foram cortados em criostato, a 4 µm de

espessura e fixados imediatamente com acetona. Posteriormente, os cortes foram incubados com solução de bloqueio de peroxidase contendo H_2O_2 por 10 minutos, em câmara úmida e escura, e em seguidas lavados com PBS. Cada corte foi incubado com anticorpo primário anti-MMP-2 (MAB 3308, Chemicon, USA), com anti-MMP-14 (MAB 3317, Chemicon, USA), anti-TIMP-2 (MAB 13446, Chemicon, USA), ou anti-nitrotirosina (06-284), todos na concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ por 60 minutos nas condições citadas.

Em seguida os cortes foram lavados com PBS e incubados com o anticorpo secundário do kit por 60 minutos em câmara úmida e escura. Após a incubação os cortes foram lavados com PBS. Por fim os cortes foram incubados com o substrato cromógeno 3,3' diaminobenzidina (DAB) (25 μL do cromógeno para cada 1,0 mL do tampão do DAB) por 20 minutos, e contra-corados com hematoxilina. Com auxílio de um microscópio de luz branca (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado a câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram fotografadas num aumento de 400x. A MMP-2, o TIMP-2 e a nitrotirosina foram visualizados por uma cor marrom contra o fundo roxo da hematoxilina. Para análise da e quantificação da densidade de marrom foi utilizado o programa ImageJ (Faia, Davis et al. 2002).

3.3.8 - Determinação de níveis de EROs e da atividade gelatinolítica induzidos por Angiotensina II em animais controles

Os níveis vasculares de EROs induzidas por incubação com angiotensina II foram analisadas *in situ*, na camada média das aortas. Para isso, dihidroetídeo (DHE) na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ (Hao, Nishimura et al. 2006; Viel, Benkirane et al. 2008) foi incubado na presença de angiotensina II (ANG II) 1 $\mu\text{mol/L}$ e/ou

apocinina (APO) 100 $\mu\text{mol/L}$, em tecidos previamente congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), utilizando acetona e gelo seco.

A atividade gelatinolítica *in situ* induzida por incubação com angiotensina II foi analisada *in situ*, na camada média das aortas. Para essa análise utilizou-se DQ gelatin (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA) na concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ em tampão Tris- CaCl_2 50 mmol/L , incubada na presença de angiotensina II (ANG II) 1 $\mu\text{mol/L}$ e/ou fenantrolina (FEN) ou apocinina (APO) 100 $\mu\text{mol/L}$ (Martinez-Lemus et al., 2011), em tecidos previamente congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), utilizando acetona e gelo seco.

Os inibidores diluídos em PBS foram previamente incubados sobre os cortes de aorta (15 min.), após realizou-se a adição de angiotensina II, DHE ou DQ gelatin, e nessas soluções foi mantida a concentração dos inibidores durante o ensaio.

Com auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado a câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram fotografadas no momento inicial da incubação com as drogas (0 min.), após 10 e 30 min. de incubação, para verificar as mudanças na fluorescência. As imagens foram fotografadas em aumento de 400x. A quantificação da atividade gelatinolítica *in situ* observada como intensidade de fluorescência verde, e dos níveis de EROs observada como intensidade de fluorescência vermelha emitida foi realizada utilizando o programa ImageJ.

3.3.9 - Efeito das drogas na atividade gelatinolítica da MMP-2 recombinante humana *in vitro*

Para este experimento foi utilizada uma MMP-2 recombinante humana (rh-MMP-2, R&D Systems Inc. Minneapolis, EUA) na ausência ou na presença de

metoprolol ou nebivolol (0,001 a 10 mmol/L). Esta atividade foi avaliada em microplaca em espectrofluorímetro (excitação 495nm, emissão 515 nm; Gemini EM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) utilizando o Kit EnzChek Gelatinase/Collagenase. A rh-MMP-2 foi incubada durante 120 minutos a 37 °C com DQ gelatin (substrato) na concentração de 5 µg/mL em tampão Tris-CaCl₂, conforme descrito previamente (Castro, Rizzi et al. 2009). Fenantrolina (FEN -50 µmol/L) foi utilizada como controle positivo de inibição da atividade da MMP-2.

4 - Análise estatística

Protocolo 1: Os resultados obtidos em cada grupo de animais hipertensos foram comparados ao seu respectivo grupo controle usando Teste t de Student não pareado. Entre os grupos hipertensos foi realizada análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de teste Tukey (SigmaStat for Windows, Jadel Scientific, USA). Após a análise estatística os valores foram transformados em porcentagem do controle (sham) para a representação gráfica dos experimentos. O coeficiente de correlação linear de Pearson (r , P) foi calculado para testar a associação entre as análises histológicas e bioquímicas. Foram considerados estatisticamente significantes valores com $P < 0,05$. Os gráficos foram representados com média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Protocolo 2: 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 significantes valores com $P < 0,05$. Os gráficos foram representados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

RESULTADOS

RESULTADOS

1 - PROTOCOLO 1: Análise temporal do modelo 2R-1C de hipertensão renovascular

1.1 - Alterações na pressão arterial sistólica, no peso corporal e na atividade da enzima conversora de angiotensina plasmática (ECA) durante o desenvolvimento da hipertensão 2R-1C

Os valores basais de pressão arterial sistólica foram similares nos grupos experimentais antes da cirurgia. Entretanto, logo na segunda semana após o procedimento cirúrgico, foi observada elevação na pressão nos grupos 2R-1C quando comparados aos controles (figura 4A; $P < 0,05$). Esse aumento atinge um valor máximo na quarta semana após a cirurgia, não havendo diferença significativa nos valores de pressão entre os grupos hipertensos na quarta, na sexta e na décima semana após a cirurgia ($P > 0,05$).

Foi observado o aumento do peso corporal pelo crescimento dos animais durante as 10 semanas do estudo (figura 4B; $P < 0,05$). No entanto, não foram observadas diferenças significativas no ganho de peso corporal entre animais controles e hipertensos ($P > 0,05$).

A atividade de ECA foi determinada no plasma de animais hipertensos e controles. Foi observado um aumento significativo na atividade da enzima no plasma dos animais hipertensos já na segunda semana de hipertensão (figura 5; $P < 0,05$) em comparação aos animais controles. Esse aumento foi mantido até a sexta semana. Na décima semana de hipertensão não foi observada diferença significativa na atividade da ECA entre hipertensos e controles ($P > 0,05$). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os tempos de hipertensão ($P > 0,05$).

A

B

Figura 4 – Pressão arterial sistólica e peso corporal dos animais durante as 10 semanas do estudo. Valores de pressão medidos por pletismografia de cauda (A). Peso corporal em gramas (B). Valores expressos como média $\pm$ EPM ($n=12$ /grupo) * $P<0,05$ para 2R-1C de 2 semanas *versus* Sham. ** $P<0,05$ para 2R-1C de 4 semanas *versus* grupos Sham e grupo 2R-1C de 2 semanas. *** $P<0,05$ para 2R-1C de 6 semanas *versus* grupos Sham e grupo 2R-1C de 2 e 4 semanas. **** $P<0,05$ para 2R-1C de 10 semanas *versus* grupos Sham e grupo 2R-1C de 2, 4 e 6 semanas. Testes estatísticos: Teste t de Student não pareado (entre sham e hipertenso), ANOVA de uma via seguida de teste Tukey (entre os grupos hipertensos).

Figura 5 – Atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) no plasma dos animais durante as 10 semanas de estudo. Valores expressos como média $\pm$ EPM (n=12/grupo) * $P < 0,05$ para 2R-1C *versus* Sham. Testes estatísticos: Teste t de Student não pareado (entre sham e hipertenso), ANOVA de uma via seguida de teste Tukey (entre os grupos hipertensos).

1.2 - Análise do remodelamento vascular hipertrófico em animais 2R-1C durante as 10 semanas de hipertensão

Como pode ser observado na figura 6 houve um aumento significativo no número de células musculares lisas nos animais hipertensos em relação aos animais controles (figura 6 A e B; $P<0,05$). Esse aumento permaneceu desde a segunda semana de hipertensão arterial até a última semana do estudo. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos hipertensos ($P>0,05$) nas semanas avaliadas nesse estudo.

O aumento do número de células foi acompanhado de aumento significativo da razão M/L e na área de secção transversal (AST) nas aortas dos ratos 2R-1C (figura 6 C e D; $P<0,05$) quando comparado aos grupos controle. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos hipertensos ($P>0,05$) nas semanas avaliadas no estudo. Esse aumento da espessura da camada média observado nos animais hipertensos é característico de vasos de condutância, e é conhecido como remodelamento vascular hipertrófico.

Foi observada também uma deposição excessiva de fibras de colágeno (em verde) e de lâminas elásticas (em vermelho) na matriz extracelular das aortas de hipertensos 2R-1C. A deposição desses constituintes contribui para o aumento da rigidez dos vasos durante a hipertensão arterial (figura 7 A-D). A deposição de colágeno foi significativa a partir da segunda semana de hipertensão (figura 7 A e C $P<0,05$), e não foi encontrada diferença significativa entre os diferentes tempos de hipertensão ($P>0,05$). Diferente das demais alterações estruturais observadas, o aumento da elastina foi significativo apenas a partir da quarta semana de hipertensão (figura 7 B e D $P<0,05$). Entretanto, não foi encontrada diferença significativa entre os diferentes tempos de hipertensão ($P>0,05$).

Figura 6 – Alterações estruturais na aorta associadas à hipertensão 2R-1C. 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 grupos experimentais (B). Valores da área de secção transversal (AST) (C). Valores da razão média sobre lúmen (M/L) (D). Valores expressos como média $\pm$ EPM (n=6-8/grupo) * $P<0,05$ para grupos 2R-1C versus grupo controle (Sham). Testes estatísticos: Teste t de Student não pareado (entre sham e hipertenso), ANOVA de uma via seguida de teste Tukey (entre os grupos hipertensos).

Figura 7 – Deposição vascular de colágeno e de elastina durante as 10 semanas de hipertensão. Imagens ilustrativas, em 500x, da superfície de colágeno (A) e da superfície de elastina (B) na camada média das aortas referentes aos grupos experimentais. Representação gráfica da área da superfície de colágeno (C) e da área da superfície de elastina (D). Os dados estão representados como média $\pm$ EPM ($n = 6-8$ / grupo). * $P < 0,05$ grupos 2R-1C versus controle (Sham). Testes estatísticos: Teste t de Student não pareado (entre sham e hipertenso), ANOVA de uma via seguida de teste Tukey (entre os grupos hipertensos).

1.3 – Níveis vasculares de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de peroxidação lipídica plasmáticos durante o desenvolvimento da hipertensão 2R-1C

Foi observado um aumento significativo nos níveis de EROs na camada média da aorta dos animais hipertensos em relação aos controles, a partir da segunda semana de hipertensão. Esse aumento é observado pela intensidade de fluorescência vermelha produzida na reação do DHE com O_2^- (figura 8 A e B; $P<0,05$). Não foi observada diferença entre os tempos de hipertensão ($P>0,05$).

Estudos prévios do nosso laboratório mostraram que grande parte do superóxido formado nas aortas de animais 2R-1C provém do aumento na atividade da NAD(P)H oxidase (Montenegro, Amaral *et al.* 2011). Nesse trabalho, os animais hipertensos apresentaram um aumento significativo na atividade dessa enzima em comparação aos animais controle observado em todos os tempos estudados (figura 9 A; $P<0,05$). Não foi observada diferença entre os tempos de hipertensão ($P>0,05$). Esse aumento de atividade coincide com o aumento nos níveis de EROs vascular.

Quando se analisou os níveis de peroxidação lipídica plasmáticos, os animais hipertensos apresentaram aumento significativo nos níveis de MDA plasmáticos em comparação aos animais controle apenas na sexta e décima semana de hipertensão (figura 9 B; $P<0,05$). Houve diferença significativa entre esses dois tempos de hipertensão e os tempos de duas e quatro semanas após a cirurgia ($P<0,05$).

Figura 8 – Níveis vasculares de EROs durante a hipertensão 2R-1C. Fotografias representativas de aortas (x400) Incubadas com DHE (A). Representação gráfica da intensidade de fluorescência vermelha dos produtos da reação do DHE com O_2^- (B). Valores expressos como média $\pm$ EPM (n= 6-8/grupo) * $P < 0,05$ grupos 2R-1C versus controle (Sham). Testes estatísticos: Teste t de Student não pareado (entre sham e hipertenso), ANOVA de uma via seguida de teste Tukey (entre os grupos hipertensos).

A

B

Figura 9– Produção vascular de EROs e níveis de peroxidação lipídica plasmáticos durante a hipertensão 2R-1C. A atividade da enzima NAD(P)H oxidase vascular (A). Concentrações plasmáticas de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico em amostras de plasma, expressas na forma de malonaldeído (MDA) (B). Valores expressos como média $\pm$ EPM ($n=10-12$ /grupo). * $P<0,05$ grupos 2R-1C versus controle (Sham). ** $P<0,05$ para grupos 2R-1C versus 2R-1C de 2 semanas, de 4 semanas e controle. Testes estatísticos: Teste t de Student não pareado (entre sham e hipertenso), ANOVA de uma via seguida de teste Tukey (entre os grupos hipertensos).

1.4 – Atividade gelatinolítica e níveis de MMPs e de TIMP-2 durante o desenvolvimento da hipertensão 2R-1C

Zimogramas representativos dos extratos das aortas são apresentados na figura 10 A, que mostra o peso molecular das três bandas de MMP-2 (75 kDa, 72 kDa e 64 kDa). As aortas dos ratos 2R-1C de 6 e 10 semanas mostraram níveis aumentados das três formas de MMP-2 comparada com os grupos controle (figura 10 B, C e D; $P<0,05$). Na décima semana de hipertensão o aumento dos níveis de MMPs foi superior ao da segunda semana ($P<0,05$).

Para verificar se houve um aumento na atividade gelatinolítica dessas enzimas, realizou-se o ensaio de zimografia *in situ*. Essa atividade foi analisada como aumento da intensidade de fluorescência verde na camada média e endotélio das aortas dos animais (figura 11 A e B). Os animais hipertensos apresentaram maior intensidade de fluorescência verde já a partir da segunda semana de hipertensão comparado aos grupos controle (figura 11 A e B; $P<0,05$). Na décima semana de hipertensão o aumento da atividade gelatinolítica foi superior ao da segunda semana ($P<0,05$).

Para confirmar se a atividade gelatinolítica encontrada devia-se a MMP-2, realizou-se a imunomarcação das amostras de aorta com anticorpo anti-MMP-2, e as imagens foram sobrepostas. Os níveis dessa enzima foram analisados pela intensidade de fluorescência vermelha emitida no ensaio (figura 11 A e C). Os animais hipertensos apresentaram maior intensidade de fluorescência vermelha já a partir da segunda semana de hipertensão comparado aos grupos controle (figura 11 A e C; $P<0,05$). Na décima semana de hipertensão o aumento dos níveis de MMPs foi superior ao da segunda semana ($P<0,05$). Esse aumento coincide com o observado na atividade gelatinolítica.

Figura 10 – Níveis vasculares de MMP-2 durante a hipertensão 2R-1C. Gel representativo de zimografia SDS-PAGE de extrato de aorta (A). Os pesos moleculares das bandas de MMP-2 (75 kDa, 72 kDa e 64 kDa) foram identificados após eletroforese em gel a 12% SDS-PAGE. Pad.: padrão interno. Representação gráfica dos valores para peso molecular de 75 kDa, 72, e 64 KDa da MMP-2 no extrato de aorta (B, C e D, respectivamente). Valores expressos como média± EPM. (n=10-12/grupo) ** $P<0.05$ para grupos 2R-1C *versus* sham e 2R-1C de 2 semanas *** $P<0.05$ para grupos 2R-1C *versus* sham e demais grupos 2R-1C. Testes estatísticos: Teste t de Student não pareado (entre sham e hipertenso), ANOVA de uma via seguida de teste Tukey (entre os grupos hipertensos).

A

Figura 11 A- Atividade gelatinolítica *in situ* e níveis de MMP-2 nas aortas durante o desenvolvimento da hipertensão. Fotografias representativas de aortas (x400) incubadas com DQ gelatin, anticorpo anti-MMP-2 e sobreposição das imagens.

B

C

Figura 11 B e C- 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). Representação gráfica dos níveis de MMP-2, avaliada como intensidade de fluorescência vermelha (n=6-8/grupo) (C). Valores expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ para 2R-1C versus grupo controle (Sham). ** $P < 0,05$ para 2R-1C de 10 semanas versus controle e 2R-1C de 2 semanas. Testes estatísticos: Teste t de Student não pareado (entre sham e hipertenso), ANOVA de uma via seguida de teste Tukey (entre os grupos hipertensos).

Os níveis de MMP-2 também foram avaliados pelo método de imunohistoquímica. Na figura 12 houve um aumento significativo da expressão da MMP-2 nos grupos hipertensos a partir da segunda semana de hipertensão, quando comparado aos grupos controles (figura 12 A e B; $P<0,05$). A décima semana de hipertensão apresentou maiores níveis de MMPs quando comparada à segunda e à quarta semana ($P<0,05$). Esse resultado coincide com o aumento na atividade gelatinolítica.

Os níveis de MMP-14 foram avaliados pela mesma metodologia. Pode-se observar que, na figura 13, houve um aumento significativo da expressão da MMP-14 nos grupos hipertensos a partir da segunda semana de hipertensão, quando comparado aos controles (figura 13 A e B; $P<0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos hipertensos ($P>0,05$).

Não foram observadas alterações na expressão do TIMP-2 entre os grupos experimentais por imunohistoquímica (figura 14 A e B; $P>0,05$). Já as razões MMP-2/TIMP-2 e MMP-14/TIMP-2 foram maiores para os animais hipertensos de seis e dez semanas quando comparadas aos controles (figura 14 C; $P<0,05$).

Além disso, fizemos análise de correlação da maioria dos resultados. Encontramos correlações significativas entre parâmetros bioquímicos e histológicos, como detalhado na Tabela 1.

A

B

Figura 12- Expressão da MMP-2 em aortas durante o desenvolvimento da hipertensão. Fotografias representativas (x400) da expressão de MMP-2 em marrom na camada média e endotélio das aortas dos grupos experimentais (A). Representação gráfica da expressão de MMP-2, quantificada analisando a intensidade de marrom (B). Valores expressos como média $\pm$ EPM. (n=6/grupo) * $P < 0,05$ para 2R-1C versus controle. *** $P < 0,05$ para 2R-1C de 10 semanas versus controle, 2R-1C 2 semanas e 2R-1C 4 semanas. Testes estatísticos: Teste t de Student não pareado (entre sham e hipertenso), ANOVA de uma via seguida de teste Tukey (entre os grupos hipertensos).

A

B

Figura 13- Expressão do MMP-14 em aortas durante o desenvolvimento da hipertensão. Fotografias representativas (x400) da expressão de MMP-14 em marrom na camada média e endotélio das aortas dos grupos experimentais (A). Representação gráfica da atividade da expressão de MMP-14, quantificada analisando a intensidade de marrom (B). Valores expressos como média± EPM. (n=6/grupo) * $P<0,05$ para 2R-1C *versus* controle. Testes estatísticos: Teste t de Student não pareado (entre sham e hipertenso), ANOVA de uma via seguida de teste Tukey (entre os grupos hipertensos).

Figura 14- Expressão do TIMP-2 em aortas durante o desenvolvimento da hipertensão. Fotografias representativas (x400) da expressão de TIMP-2 em marrom na camada média e endotélio das aortas dos grupos experimentais (A). Representação gráfica da expressão de TIMP-2, quantificada analisando a intensidade de marrom (B). Representação gráfica da razão MMP-2/TIMP-2 e MMP-14/TIMP-2 em aortas durante o desenvolvimento da hipertensão (C). Valores expressos como média $\pm$ EPM. (n=6/grupo) * $P < 0,05$ para 2R-1C *versus* controle. ** $P < 0,05$ para 2R-1C *versus* 2R-1C de 2 semanas e controle. *** $P < 0,05$ para 2R-1C *versus* controle e 2R-1C de 2 e 4 semanas. Testes estatísticos: Teste t de Student não pareado (entre sham e hipertenso), ANOVA de uma via seguida de teste Tukey (entre os grupos hipertensos).

Tabela 1 - Correlações de Pearson (coeficiente r e valor de P) para associações entre parâmetros histológicos e bioquímicos avaliados nos diferentes tempos do estudo.

Correlação	CSA	Colágeno	Elastina	MMP-2	DHE	NAD(P)H	MDA
Colágeno	$r = 0.621$ $P = 0.131$						
Elastina	$r = 0.959$ $P = 0.005$	$r = 0.812$ $P = 0.047$					
MMP-2	$r = 0.866$ $P = 0.029$	$r = 0.397$ $P = 0.254$	$r = 0.794$ $P = 0.054$				
DHE	$r = 0.524$ $P = 0.182$	$r = 0.973$ $P = 0.003$	$r = 0.742$ $P = 0.075$	$r = 0.366$ $P = 0.272$			
NAD(P)H	$r = 0.805$ $P = 0.097$	$r = 0.980$ $P = 0.010$	$r = 0.881$ $P = 0.060$	$r = 0.410$ $P = 0.295$	$r = 0.997$ $P = 0.001$		
MDA	$r = 0.813$ $P = 0.047$	$r = 0.598$ $P = 0.144$	$r = 0.832$ $P = 0.040$	$r = 0.947$ $P = 0.007$	$r = 0.609$ $P = 0.138$	$r = 0.446$ $P = 0.277$	
Atividade Gelatinolítica	$r = 0.982$ $P = 0.001$	$r = 0.721$ $P = 0.085$	$r = 0.988$ $P = 0.001$	$r = 0.857$ $P = 0.032$	$r = 0.657$ $P = 0.114$	$r = 0.813$ $P = 0.0093$	$r = 0.86$ $P = 0.030$

AST = área de secção transversal; Colágeno = superfície de colágeno;
 Elastina = superfície de elastina; MMP-2 = níveis de MMP-2;
 DHE = fluorescência do dihidroetídeo; NAD(P)H = atividade da NAD(P)H oxidase;
 MDA = concentrações plasmáticas de malonaldeído;
 Atividade Gelatinolítica = atividade gelatinolítica na camada média.

1.5 – Efeito da Angiotensina II nos níveis de estresse oxidativo e na atividade gelatinolítica in situ na aorta de animais controle

Realizamos esses ensaios na tentativa de validar experimentalmente a idéia que EROs podem ativar MMPs, no contexto de níveis aumentados de angiotensina II, como ocorre no modelo de hipertensão renovascular 2R-1C.

Observou-se o aumento temporal dos níveis de EROs nas aortas de animais controle (Sham) incubadas com DHE na presença de angiotensina II (figura 15 A-B; $P<0,05$) em comparação aos controles incubados apenas com DHE (as observações foram realizadas em um tempo de 30 minutos). Este aumento na intensidade de fluorescência vermelha foi abolido quando as aortas foram previamente incubadas com apocinina (APO) ($P<0,05$). Isso sugere que o aumento na intensidade de fluorescência foi causado por um aumento da atividade da NAD(P)H oxidase vascular.

Além disso, foi observado o aumento temporal da atividade gelatinolítica nas aortas de animais controle (Sham) incubadas com DQ-Gelatin na presença de angiotensina II (figura 16 A-B; $P<0,05$) em comparação aos controles incubados apenas com DQ-Gelatin (observações realizadas em 30 minutos). Este aumento na intensidade de fluorescência verde foi abolido quando as aortas foram previamente incubadas com apocinina (APO), ou com o inibidor de MMPs fenantrolina (FEN) ($P<0,05$). Esses ensaios sugerem que o aumento vascular de EROs após incubação com a angiotensina II foi associado ao aumento da atividade gelatinolítica na aorta.

Figura 15 - Avaliação temporal de níveis de EROs *in situ*, observados na presença e na ausência de angiotensina II. Fotografias representativas de aortas (x400) incubadas com DHE (10µmol/L), DHE na presença de angiotensina II (ANG II – 1µmol/L), de apocinina (APO - 10µmol/L), ou da associação dessas drogas (A). Representação gráfica da intensidade de fluorescência vermelha dos produtos da reação do DHE com O_2^- (B). Valores expressos como média± EPM (n= 6/grupo) * $P<0,05$ para DHE+ANGII *versus* outros grupos. ANOVA de uma via seguida de teste Tukey.

Figura 16 A - Avaliação temporal da atividade gelatinolítica *in situ*, observada na presença e na ausência de angiotensina II. Fotografias representativas de aortas (x400) incubadas com DQ-gelatin (DQ - 1µg/ml), DQ na presença de angiotensina II (ANG II - 1µmol/L), de apocinina (APO - 10µmol/L), de fenantrolina (FEN - 50µmol/L), ou da associação dessas drogas.

B

Figura 16 B - Representação gráfica da atividade gelatinolítica *in situ*, em que a intensidade de fluorescência verde reflete a atividade enzimática via degradação da gelatina (fluoróforo). Valores expressos como média $\pm$ EPM ($n= 6/\text{grupo}$) * $P<0,05$ para DQ+ANGII *versus* outros grupos. ANOVA de uma via seguida de teste Tukey.

2 - PROTOCOLO 2: Tratamento crônico com nebivolol atenua o remodelamento vascular hipertrófico da hipertensão renovascular 2-rins, 1-clipe

2.1 – Efeitos dos tratamentos com metoprolol e nebivolol na pressão arterial sistólica e peso corporal na hipertensão 2R-1C

Os valores basais de pressão arterial sistólica e peso corporal foram similares nos seis grupos experimentais antes da cirurgia. Entretanto, logo na primeira semana após o procedimento cirúrgico, a pressão sistólica aumentou no grupo 2R-1C quando comparado ao grupo controle (figura 17 A; $P < 0,05$). Não foram observadas mudanças significativas do tratamento com nebivolol ou metoprolol sobre a pressão nos grupo controles, porém os animais hipertensos tratados com as drogas apresentaram queda da pressão arterial em relação ao grupo de hipertensos logo na primeira semana de tratamento ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa na queda da pressão arterial entre os dois tratamentos ($P > 0,05$).

Não houve diferença significativa no ganho de peso entre os seis grupos experimentais durante o período estudado (figura 17B; $P > 0,05$).

A

B

Figura 17 – Efeitos dos tratamentos sobre a pressão arterial sistólica e sobre o peso corporal na hipertensão 2R-1C. Valores de pressão medidos por pletismografia de cauda na hipertensão 2R-1C (A). Peso corporal em gramas (B). Valores expressos como média $\pm$ EPM ($n=12$ /grupo) * $P<0,05$ para 2R-1C+veículo *versus* todos os grupos sham. ** $P<0,05$ para 2R-1C+Nebi e 2R-1C+ Meto *versus* grupo 2R-1C+veículo e grupos controles. Teste estatístico: ANOVA de uma ou duas vias seguido de teste Tukey.

2.2 – Efeitos dos tratamentos com metoprolol e nebivolol sobre o remodelamento vascular hipertrófico na hipertensão 2R-1C

Como pode ser observado na figura 18, os animais hipertensos apresentaram maior número de células musculares lisas vasculares em relação aos controles. (Figura 18 A-B; $P<0,05$). Do mesmo modo, os animais hipertensos apresentaram aumento significativo da razão M/L e na área de secção transversal (AST) das aortas quando comparados aos grupos controles (figura 18 C-D; $P<0,05$). Esses resultados caracterizam o remodelamento vascular como hipertrófico, que é característico de artérias de condutância.

O tratamento com nebivolol foi capaz de reverter essas alterações estruturais nos animais hipertensos, sem alterar a morfologia da aorta dos animais controles (Figura 18 A-C; $P<0,05$). No entanto, o tratamento com metoprolol não reverteu as alterações observadas nos animais hipertensos e nos controles (Figura 18 A-C; $P>0,05$).

Figura 18 - Efeitos dos tratamentos sobre as alterações estruturais da aorta associadas à hipertensão 2R-1C. 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 grupos experimentais (B). Valores da área de secção transversal (AST) (C). Valores da razão média sobre lúmen (M/L) (D). Valores expressos como média± EPM (n=6-8/grupo) * $P<0,05$ para grupos 2R-1C versus grupo controle (Sham). ** $P<0,05$ para 2R-1C+Nebi versus grupo 2R-1C+veículo. Teste estatístico: ANOVA de duas vias seguido de teste Tukey.

2.3 – Efeitos dos tratamentos com metoprolol e nebivolol sobre os níveis vasculares de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de peroxidação lipídica plasmáticos na hipertensão 2R-1C

Na figura 19 observa-se um aumento significativo dos níveis de EROs na camada média das aortas dos animais hipertensos tratados em relação aos controles (figura 19; $P < 0,05$). O tratamento com nebivolol foi capaz de atenuar esses níveis ($P < 0,05$). No entanto, o tratamento com metoprolol não alterou os níveis de EROs observados na hipertensão ($P > 0,05$).

Dado que o nebivolol possui importantes efeitos antioxidantes *in vivo*, principalmente pela redução da expressão das subunidades da NAD(P)H oxidase vascular, e devido ao fato de uma redução nos níveis de EROs ter sido observada após o tratamento com a droga no modelo 2R-1C de hipertensão, optou-se por investigar a atividade da NAD(P)H oxidase na aorta dos animais desse estudo. Observou-se que os animais hipertensos possuem um aumento na atividade dessa enzima em comparação aos animais controle (figura 20 A; $P < 0,05$). O tratamento com nebivolol foi capaz de atenuar a atividade da NAD(P)H oxidase ($P < 0,05$), enquanto o tratamento com metoprolol não alterou a atividade da enzima observada nos animais hipertensos ($P > 0,05$).

Quando se analisou os níveis de peroxidação lipídica plasmáticos, o grupo de animais hipertensos apresentou um aumento nos níveis de MDA plasmáticos em comparação aos animais controle (figura 20 B; $P < 0,05$) que foi atenuado apenas pelo tratamento com nebivolol ($P < 0,05$).

Também foi realizada a análise de níveis de nitrotirosina *in situ*, método utilizado como medida indireta de formação do radical peroxinitrito, que pode contribuir a ativação da MMP-2, conforme descrito anteriormente.

Figura 19 – Efeito dos tratamentos nos níveis de EROs vasculares na hipertensão 2R-1C. Fotografias representativas de aortas (x400) incubadas com DHE (A). Representação gráfica da intensidade de fluorescência vermelha dos produtos da reação do DHE com O_2^- (B). Valores expressos como média $\pm$ EPM (n=6-8/grupo). * $P < 0,05$ para 2R-1C+veículo *versus* grupos controle. ** $P < 0,05$ para 2R-1C+Nebi *versus* 2R-1C+veículo. Teste estatístico: ANOVA de duas vias seguido de teste Tukey.

A

B

Figura 20 – Efeito dos tratamentos na produção vascular de EROs e níveis de peroxidação lipídica plasmáticos na hipertensão 2R-1C. A atividade da enzima NAD(P)H oxidase vascular (A). Concentrações plasmáticas de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico em amostras de plasma, expressas na forma de malonaldeído (MDA) (B). Valores expressos como média± EPM (n=6-8/grupo). * $P<0,05$ para 2R-1C+veículo *versus* grupos controle. ** $P<0,05$ para 2R-1C+Nebi *versus* 2R-1C+veículo. Teste estatístico: ANOVA de duas vias seguido de teste Tukey.

Na figura 21 observa-se um aumento significativo dos níveis de nitrotirosina nas aortas dos animais hipertensos em relação aos animais controles (figura 21; $P<0,05$). Apenas o tratamento com nebivolol foi capaz de atenuar esses níveis ($P<0,05$).

2.4 – Efeitos dos tratamentos com metoprolol e nebivolol sobre os níveis e atividade de MMP-2 vasculares na hipertensão 2R-1C

Um zimograma representativo dos extratos das aortas é apresentado na figura 22, que mostra o peso molecular das três bandas de MMP-2 (75 kDa, 72 kDa, e 64 kDa). As aortas dos ratos 2R-1C mostram níveis aumentados das três formas de MMP-2 quando comparadas com os grupos controle (figura 22 A-E; $P<0,05$). Os tratamentos com metoprolol e com nebivolol não atenuaram o aumento induzido pela hipertensão na MMP-2 de 75 kDa, 72 kDa (figura 22 B e C; $P>0,05$). Porém, o tratamento com nebivolol atenuou o aumento na MMP-2 de 64 kDa e na MMP-2 total (figura 22 D e E; $P<0,05$).

Para verificar se houve um aumento na atividade gelatinolítica das MMPs foi realizado ensaio de zimografia *in situ*, que é quantificado pelo aumento da intensidade de fluorescência verde na camada média e endotélio das aortas dos animais. O grupo hipertenso apresentou maior intensidade de fluorescência verde comparado aos grupos controle (figura 23 A e B; $P<0,05$). Apenas o tratamento com nebivolol resultou em menor atividade gelatinolítica ($P<0,05$).

Figura 21 – Efeito dos tratamentos nos níveis de nitrotirosina vasculares na hipertensão 2R-1C. Fotografias representativas (x400) da expressão de nitrotirosina em marrom na camada média e endotélio dos grupos experimentais (A). Representação gráfica da expressão de nitrotirosina, quantificada analisando a intensidade de marrom (B). Valores expressos como média $\pm$ EPM (n=6-8/grupo). * $P < 0,05$ para 2R-1C+veículo *versus* grupos controle. ** $P < 0,05$ para 2R-1C+Nebi *versus* 2R-1C+veículo. Teste estatístico: ANOVA de duas vias seguido de teste Tukey.

Para confirmar se o aumento da atividade encontrada devia-se a ação gelatinolítica da MMP-2, realizou-se a imunomarcação das amostras de aorta com anticorpo anti-MMP-2 e a sobreposição das imagens. A quantificação dos níveis dessa enzima foi analisada pela intensidade de fluorescência vermelha emitida no ensaio. Os animais 2R-1C apresentaram maiores níveis de MMP-2 em comparação aos animais controle (figura 23 A e C; $P<0,05$), e apenas os animais hipertensos tratados com Nebivolol apresentaram níveis reduzidos de MMP-2 ($P<0,05$).

2.5 – Efeitos de diferentes concentrações de metoprolol e nebivolol sobre a atividade da MMP-2 recombinante humana *in vitro*

Tanto o Metoprolol quanto o Nebivolol não foram capazes de alterar a atividade da MMP-2 recombinante humana quando presentes nas concentrações de 0,001 a 10 mmol/L (figura 24; $P>0,05$). A fenantrolina (FEN), conhecido inibidor de metaloproteinases, na concentração de 50 μ mol/L inibiu completamente a atividade da enzima recombinante ($P<0,05$).

Figura 22 – Efeito dos tratamentos sobre os níveis de MMP-2 vasculares na hipertensão 2R-1C. Gel representativo de zimografia SDS-PAGE de extrato de aorta (A). Os pesos moleculares das bandas de MMP-2 (75 kDa, 72 kDa e 64 kDa) foram identificados após eletroforese em gel a 12% SDS-PAGE. Padrão interno. Representação gráfica dos valores para cada peso molecular da MMP-2 nos extratos de aorta (B-D) e somatório das três bandas de MMP-2 (E). Valores expressos como média ± EPM. (n=10-12/grupo) * $P < 0,05$ para 2R-1C+veículo *versus* os grupos controle. ** $P < 0,05$ para 2R-1C+Nebi *versus* 2R-1C+veículo. Teste estatístico: ANOVA de duas vias seguido de teste Tukey.

A

Figura 23 A- Efeito dos tratamentos na atividade gelatinolítica *in situ* e nos níveis de MMP-2 vasculares na hipertensão 2R-1C. Fotografias representativas de aortas (x400) incubadas com DQ gelatin e anticorpo anti-MMP-2.

Figura 23 B e C - 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). Representação gráfica dos níveis de MMP-2, avaliada como intensidade de fluorescência vermelha (n=6-8/grupo) (C). Valores expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ para 2R-1C+veículo *versus* grupos controle. ** $P < 0,05$ para 2R-1C+Nebi *versus* 2R-1C+veículo. Teste estatístico: ANOVA de duas vias seguido de teste Tukey.

Figura 24- Efeito de diferentes concentrações de metoprolol e nebivolol (0,001 a 10 mmol/L) sobre a atividade da MMP-2 recombinante humana *in vitro*. Fenantrolina (FEN) foi utilizada na concentração de 50 μ mol/L como controle positivo de inibição da MMP-2. Valores expressos como média $\pm$ EPM (n=4/grupo). * $P<0,05$ versus veículo. Teste estatístico: ANOVA de uma via seguido de teste Tukey.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

No presente trabalho mostramos que o remodelamento vascular hipertrófico associado à hipertensão 2R-1C se estabelece nos estágios iniciais da hipertensão com, aumento da deposição de colágeno e elastina e proliferação celular na camada média das aortas. Essas alterações morfológicas foram acompanhados pelo aumento da atividade da NAD(P)H oxidase vascular, dos níveis de EROs e concomitante aumento dos níveis de MMP-2 e MMP-14 vascular, sem alteração dos níveis de TIMP-2, inibidor tecidual das enzimas. Além disso, o tratamento de animais hipertensos com os antagonistas do receptor β_1 -adrenérgico nebivolol e metoprolol produziu efeitos anti-hipertensivos equivalentes, enquanto apenas o tratamento com nebivolol reverteu as alterações vasculares estruturais, normalizou o aumento do estresse oxidativo, dos níveis de MMP-2 e da atividade gelatinolítica.

Esse foi o primeiro estudo a avaliar as mudanças temporais no remodelamento vascular hipertrófico durante o estabelecimento da hipertensão 2R-1C, com enfoque nas alterações da matriz extracelular, na proliferação celular, na atividade e nos níveis das proteases MMP-2 e MMP-14 e nos níveis de TIMP-2 e de EROs. Do mesmo modo esse trabalho avaliou pela primeira vez os efeitos do tratamento com nebivolol sobre a atividade das MMPs *in vivo*.

Sabe-se que o aumento da pressão arterial leva ao estiramento arterial e estimula espessamento dos vasos para normalizar a tensão exercida na parede. Esse processo de remodelamento vascular envolve a participação de proteases extracelulares, que modificam a MEC e as interações célula-matriz, levando ao enrijecimento vascular (Galis e Khatri 2002; Lehoux, Lemarie et al. 2004; Lemarie, Tharaux et al. 2010).

Conforme descrito anteriormente, diversos estudos têm demonstrado que a rigidez arterial está associada a maiores taxas de morbidade e mortalidade nas doenças cardiovasculares como a hipertensão (Laurent, Boutouyrie et al. 2001; Laurent, Katsahian et al. 2003; Cunha 2004), embora as grandes artérias não contribuam para a resistência vascular periférica. Esse enrijecimento vascular, que permite às artérias resistir aos aumentos de pressão iniciais, resulta em vasos com reduzida capacidade para amortecer as alterações cíclicas da pressão arterial cronicamente. Os fragmentos de colágeno e elastina, que inicialmente reforçam a parede do vaso, com o tempo interrompem a organização MEC (Dao, Lemay et al. 2001; Humphrey 2008; Lemarie, Tharaux et al. 2010). A MEC é composta principalmente de colágeno tipo I e III, elastina e proteoglicanos. Essas proteínas desempenhar um papel importante na manutenção da estrutura da embarcação proporcionando resistência à tração (colágeno) e elasticidade (elastina) (Dao, Lemay et al. 2001).

Nesse estudo, encontramos um aumento da superfície de colágeno a partir da segunda semana de hipertensão, até o final do estudo. Observamos também o aumento da superfície de elastina, embora nesse caso só seja evidente a partir da quarta semana de hipertensão. Outras alterações morfológicas observadas na aorta de nossos animais foram aumento do número de células na camada média, resultando em aumento da AST e da razão M/L, o que ocorreu a partir da segunda semana de hipertensão e se manteve durante todas as outras semanas do estudo. Esses resultados são característicos do remodelamento hipertrófico de artérias de condutância (Duprez 2006). Esses resultados confirmam e complementam resultados anteriores, que mostram um aumento nesses parâmetros apenas em

uma fase crônica da hipertensão 2R-1C (Castro, Rizzi et al. 2009; Ceron, Castro et al. 2010; Cau, Guimaraes et al. 2011; Guimaraes, Rizzi et al. 2011).

Esse processo de remodelamento vascular observado pode resultar da interação de vários mecanismos. O papel das MMPs no remodelamento vascular tem sido extensivamente avaliado, e as gelatinases, MMP-2 e MMP-9, parecem ser as principais envolvidas em desordens vasculares (Intengan e Schiffrin 2001; Newby 2006). As gelatinases clivam os principais constituintes da MEC, como o colágeno tipo IV, constituinte da lâmina basal, laminina e elastina. Como as células musculares lisas vasculares encontram-se ancoradas na MEC, mudanças na organização da estrutura fibrilar dessa matriz podem contribuir para o remodelamento da parede arterial (Lemarie, Tharaux et al. 2010).

Nesse sentido, a proteólise dos componentes da matriz facilita o processo pró-fibrótico por liberar fatores biológicos ativos e matricinas que estimulam a síntese e deposição de mais matriz extracelular, promovendo proliferação e migração de células musculares lisas, e hipertrofia celular (Li, McTiernan et al. 2000; Intengan e Schiffrin 2001; Lehoux, Lemarie et al. 2004; Bouvet, Gilbert et al. 2005). Nosso estudo reforça essas observações, pois observamos que o aumento da atividade da MMP-2 ocorreu concomitante à proliferação celular e ao aumento da deposição de colágeno e elastina nos animais hipertensos.

Estudos sugerem que as MMPs também podem exercer funções adicionais no remodelamento cardiovascular. Os produtos de degradação das proteínas da matriz pelas MMPs podem funcionar como quimioatrativos para células inflamatórias, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos. As MMPs também podem ativar citocinas e fatores de crescimento tecidual, estão envolvidos na ativação de fibroblastos e a hipertrofia (Panek e Bader 2006).

Em modelos animais de hipertensão, as MMPs são reconhecidas como o participantes importantes do remodelamento vascular (Flamant, Placier et al. 2007; Watts, Rondelli et al. 2007). Dando suporte a essa idéia, nós encontramos nesse estudo um aumento na expressão vascular MMP-2 e MMP-14 nos animais hipertensos. De forma similar aos nossos resultados, o aumento da MMP-2 foi associado às alterações vasculares estruturais e funcionais na fase crônica do modelo 2R-1C (Castro, Rizzi et al. 2008; Castro, Rizzi et al. 2009), assim como em diferentes modelos animais de hipertensão (Bouvet, Gilbert et al. 2005; Watts, Rondelli et al. 2007). Níveis plasmáticos aumentados de MMP-2 também foram encontrados em pacientes hipertensos (Derosa, D'Angelo et al. 2006; Martinez, Lopes et al. 2006).

No presente estudo, encontramos um aumento nos níveis de MMP-2 por imuno-histoquímica e imunofluorescência na fase inicial da hipertensão 2R-1C (2 semanas), embora nossos zimogramas mostraram um aumento nos níveis de MMP-2 apenas com 6 semanas de hipertensão. Do mesmo modo, encontramos aumento gelatinolítica vascular actividade nos primeiros estágios de hipertensão (2 semanas). Conforme descrito na introdução, as MMPs ativadas são capazes de auto-ativação, promovendo aumentos posteriores nos níveis de MMPs (Schulz 2007; Kandasamy, Chow et al. 2010). Assim, é possível que as MMPs estejam sendo ativadas no estágio inicial da hipertensão, embora os níveis de MMPs podem não aumentar tanto nas fases iniciais. Além disso, é amplamente descrito que o aumento progressivo dos níveis e da atividade das MMPs e pode levar a uma re-síntese protéica (Willis, Pierre-Paul et al. 2004; Newby 2006), justificando desse modo o acúmulo de elastina observado apenas cronicamente no presente estudo no modelo 2R-1C de hipertensão.

Além dos níveis de MMP-2, foram analisados também os níveis de MMP-14 e TIMP-2 por imunohistoquímica no tecido. De acordo com o observado em um trabalho anterior que mostra um aumento de MMP-2 e MMP-14 na fase crônica da hipertensão renovascular (Ceron, Castro et al. 2010), nossos resultados mostraram um aumento de MMP-2 e MMP-14 na camada íntima e média da aorta. Porém observamos que estes níveis estão aumentados desde a segunda semana após a cirurgia até a décima semana de hipertensão. O aumento da MMP-14 tem sido associado com a promoção de migração e proliferação de células do músculo liso vascular (Filippov, Koenig et al. 2005).

Conforme descrito anteriormente, as MMPs podem ser reguladas pela interação com seus inibidores endógenos (TIMPs). O TIMP-2 é um membro da família de TIMPs que têm sido caracterizado em vasos de animais hipertensos (Castoldi, di Gioia et al. 2007). Neste trabalho, não houve diferença nos níveis de TIMP-2 entre os animais sham e hipertensos.

Embora os níveis de TIMP-2 não se alterem no decorrer da hipertensão, o aumento encontrado nos níveis de MMP-2 e MMP-14 ocasionaram, principalmente, na sexta e na décima semana de hipertensão um desequilíbrio nas razões MMP-2:TIMP-2 e MMP-14:TIMP-2, e como os TIMPs são importantes inibidores das MMPs, é possível que esse desequilíbrio que tenha sido um dos responsáveis pelo aumento ainda mais evidente da atividade gelatinolítica *in situ* e no dos animais hipertensos nas últimas semanas do estudo. Além disso, estudos sugerem que a MMP-14 pode se complexar com o TIMP-2 e esse complexo pode atuar como um participante importante da ativação da MMP-2 (Spinale 2007; Murphy e Nagase 2008). Essa associação foi realizada inclusive na fase crônica de hipertensão do modelo 2R-1C. (Ceron, Castro et al. 2010).

Embora o aumento dos níveis da atividade da MMP-2 tenha sido relatado em diferentes modelos animais de hipertensão, e mesmo no modelo 2R-1C (Lehoux, Lemarie et al. 2004; Bouvet, Gilbert et al. 2005; Castro, Rizzi et al. 2008; Castro, Rizzi et al. 2009), nossos resultados mostram para a primeira vez que um aumento vascular MMP-2 e MMP-14, sem mudanças significativas na expressão de TIMP-2, nas fases iniciais da Hipertensão 2R-1C.

Conforme descrito na introdução, as MMPs também podem ser ativadas pós-traducionalmente por EROs (Okamoto, Akaike et al. 2001; Viappiani, Nicolescu et al. 2009; Kandasamy, Chow et al. 2010). Estudos mostram que o estresse oxidativo também pode ativar fibroblastos, levando ao aumento da atividade das MMPs na matriz extracelular (Siwik, Pagano et al. 2001). Somado a isso, células da musculatura lisa vascular incubadas com angiotensina II apresentam atividade da NAD(P)H oxidase aumentada, assim como uma elevação no RNAm para MMP-2 (Luchtefeld, Grote et al. 2005). Estes resultados são consistentes com a noção de que, na hipertensão arterial, espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na remodelação vascular através da ativação de MMPs.

Diante dessas evidências, avaliamos nesse estudo os níveis de estresse oxidativo. EROs têm demonstrado um papel importante no processo de remodelação associada a fase crônica da hipertensão 2R-1C (Oliveira-Sales, Dugaich et al. 2008; Castro, Rizzi et al. 2009; Ceron, Castro et al. 2010). Nossos resultados mostram um aumento da atividade da NAD(P)H oxidase vascular nesses animais desde a segunda semana de hipertensão 2R-1C até a última semana do estudo. Esse resultado foi associado com uma maior produção do ânion superóxido *in situ* observada pelo método de DHE. Esses resultados confirmam e complementam trabalhos anteriores que mostram aumento da atividade da NAD(P)H

oxidase cronicamente nesse modelo de hipertensão (Ceron, Castro et al. 2010; Montenegro, Amaral et al. 2011).

Adicionalmente, os níveis plasmáticos de MDA foram aumentados nos animais hipertensos, mas apenas na sexta e na décima semana de hipertensão. Esse fato pode ser explicado pela falta de especificidade da técnica de TBARS. O TBA reage com uma grande variedade de compostos, como açúcares, aminoácidos, uma variedade de aldeídos e bilirrubina, produzindo interferência nos ensaios colorimétricos e medições fluorimétricas do MDA (Knight, Pieper et al. 1988; Valenzuela 1991). Nossos resultados são consistentes com trabalhos anteriores que mostram um aumento de EROs em estágio crônico de hipertensão renovascular (Oliveira-Sales, Dugaich et al. 2008; Salguero, Akin et al. 2008; Castro, Rizzi et al. 2009; Campos, Oliveira-Sales et al. 2010).

Estudos anteriores mostraram que a MMP-2 é ativado por EROs (Luchtefeld, Grote et al. 2005; Kandasamy, Chow et al. 2010). Nesse sentido, nossos resultados reforçam a idéia de que o aumento na atividade da NAD(P)H oxidase e níveis de EROs nas semanas iniciais da hipertensão possam levar ao aumento da atividade gelatinolítica das MMPs observado no mesmo período. Somando-se a esses dados, encontramos correlações significativas entre os parâmetros histológicos e bioquímicos, conforme detalhado anteriormente na Tabela 1. Essas análises incluíram medições realizadas de diferentes tempos de hipertensão, e algumas medidas que refletem hipertrofia vascular correlacionada com os níveis de MMP-2, estresse oxidativo e atividade gelatinolítica. É relevante notar que, enquanto algumas medidas não se correlacionaram com outras, a maioria das medidas apresentam resultados significativos, ou, pelo menos, tendiam a correlacionar. Essa análise de correlação dá um maior suporte à idéia de que o aumento do estresse

oxidativo pode ativar as MMPs, que promovem o remodelamento vascular observado na hipertensão 2R-1C, nesse trabalho.

Sabe-se que a hipertensão 2R-1C é caracterizada por ativação do sistema renina-angiotensina (SRA). Descrevendo o SRA de modo simplificado, a renina, produzida após queda na perfusão renal, converte o angiotensinogênio em angiotensina I. A angiotensina I é convertida em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina (ECA), e exerce seus efeitos vasoconstritores e de proliferação celular. Diversos trabalhos mostram que há um aumento da atividade da ECA plasmática e tecidual no modelo 2R-1C de hipertensão que contribuem para a manutenção da hipertensão por longos períodos. (Martinez-Maldonado 1991; Sharifi, Akbarloo et al. 2003; Ceroni, Moreira et al. 2010). De acordo com esses resultados, nós encontramos um aumento da pressão arterial nos animais hipertensos, que foi acompanhado da elevação da atividade da ECA no plasma dos animais 2R-1C. No entanto, a atividade da ECA não foi diferente entre animais hipertensos e controles na décima semana de hipertensão. Esses resultados sugerem uma maior participação do sistema renina-angiotensina na fase inicial da hipertensão 2R-1C. Todavia não se pode descartar a participação do sistema renina-angiotensina tecidual, que não foi avaliado nesse estudo, no desenvolvimento e manutenção da hipertensão 2R-1C.

O SRA tecidual é caracterizado pela presença de todos os componentes do SRA circulante (renina, angiotensinogênio, ECA, angiotensina I, angiotensina II, e receptores de angiotensina), e sua existência tem sido demonstrada no tecido cardíaco, nos rins, nos vasos sanguíneos, no tecido adiposo, entre outros. Nos vasos sanguíneos, a presença de ECA, de angiotensina I e de angiotensina II tem sido amplamente descrita, mas ainda não se sabe se a renina é produzida

localmente ou se é absorvida a partir da circulação (Nguyen Dinh Cat e Touyz 2011). O papel exato do SRA circulante versus o SRA vascular na manutenção da pressão sanguínea não está totalmente elucidado. Alguns estudos sugerem que o SRA vascular participa da manutenção da hipertensão 2R-1C em sua fase crônica, enquanto outros sugerem que apenas o SRA circulante é importante nessa manutenção (Okamura, Miyazaki et al. 1986; Samani, Brammar et al. 1991). Nesse modelo de hipertensão, foi demonstrado o aumento da atividade da ECA na aorta e nas artérias mesentéricas (Okamura, Miyazaki et al. 1986). Além disso, níveis aumentados de angiotensina II e aumento da atividade da ECA foram observados no tecido renal na fase aguda e crônica da hipertensão 2R-1C (Morishita, Higaki et al. 1991; Michel, Grima et al. 1994; Navar, Harrison-Bernard et al. 1999; Sadjadi, Puttaparthi et al. 2002; Bivol, Berge et al. 2007).

No intuito de validar experimentalmente essa idéia de que EROs podem ativar MMPs, encontramos aumento vascular de EROs na camada média da aorta de animais normotensos incubados com angiotensina II. Esse aumento foi associado com aumento da atividade gelatinolítica, e ambos foram inibidos por incubação prévia com apocinina, um inibidor da NAD(P)H oxidase.

Frente a todas essas observações, nossos resultados sugerem que o aumento inicial do estresse oxidativo ativa as MMPs, essas enzimas ativadas são capazes de auto-ativação, promovendo aumentos posteriores nos níveis de MMPs, podendo levar a uma re-síntese protéica, resultando no acúmulo de colágeno e de elastina observado cronicamente nesse modelo de hipertensão.

Após essa análise das alterações vasculares hipertróficas que ocorrem no modelo 2R-1C de hipertensão, iniciamos o tratamento de animais hipertensos com os antagonistas do receptor β_1 adrenérgico metoprolol e nebivolol.

Sabe-se que a produção de renina, importante para o desenvolvimento da hipertensão 2R-1C, acontece em parte via receptores β_1 -adrenérgicos. Trabalhos demonstram que os níveis plasmáticos de renina estão aumentados até a quarta semana após a indução desse modelo de hipertensão. Já as ações exercidas pela angiotensina II continuam elevadas até a oitava semana, contribuindo para a manutenção do quadro hipertensivo (Martinez-Maldonado 1991). Dados do nosso laboratório mostram que a atividade da renina plasmática dos animais 2R-1C encontra-se igual a dos animais controles na sexta semana de hipertensão (Martins-Oliveira, Castro et al. 2012). Como o metoprolol e o nebivolol são antagonistas dos receptores β_1 , iniciamos o tratamento dos animais na sexta semana de hipertensão. A escolha da sexta semana também foi baseada nos resultados obtidos durante a avaliação temporal dos animais 2R-1C, pois, após esse período, os aumentos nos níveis de MMPs, de EROs e o remodelamento vascular encontram-se consolidados.

Inúmeros trabalhos têm mostrado que o tratamento com nebivolol (antagonista do receptor β_1 de terceira geração) tem sido associado à redução de estresse oxidativo em condições de alterações cardiovasculares e apresenta outros efeitos benéficos em comparação ao tratamento com metoprolol (antagonista do receptor β_1 de segunda geração) (Cosentino, Bonetti et al. 2002; Guerrero, Voces et al. 2003; Sorrentino, Doerries et al. 2011).

Nesse trabalho, o tratamento dos animais 2R-1C com nebivolol produziu efeito anti-hipertensivo significativo. Essa redução foi associada à normalização da morfologia da parede aórtica. De forma similar aos nossos resultados, o tratamento com nebivolol melhorou o remodelamento cardíaco em modelo de infarto do miocárdio (Sorrentino, Doerries et al. 2011), em animais espontaneamente hipertensos (SHR) (Guerrero, Voces et al. 2003). Do mesmo modo, pacientes com

rigidez arterial mostram uma melhora após o tratamento com o medicamento (McEniery, Schmitt et al. 2004; Kampus, Serg et al. 2011; Soanker, Naidu et al. 2012).

Outro parâmetro avaliado nesse estudo foi o estresse oxidativo. Como citado na introdução, EROs são um dos fatores responsáveis pela ativação das MMPs (Visse e Nagase 2003; Viappiani, Nicolescu et al. 2009; Kandasamy, Chow et al. 2010). Nesse sentido, observamos um aumento da atividade da NAD(P)H oxidase vascular nesses animais, assim como nos níveis de EROs e MMP-2 na camada média da aorta dos animais hipertensos.

Trabalhos anteriores demonstraram que o nebivolol pode diminuir o estresse oxidativo vascular em modelo experimental de hipertensão induzida por angiotensina II, pela normalização da expressão das subunidades da Nox1, Nox2, p22phox, p47phox e p67phox (Oelze, Daiber et al. 2006) da NAD(P)H oxidase, reduzindo a atividade da enzima. Nossos resultados confirmam esse estudo, pois o tratamento com nebivolol diminuiu a atividade da NAD(P)H oxidase, resultando em menores níveis de EROs *in situ*, observada pelo método de DHE. No entanto, não realizamos a análise da expressão das subunidades da enzima.

Do mesmo modo, em modelo animal de infarto do miocárdio, o tratamento com nebivolol inibiu a atividade da NAD(P)H oxidase e níveis de estresse oxidativo no miocárdio (Oelze, Daiber et al. 2006; Sorrentino, Doerries et al. 2011). Também observamos menores níveis de nitrotirosina *in situ* e menores níveis plasmáticos de MDA encontrados nos animais hipertensos tratados com nebivolol em relação aos animais hipertensos. A formação de 3-nitrotirosina e a de MDA são consideradas marcadores de dano nitrosativo mediado por peroxinitrito (Beckman e Koppenol 1996; Griendling e FitzGerald 2003).

Além disso, trabalhos mostram que o nebivolol foi capaz de atenuar o remodelamento cardíaco em diferentes desordens cardiovasculares. Essas ações adicionais parecem não acontecer com antagonistas de receptores β_1 de segunda geração, como o metoprolol (de Groot, Mathy et al. 2004; Oelze, Daiber et al. 2006; Sorrentino, Doerries et al. 2011).

Essa diminuição dos níveis de EROs nos animais hipertensos tratados com nebivolol foi acompanhada da redução dos níveis e da atividade da MMP-2 observados na hipertensão 2R-1C. A redução de MMP-2 e MMP-9 após o tratamento com nebivolol também foi observada em trabalho com cultura de células endoteliais que receberam estímulo oxidante (Garbin, Fratta Pasini et al. 2008). Entretanto, esse foi o primeiro trabalho que avaliou *in vivo* os efeitos do tratamento com nebivolol sobre a atividade das MMPs. Esses resultados confirmam resultados anteriores, em que drogas com atividade antioxidante preveniram o aumento de MMP-2, bem como o remodelamento vascular hipertrófico nesse modelo de hipertensão renovascular (Castro, Rizzi et al. 2009; Ceron, Castro et al. 2010). No entanto, quando incubamos a MMP-2 recombinante com diferentes concentrações de nebivolol não encontramos alteração da atividade da enzima. Isso sugere que a inibição da atividade da enzima nos animais hipertensos tratados com nebivolol possa ser um efeito indireto da droga, provavelmente devido sua ação antioxidante, diminuindo a ativação das MMPs durante a hipertensão.

Acreditamos que os efeitos benéficos do nebivolol no tratamento dos animais hipertensos 2R-1C ocorreram de modo independente do efeito anti-hipertensivo produzido pela droga, pois quando os animais hipertensos foram tratados com metoprolol, também foi observado efeito anti-hipertensivo significativo e com a mesma magnitude do efeito produzido pelo nebivolol, mas a queda na pressão pelo

tratamento com metoprolol não resultou em melhora do remodelamento vascular. De forma similar aos nossos achados o tratamento de pacientes com hipertensão essencial com nebivolol e metoprolol reduziu a pressão arterial de modo semelhante, mas apenas nebivolol tem efeito favorável sobre o stress oxidativo (Serg, Kampus et al. 2012). Do mesmo modo, trabalhos anteriores mostram que o tratamento de hipertensos com antagonistas de segunda geração como o metoprolol e atenolol apresentam resultados inferiores ao tratamento de hipertensos com antagonistas de terceira geração como o nebivolol (Nodari, Metra et al. 2003; Kampus, Serg et al. 2011; Shirai, Song et al. 2011; Soanker, Naidu et al. 2012).

Além disso, é amplamente descrito na literatura que o nebivolol apresenta propriedades vasodilatadoras devido à capacidade de aumentar a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO). Conforme citado na introdução, os mecanismos envolvidos nessa ação vasodilatadora parecem não relacionados ao bloqueio do receptor β_1 , e sim a um efeito agonista dos receptores β_2 , β_3 , receptor de estrógeno ou antagonismo dos receptores α_1 -adrenérgicos (Broeders, Doevendans et al. 2000; de Groot, Mathy et al. 2003; Dessy, Moniotte et al. 2004; Garban, Buga et al. 2004; Georgescu, Pluteanu et al. 2005; Balligand 2009; Tran Quang, Rozec et al. 2009). Enquanto o metoprolol é um bloqueador adrenérgico de segunda geração, sendo um antagonista β_1 -seletivo, sem ações vasodilatadoras adicionais (Remme 2010).

Em relação ao nosso estudo, observamos que o metoprolol não foi capaz de atenuar o remodelamento vascular hipertrófico, nem os aumentos na atividade da NAD(P)H oxidase vascular e a consequente produção de EROs e níveis de nitrotirosina *in situ*. Também não foi observada diferença significativa nos níveis de MMP-2 e na atividade da gelatinolítica em comparação com animais hipertensos que receberam apenas o veículo da droga. De forma similar aos nossos achados,

trabalhos anteriores mostram que o metoprolol não foi capaz de atenuar o remodelamento cardiovascular (Cimmino, Ibanez et al. 2011; Kampus, Serg et al. 2011; Sorrentino, Doerries et al. 2011), o estresse oxidativo, a atividade da NAD(P)H oxidase vascular (de Groot, Mathy et al. 2004; Sorrentino, Doerries et al. 2011), ou os níveis de MMP-2 (Zhao, Qu et al. 2007; Cimmino, Ibanez et al. 2011) em diferentes modelos animais de desordens cardiovasculares.

É preciso destacar algumas das limitações importantes do nosso estudo: i) utilizamos apenas o modelo 2R-1C de hipertensão, que não reflete totalmente as alterações cardiovasculares encontradas na hipertensão essencial em humanos; ii) como avaliamos alterações vasculares causadas pela alteração na pressão arterial, experimentos em vasos de resistência complementaríamos nossos achados; iii) o tratamento com metoprolol não apresentou resultados significativos nas alterações vasculares causadas pela hipertensão, porém uma tendência de redução dessas alterações foi observada em alguns resultados. Talvez doses maiores de metoprolol, pudessem produzir efeitos significativos, mas deve-se considerar que uma dose maior poderia levar a uma queda mais pronunciada ou até normalização da pressão arterial, e desse modo perderíamos o efeito comparativo de queda de pressão entre as duas drogas. Além disso, pode ser que, se o tempo de tratamento com as drogas fosse superior às quatro semanas realizadas nesse estudo, o metoprolol conseguisse apresentar efeitos significativos de melhora das alterações vasculares. No entanto, essas limitações não invalidam o fato de que, nas condições em que foi realizado o estudo, o nebivolol apresentou efeito benéfico superior ao metoprolol.

Sendo assim, os resultados negativos obtidos nesse estudo com o tratamento de animais hipertensos com metoprolol sugerem que o antagonismo do receptor β_1 -adrenérgico ou a redução da pressão arterial não sejam os principais fatores

envolvidos na melhora encontrada após o tratamento dos animais hipertensos com nebivolol. Os efeitos benéficos observados no remodelamento vascular hipertrófico de animais 2R-1C parecem resultar dos efeitos adicionais de redução de estresse oxidativo e redução de níveis e atividade de MMPs desse antagonista do receptor β_1 -adrenérgico de terceira geração.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Assim, estes resultados sugerem que o remodelamento vascular hipertrófico da hipertensão 2R-1C é um processo precoce, associado a aumento de proliferação celular, de deposição MEC, de estresse oxidativo e de ativação de MMPs na camada média da aorta. Associado a isso, estudo comparativo dos dois antagonistas do receptor β_1 -adrenérgico sugere que o antagonista de terceira geração possua efeitos antioxidantes, diminua a atividade das MMPs e melhore o remodelamento vascular hipertrófico nesse modelo de hipertensão, o que não foi observado no tratamento com o antagonista de segunda geração. Desse modo, os efeitos adicionais do nebivolol podem contribuir de forma importante para proteção cardiovascular na hipertensão.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Bakris, G. (2009). "An in-depth analysis of vasodilation in the management of hypertension: focus on adrenergic blockade." J Cardiovasc Pharmacol **53**(5): 379-87.
- Balligand, J. L. (2009). "beta(3)-Adrenoceptor stimulation on top of beta(1)-adrenoceptor blockade "Stop or Encore?"" J Am Coll Cardiol **53**(17): 1539-42.
- Beckman, J. S. and W. H. Koppenol (1996). "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly." Am J Physiol **271**(5 Pt 1): C1424-37.
- Bernardo, M. M. and R. Fridman (2003). "TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP." Biochem J **374**(Pt 3): 739-45.
- Bivol, L. M., R. K. Berge, et al. (2007). "Differential effect of tetradecythioacetic acid on the renin-angiotensin system and blood pressure in SHR and 2-kidney, 1-clip hypertension." Am J Physiol Renal Physiol **293**(3): F839-45.
- Bode, W. and K. Maskos (2003). "Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases." Biol Chem **384**(6): 863-72.
- 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.
- Brandão, A. A., C. I. S. Rodrigues, et al. (2010). "VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Sociedade Brasileira de Cardiologia / Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade Brasileira de Nefrologia." Arq Bras Cardiol **95**(1 supl 1): 1-51.
- Broeders, M. A., P. A. Doevendans, et al. (2000). "Nebivolol: a third-generation beta-blocker that augments vascular nitric oxide release: endothelial beta(2)-adrenergic receptor-mediated nitric oxide production." Circulation **102**(6): 677-84.
- Cai, H. and D. G. Harrison (2000). "Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." Circ Res **87**(10): 840-4.
- Campos, R. R., E. B. Oliveira-Sales, et al. (2010). "The role of oxidative stress in renovascular hypertension Special Series: Stress and Hypertension." Clin Exp Pharmacol Physiol.

- Castoldi, G., C. R. di Gioia, et al. (2007). "Angiotensin II increases tissue-specific inhibitor of metalloproteinase-2 expression in rat aortic smooth muscle cells in vivo: evidence of a pressure-independent effect." Clin Exp Pharmacol Physiol **34**(3): 205-9.
- 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. (2009). "Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension." Free Radic Biol Med **46**(9): 1298-307.
- 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.
- Cau, S. B., C. A. Dias-Junior, et al. (2008). "Dose-dependent beneficial hemodynamic effects of BAY 41-2272 in a canine model of acute pulmonary thromboembolism." Eur J Pharmacol **581**(1-2): 132-7.
- Cau, S. B., D. A. Guimaraes, et al. (2011). "Pyrrolidine dithiocarbamate down-regulates vascular matrix metalloproteinases and ameliorates vascular dysfunction and remodelling in renovascular hypertension." Br J Pharmacol **164**(2): 372-81.
- Ceron, C. S., M. M. Castro, et al. (2010). "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.
- Ceroni, A., E. D. Moreira, et al. (2010). "Ace gene dosage influences the development of renovascular hypertension." Clin Exp Pharmacol Physiol **37**(4): 490-5.
- Chess, D. J., W. Xu, et al. (2008). "The antioxidant tempol attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction in mice fed a high-fructose diet." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(6): H2223-30.
- Chobanian, A. V., G. L. Bakris, et al. (2003). "Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure." Hypertension **42**(6): 1206-52.
- 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.

- Cimmino, G., B. Ibanez, et al. (2011). "Carvedilol administration in acute myocardial infarction results in stronger inhibition of early markers of left ventricular remodeling than metoprolol." Int J Cardiol **153**(3): 256-61.
- Cosentino, F., S. Bonetti, et al. (2002). "Nitric-oxide-mediated relaxations in salt-induced hypertension: effect of chronic beta1 -selective receptor blockade." J Hypertens **20**(3): 421-8.
- Cunha, R. d. S. (2004). "Rigidez arterial: conceito e implicações metodológicas." Revista Brasileira de Hipertensão **11**(3): 152-156.
- 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.
- Dawes, M., S. E. Brett, et al. (1999). "The vasodilator action of nebivolol in forearm vasculature of subjects with essential hypertension." Br J Clin Pharmacol **48**(3): 460-3.
- de Groot, A. A., M. J. Mathy, et al. (2003). "Involvement of the beta3 adrenoceptor in nebivolol-induced vasorelaxation in the rat aorta." J Cardiovasc Pharmacol **42**(2): 232-6.
- de Groot, A. A., M. J. Mathy, et al. (2004). "Antioxidant activity of nebivolol in the rat aorta." J Cardiovasc Pharmacol **43**(1): 148-53.
- Derosa, G., A. D'Angelo, et al. (2006). "Matrix metalloproteinase-2, -9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with hypertension." Endothelium **13**(3): 227-31.
- Dessy, C., S. Moniotte, et al. (2004). "Endothelial beta3-adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization." Circulation **110**(8): 948-54.
- Donnini, S., M. Monti, et al. (2008). "Peroxynitrite inactivates human-tissue inhibitor of metalloproteinase-4." FEBS Lett **582**(7): 1135-40.
- 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.
- Escobales, N. and M. J. Crespo (2005). "Oxidative-nitrosative stress in hypertension." Curr Vasc Pharmacol **3**(3): 231-46.
- Faia, K. L., W. P. Davis, et al. (2002). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in hamster aortic atherosclerosis: correlation with in-situ zymography." Atherosclerosis **160**(2): 325-37.

- Fang, Y., L. Nicol, et al. (2011). "Improvement of left ventricular diastolic function induced by beta-blockade: a comparison between nebivolol and metoprolol." J Mol Cell Cardiol **51**(2): 168-76.
- 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.
- Filippov, S., G. C. Koenig, et al. (2005). "MT1-matrix metalloproteinase directs arterial wall invasion and neointima formation by vascular smooth muscle cells." J Exp Med **202**(5): 663-71.
- Flamant, M., S. Placier, et al. (2007). "Role of matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling." Hypertension **50**(1): 212-8.
- Frears, E. R., Z. Zhang, et al. (1996). "Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by peroxynitrite." FEBS Lett **381**(1-2): 21-4.
- 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.
- 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.
- Garban, H. J., G. M. Buga, et al. (2004). "Estrogen receptor-mediated vascular responsiveness to nebivolol: a novel endothelium-related mechanism of therapeutic vasorelaxation." J Cardiovasc Pharmacol **43**(5): 638-44.
- Garbin, U., A. Fratta Pasini, et al. (2008). "Effects of nebivolol on endothelial gene expression during oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells." Mediators Inflamm **2008**: 367590.
- Georgescu, A., F. Pluteanu, et al. (2005). "The cellular mechanisms involved in the vasodilator effect of nebivolol on the renal artery." Eur J Pharmacol **508**(1-3): 159-66.
- 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.

- 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.
- Goldblatt, H., J. Lynch, et al. (1934). "Studies on Experimental Hypertension : I. the Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia." J Exp Med **59**(3): 347-79.
- Griendling, K. K., B. Lassegue, et al. (1996). "Angiotensin receptors and their therapeutic implications." Annu Rev Pharmacol Toxicol **36**: 281-306.
- Griendling, K. K., D. Sorescu, et al. (2000). "NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease." Circ Res **86**(5): 494-501.
- Griendling, K. K. and G. A. FitzGerald (2003). "Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS." Circulation **108**(16): 1912-6.
- Grote, K., I. Flach, et al. (2003). "Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species." Circ Res **92**(11): e80-6.
- Guerrero, E., F. Voces, et al. (2003). "Long-term treatment with nebivolol improves arterial reactivity and reduces ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats." J Cardiovasc Pharmacol **42**(3): 348-55.
- Guimaraes, D. A., E. Rizzi, et al. (2011). "Doxycycline dose-dependently inhibits MMP-2-mediated vascular changes in 2K1C hypertension." Basic Clin Pharmacol Toxicol **108**(5): 318-25.
- Gupta, S. and H. M. Wright (2008). "Nebivolol: a highly selective beta1-adrenergic receptor blocker that causes vasodilation by increasing nitric oxide." Cardiovasc Ther **26**(3): 189-202.
- Hao, L., T. Nishimura, et al. (2006). "Vascular responses to alpha1-adrenergic receptors in small rat mesenteric arteries depend on mitochondrial reactive oxygen species." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(4): 819-25.
- Harrison, D. G. (1997). "Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction." J Clin Invest **100**(9): 2153-7.
- Heitzer, T., U. Wenzel, et al. (1999). "Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C." Kidney Int **55**(1): 252-60.
- Humphrey, J. D. (2008). "Mechanisms of arterial remodeling in hypertension: coupled roles of wall shear and intramural stress." Hypertension **52**(2): 195-200.

- 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.
- Janiszewski, M., H. P. Souza, et al. (2002). "Overestimation of NADH-driven vascular oxidase activity due to lucigenin artifacts." Free Radic Biol Med **32**(5): 446-53.
- Jung, O., J. G. Schreiber, et al. (2004). "gp91phox-containing NAD(P)H oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension." Circulation **109**(14): 1795-801.
- Kampus, P., M. Serg, et al. (2011). "Differential effects of nebivolol and metoprolol on central aortic pressure and left ventricular wall thickness." Hypertension **57**(6): 1122-8.
- Kandasamy, A. D., A. K. Chow, et al. (2010). "Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix." Cardiovasc Res **85**(3): 413-23.
- Kearney, P. M., M. Whelton, et al. (2005). "Global burden of hypertension: analysis of worldwide data." Lancet **365**(9455): 217-23.
- Knight, J. A., R. K. Pieper, et al. (1988). "Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation." Clin Chem **34**(12): 2433-8.
- Lassegue, B. and K. K. Griendling (2004). "Reactive oxygen species in hypertension; An update." Am J Hypertens **17**(9): 852-60.
- Laurent, S., P. Boutouyrie, et al. (2001). "Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients." Hypertension **37**(5): 1236-41.
- Laurent, S., S. Katsahian, et al. (2003). "Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension." Stroke **34**(5): 1203-6.
- Lehoux, S., C. A. Lemarie, et al. (2004). "Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling." Circulation **109**(8): 1041-7.
- Lemarie, C. A., P. L. Tharaux, et al. (2010). "Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling." J Mol Cell Cardiol **48**(3): 433-9.
- Lerman, L. O., K. A. Nath, et al. (2001). "Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension." Hypertension **37**(2 Part 2): 541-6.
- Lerman, L. O., A. R. Chade, et al. (2005). "Animal models of hypertension: an overview." J Lab Clin Med **146**(3): 160-73.

- Li, Y. Y., C. F. McTiernan, et al. (2000). "Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling." Cardiovasc Res **46**(2): 214-24.
- Luchtefeld, M., K. Grote, et al. (2005). "Angiotensin II induces MMP-2 in a p47phox-dependent manner." Biochem Biophys Res Commun **328**(1): 183-8.
- Malachias, M. V. B. (2004). "A rigidez arterial como marcador de lesão no presente e preditor de risco no futuro." Revista Brasileira de Hipertensão **11**(3): 157-160.
- 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., L. F. Lopes, et al. (2006). "Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-9 activity in patients with hypertension." J Cardiovasc Pharmacol **47**(1): 117-22.
- 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.
- Martins-Oliveira, A., M. M. Castro, et al. (2012). "Contrasting effects of aliskiren versus losartan on hypertensive vascular remodeling." Int J Cardiol.
- Mayet, J. and A. Hughes (2003). "Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension." Heart **89**(9): 1104-9.
- McEniery, C. M., M. Schmitt, et al. (2004). "Nebivolol increases arterial distensibility in vivo." Hypertension **44**(3): 305-10.
- Michel, B., M. Grima, et al. (1994). "Plasma renin activity and changes in tissue angiotensin converting enzyme." J Hypertens **12**(5): 577-84.
- Montenegro, M. F., L. R. Pessa, et al. (2009). "Isoflavone genistein inhibits the angiotensin-converting enzyme and alters the vascular responses to angiotensin I and bradykinin." Eur J Pharmacol **607**(1-3): 173-7.
- Montenegro, M. F., J. H. Amaral, et al. (2011). "Sodium nitrite downregulates vascular NAD(P)H oxidase and exerts antihypertensive effects in hypertension." Free Radic Biol Med **51**(1): 144-52.

- Morishita, R., J. Higaki, et al. (1991). "Changes in gene expression of the renin-angiotensin system in two-kidney, one clip hypertensive rats." J Hypertens **9**(2): 187-92.
- Murphy, G. and H. Nagase (2008). "Progress in matrix metalloproteinase research." Mol Aspects Med **29**(5): 290-308.
- Nagase, H., R. Visse, et al. (2006). "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs." Cardiovasc Res **69**(3): 562-73.
- Navar, L. G., L. M. Harrison-Bernard, et al. (1999). "Intrarenal angiotensin II generation and renal effects of AT1 receptor blockade." J Am Soc Nephrol **10** Suppl 12: S266-72.
- 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.
- Nguyen Dinh Cat, A. and R. M. Touyz (2011). "A new look at the renin-angiotensin system--focusing on the vascular system." Peptides **32**(10): 2141-50.
- Nodari, S., M. Metra, et al. (2003). "Beta-blocker treatment of patients with diastolic heart failure and arterial hypertension. A prospective, randomized, comparison of the long-term effects of atenolol vs. nebivolol." Eur J Heart Fail **5**(5): 621-7.
- Oelze, M., A. Daiber, et al. (2006). "Nebivolol inhibits superoxide formation by NAD(P)H oxidase and endothelial dysfunction in angiotensin II-treated rats." Hypertension **48**(4): 677-84.
- Ohbayashi, H. (2002). "Matrix metalloproteinases in lung diseases." Curr Protein Pept Sci **3**(4): 409-21.
- Okamoto, T., T. Akaike, et al. (1997). "Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide." Arch Biochem Biophys **342**(2): 261-74.
- Okamoto, T., T. Akaike, et al. (2001). "Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation." J Biol Chem **276**(31): 29596-602.
- Okamura, T., M. Miyazaki, et al. (1986). "Vascular renin-angiotensin system in two-kidney, one clip hypertensive rats." Hypertension **8**(7): 560-5.
- Oliveira-Sales, E. B., A. P. Dugaich, et al. (2008). "Oxidative stress contributes to renovascular hypertension." Am J Hypertens **21**(1): 98-104.

- Panek, A. N. and M. Bader (2006). "Matrix reloaded: the matrix metalloproteinase paradox." Hypertension **47**(4): 640-1.
- 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.
- Rao, G. N. and B. C. Berk (1992). "Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression." Circ Res **70**(3): 593-9.
- Reinhold, S. W., D. C. Uihlein, et al. (2009). "Renin, Endothelial NO Synthase and Endothelin Gene Expression in the 2Kidney-1clip Goldblatt Model of Long-term Renovascular Hypertension." Eur J Med Res **14**(12): 520-5.
- Remme, W. J. (2010). "Which beta-blocker is most effective in heart failure?" Cardiovasc Drugs Ther **24**(4): 351-8.
- Rizzi, E., M. M. Castro, et al. (2012). "Tempol inhibits TGF-beta and MMPs upregulation and prevents cardiac hypertensive changes." Int J Cardiol.
- Rueckschloss, U., N. Duerschmidt, et al. (2003). "NAD(P)H oxidase in endothelial cells: impact on atherosclerosis." Antioxid Redox Signal **5**(2): 171-80.
- Rugale, C., S. Delbosc, et al. (2007). "Simvastatin reverses target organ damage and oxidative stress in Angiotensin II hypertension: comparison with apocynin, tempol, and hydralazine." J Cardiovasc Pharmacol **50**(3): 293-8.
- Sadjadi, J., K. Puttaparthi, et al. (2002). "Upregulation of autocrine-paracrine renin-angiotensin systems in chronic renovascular hypertension." J Vasc Surg **36**(2): 386-92.
- Salguero, G., E. Akin, et al. (2008). "Renovascular hypertension by two-kidney one-clip enhances endothelial progenitor cell mobilization in a p47phox-dependent manner." J Hypertens **26**(2): 257-68.
- Samani, N. J., W. J. Brammar, et al. (1991). "Renal and extra-renal levels of renin mRNA in experimental hypertension." Clin Sci (Lond) **80**(4): 339-44.
- Schulz, R. (2007). "Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 211-42.
- Serg, M., P. Kampus, et al. (2012). "Nebivolol and metoprolol: long-term effects on inflammation and oxidative stress in essential hypertension." Scand J Clin Lab Invest **72**(5): 427-32.

- Seshiah, P. N., D. S. Weber, et al. (2002). "Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators." Circ Res **91**(5): 406-13.
- Sharifi, A. M., N. Akbarloo, et al. (2003). "Alteration of local ACE activity and vascular responsiveness during development of 2K1C renovascular hypertension." Pharmacol Res **47**(3): 201-9.
- Shirai, K., M. Song, et al. (2011). "Contradictory effects of beta1- and alpha1- adrenergic receptor blockers on cardio-ankle vascular stiffness index (CAVI)-CAVI independent of blood pressure." J Atheroscler Thromb **18**(1): 49-55.
- Siwik, D. A., P. J. Pagano, et al. (2001). "Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts." Am J Physiol Cell Physiol **280**(1): C53-60.
- Soanker, R., M. U. Naidu, et al. (2012). "Effect of beta-1-blocker, nebivolol, on central aortic pressure and arterial stiffness in patients with essential hypertension." Indian J Pharmacol **44**(3): 407-11.
- Sorescu, D. and K. K. Griendling (2002). "Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure." Congest Heart Fail **8**(3): 132-40.
- Sorrentino, S. A., C. Doerries, et al. (2011). "Nebivolol exerts beneficial effects on endothelial function, early endothelial progenitor cells, myocardial neovascularization, and left ventricular dysfunction early after myocardial infarction beyond conventional beta1-blockade." J Am Coll Cardiol **57**(5): 601-11.
- Spinale, F. G. (2002). "Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart." Circ Res **90**(5): 520-30.
- Spinale, F. G. (2007). "Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function." Physiol Rev **87**(4): 1285-342.
- Touyz, R. M. and E. L. Schiffrin (1999). "Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells." Hypertension **34**(4 Pt 2): 976-82.
- Touyz, R. M. (2004). "Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease." Braz J Med Biol Res **37**(8): 1263-73.
- Touyz, R. M. and E. L. Schiffrin (2004). "Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension." Histochem Cell Biol **122**(4): 339-52.

- Tran Quang, T., B. Rozec, et al. (2009). "Investigation of the different adrenoceptor targets of nebivolol enantiomers in rat thoracic aorta." Br J Pharmacol **156**(4): 601-8.
- Tzemos, N., P. O. Lim, et al. (2001). "Nebivolol reverses endothelial dysfunction in essential hypertension: a randomized, double-blind, crossover study." Circulation **104**(5): 511-4.
- Valenzuela, A. (1991). "The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress." Life Sci **48**(4): 301-9.
- Vardoulis, O., T. G. Papaioannou, et al. (2012). "On the Estimation of Total Arterial Compliance from Aortic Pulse Wave Velocity." Ann Biomed Eng.
- Viappiani, S., A. C. Nicolescu, et al. (2009). "Activation and modulation of 72kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione." Biochem Pharmacol **77**(5): 826-34.
- Viel, E. C., K. Benkirane, et al. (2008). "Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(1): H281-8.
- Visse, R. and H. Nagase (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." Circ Res **92**(8): 827-39.
- Warnholtz, A., G. Nickenig, et al. (1999). "Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system." Circulation **99**(15): 2027-33.
- 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.
- Willis, A. I., D. Pierre-Paul, et al. (2004). "Vascular smooth muscle cell migration: current research and clinical implications." Vasc Endovascular Surg **38**(1): 11-23.
- Zhao, J., X. F. Qu, et al. (2007). "Effects of metoprolol treatment on a disintegrin metalloproteinase expression and extracellular matrix remodeling after myocardial infarction in rats." Chin Med J (Engl) **120**(17): 1549-52.
- Zhou, X., L. Ma, et al. (2010). "Nebivolol improves diastolic dysfunction and myocardial remodeling through reductions in oxidative stress in the Zucker obese rat." Hypertension **55**(4): 880-8.

ANEXOS

ANEXOS

Matrix Biology 31 (2012) 261–270

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Matrix Biology

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

Time course involvement of matrix metalloproteinases in the vascular alterations of renovascular hypertension[☆]

Carla S. Ceron^a, Elen Rizzi^a, Danielle A. Guimaraes^a, Alisson Martins-Oliveira^a, Stefany B. Cau^a, Junia Ramos^b, Raquel F. Gerlach^b, Jose E. Tanus-Santos^{a,*}

^a Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes, 3900; Ribeirao Preto, SP, 14049-900 Brazil

^b Department of Morphology, Estomatology and Physiology, Dental School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Av. Café, s/n; Ribeirao Preto, SP, 14040-904, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 October 2011

Accepted 26 January 2012

Keywords:

Collagen

Elastin

Matrix metalloproteinases

Oxidative stress

Vascular remodeling

ABSTRACT

Increased vascular matrix metalloproteinases (MMPs) levels play a role in late phases of hypertensive vascular remodeling. However, no previous study has examined the time course of MMPs in the various phases of two-kidney, one-clip hypertension (2K1C). We examined structural vascular changes, collagen and elastin content, vascular oxidative stress, and MMPs levels/activities during the development of 2K1C hypertension. Plasma angiotensin converting enzyme (ACE) activity was measured to assess renin-angiotensin system activation. Sham or 2K1C hypertensive rats were studied after 2, 4, 6, and 10 weeks of hypertension. Systolic blood pressure (SBP) was monitored weekly. Morphometry of structural changes in the aortic wall was studied in hematoxylin/eosin, orcein and picrosirius red sections. Aortic NADPH activity and superoxide production was evaluated. Aortic gelatinolytic activity was determined by in situ zymography, and MMP-2, MMP-14, and tissue inhibitor of MMPs (TIMP)-2 levels were determined by gelatin zymography, immunofluorescence and immunohistochemistry. 2K1C hypertension was associated with increased ACE activity, which decreased to normal after 10 weeks. We found increased aortic collagen and elastin content in the early phase of hypertension, which were associated with vascular hypertrophy, increased vascular MMP-2 and MMP-14 (but not TIMP-2) levels, and increased gelatinolytic activity, possibly as a result of increased vascular NADPH oxidase activity and oxidative stress. These results indicate that vascular remodeling of renovascular hypertension is an early process associated with early increases in MMPs activities, enhanced matrix deposition and oxidative stress. Using antioxidants or MMPs inhibitors in the early phase of hypertension may prevent the vascular alterations of hypertension.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hypertension induces structural and functional vascular alterations that are related to cardiovascular complications. Arterial remodeling in response to hypertensive hemodynamic changes adapt the vascular structure to an increased load (Arribas et al., 2006; Humphrey, 2008), and this process involves degradation and reorganization of extracellular matrix (ECM), thus resulting in vessel wall hypertrophy, and increased collagen and elastin aortic content (Castro et al., 2008, 2009). In this respect, a group of enzymes, the matrix metalloproteinases (MMPs), has been implicated in both functional and structural vascular alterations of hypertension (Schulz, 2007; Raffetto and Khalil, 2008; Castro et al., 2009). They degrade the ECM and are also involved in migration and proliferation of

vascular smooth muscle cells (VSMC) (Galis and Khatri, 2002; Newby, 2006). Importantly, while their activities are regulated at transcriptional and post-transcriptional levels, post-translational regulation is equally important. However, MMPs activation may also result of proteolytic activation by other MMPs or by increased reactive oxygen species (ROS) levels (Kandasamy et al., 2010). Moreover, MMPs are inhibited by endogenous inhibitors, the tissue inhibitors of MMPs (TIMPs) (Bode and Maskos, 2003).

Increased MMPs levels have been shown in clinical and experimental models of hypertension (Bouvet et al., 2005; Martinez et al., 2006; Castro et al., 2008; Fontana et al., 2011), and key hypertensive mechanisms including the activation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and oxidative stress may interact to promote MMPs upregulation or to inactivate TIMPs, thus increasing MMPs activities (Luchtefeld et al., 2005; Kandasamy et al., 2010). This is the case of experimental two-kidney one-clip hypertension (2K1C), which resembles human renovascular hypertension and is a widely used model of chronic hypertension (Burgeleva et al., 2009; Campos et al., 2011; Ceron et al., 2010; Marcal et al., 2010). The RAAS is activated in this model of hypertension, and increased angiotensin II

[☆] Conflict of interest: None.

* Corresponding author at: Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil. Tel.: +55 16 3602 3163; fax: +55 16 3602 0220.

E-mail addresses: tanus@fmp.usp.br, tanussantos@yahoo.com (J.E. Tanus-Santos).

levels promote vascular hypertrophy and increased vascular ROS levels, especially through activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, the major source of vascular superoxide anions (Montenegro et al., 2011). However, while previous studies showed increased vascular MMP-2, MMP-9, and MMP-14 levels in the later phase of 2K1C hypertension (Castro et al., 2010), no previous study has examined the time course of MMPs in the various phases during the development of 2K1C hypertension. Whereas increased MMPs levels in the later phase of hypertension have justified the use of MMPs inhibitors (Bouvet et al., 2005; Castro et al., 2008), it is not clear whether MMPs levels increase in the early phases of 2K1C hypertension. Moreover, no previous study has examined time course changes in vascular ECM, MMPs, TIMPs and oxidative stress in the 2K1C hypertension model.

In the present study, we examined the vascular remodeling and the changes in vascular collagen and elastin, in systemic and aortic ROS levels, in vascular NADPH oxidase activity, and in MMPs/gelatinolytic activity during the development of 2K1C hypertension. Plasma angiotensin converting enzyme (ACE) activity was measured to reflect RAAS activation during the development of 2K1C hypertension. Because tissue and serum ACE activity increase with time after 2K1C hypertension is experimentally induced, and because increased ACE activity is very important for the development of hypertension in this model (Sharifi et al., 2003; Ceroni et al., 2010), we hypothesized that increased ACE activity would be associated with proportional increases in vascular MMPs and oxidative stress.

2. Results

2.1. Systolic blood pressure in 2K1C rats

We found that clipping the left renal artery (2K1C) induced a marked rise in systolic blood pressure (SBP), which was clearly found 2 weeks after the surgery (Fig. 1A; $P < 0.05$) and reached a plateau at week 4.

2.2. Plasma angiotensin-converting enzyme (ACE) activity

ACE activity was measured in plasma samples from hypertensive and sham operated animals. As shown in Fig. 1B, plasma ACE activity was increased in hypertensive animals after 2, 4, and 6 weeks of hypertension ($P < 0.05$) compared to respective sham groups. However, plasma ACE activity after 10 weeks of hypertension was similar to that found in sham animals ($P > 0.05$).

2.3. Evaluation of vascular structure and composition of the vascular wall

Chronic renovascular hypertension was associated with arterial wall hypertrophy, with significant increases in number of vascular smooth muscle cells in the aortic wall, increased aortic cross-sectional area (CSA), and increased media to lumen (M/L) ratio after 2, 4, 6 and 10 weeks of hypertension compared to sham animals

Fig. 1. Panels A and B show systolic blood pressure ($n = 10$ –12 per group) and angiotensin-converting enzyme (ACE) activity ($n = 6$ –8 per group), respectively, in each study group. The structural alterations found in the aortic media layer along the 10 weeks of study ($n = 6$ –8 per group) are shown in panel C (values for vascular smooth muscle cells number per length of aorta), panel D (representative photographs of aortic samples ($\times 400$) stained by hematoxylin and eosin), panel E (values for thoracic aorta medial cross-sectional area; CSA), and panel F (values of media to lumen ratio; M/L). Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M. * $P < 0.05$ for 2K1C group versus sham. ** $P < 0.05$ for 2K1C groups at 4, 6, and 10 weeks versus the 2K1C group at 2 weeks.

(Fig. 1C, D, E, and F, respectively; $P < 0.05$), without significant differences attributable to variable time of hypertension.

Renovascular hypertension is associated with excessive collagen and elastin deposition (Castro et al., 2008). While we found increased aortic collagen content (percentage in area) in 2K1C hypertensive rats compared to sham animals after 2, 4, 6 and 10 weeks of hypertension (Fig. 2A and B; $P < 0.05$), no significant effects were found for the time of hypertension. In parallel with these results, we found higher aortic elastin (percentage in area) content in 2K1C hypertensive rats after 4, 6 and 10 weeks of hypertension compared to sham animals (Fig. 2C and D; $P < 0.05$), without significant effects for the time of hypertension. We found no significant differences in the number of elastic lamellae when sham and hypertensive animals were compared (data not shown).

2.4. Increased vascular NADPH oxidase activity and enhanced vascular ROS and plasma lipid peroxide levels in hypertensive animals

We found increased ROS levels in the thoracic aortas from 2K1C hypertensive rats after 2, 4, 6, and 10 weeks of hypertension compared to sham animals (Fig. 3A and B; $P < 0.05$), without significant differences associated with the time of hypertension. In parallel with these results, we found increased NADPH oxidase activity in the aortas from hypertensive rats after 2, 4, 6, and 10 weeks of hypertension (Fig. 3C; $P < 0.05$). Further confirming increased oxidative stress associated with hypertension, we found that 2K1C hypertensive rats showed higher malondialdehyde (MDA) levels than respective sham controls after 6 and 10 weeks of hypertension (Fig. 3D; $P < 0.05$).

2.5. Increased vascular MMP-2 levels and gelatinolytic activity during the development of renovascular hypertension

We used gelatin zymograms to measure MMP levels in aortic extracts, and Fig. 4A shows a representative zymogram of aortic extracts

displaying bands corresponding to the molecular weights of MMP-2. Aortas from 2K1C rats showed higher levels of three MMP-2 forms (75 kDa, 72 kDa, and 64 kDa) after 6 and 10 weeks of hypertension compared to sham animals (Fig. 4B, C, and D, respectively; $P < 0.05$), thus leading to increased total MMP-2 levels ($P < 0.05$; Fig. 4E).

To further investigate how 2K1C affects vascular MMPs, we determined in situ gelatinolytic activities in the aortas from these animals, and we found enhanced green fluorescence, which indicates enhanced gelatinolytic activity, in the endothelium and in the media of thoracic aorta from 2K1C rats after 2, 4, 6, and 10 weeks of hypertension compared to sham animals (Fig. 5A, and B; $P < 0.05$). Interestingly, the increased gelatinolytic activity co-localized with aortic MMP-2 expression, as shown by immunofluorescence studies (Fig. 5A). In parallel with the increases in in situ gelatinolytic activities, the red fluorescence corresponding to MMP-2 was also increased in 2K1C hypertensive rats after 2, 4, 6, and 10 weeks of hypertension compared to sham controls (Fig. 5A and C; $P < 0.05$). We have also examined whether radial gradients exist with respect to the gelatinolytic activities in the media layer, and we found no significant gradient (data not shown).

2.6. Increases in vascular MMP-2 and MMP-14, but not TIMP-2, during the development of 2K1C hypertension and their vascular localization

Representative immunohistochemistry photomicrographs showing MMP-2, MMP-14, and TIMP-2 levels in the aortas from rats are shown in Fig. 6. We found higher MMP-2 (Fig. 6A and B) and MMP-14 (Fig. 6A and C) levels in the aortas from 2K1C hypertensive rats after 2, 4, 6, and 10 weeks of hypertension compared with sham controls ($P < 0.05$). Conversely, we found no significant differences in aortic TIMP-2 levels in hypertensive rats after different times of hypertension compared with sham controls (Fig. 6A and D; all $P > 0.05$). These results lead to higher MMP-2:TIMP-2 and MMP-14:TIMP-2 ratios in the 2K1C hypertensive rats compared to the

Fig. 2. Collagen and elastin contents in the aortic media layer during development of 2K1C hypertension ($n = 6-8$ per group). Panel A shows representative photographs of aortic samples ($\times 400$) stained by Picrosirius red. Panel B shows the values for surface area of collagen in the aortic media. Panel C shows representative photographs of aortic samples ($\times 400$) stained by orcein. Panel D shows the values for surface area of elastin in the aortic media. Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M. * $P < 0.05$ for 2K1C groups versus sham.

Fig. 3. Vascular reactive oxygen species production and lipid peroxide levels in 2K1C hypertension. Panel A shows representative photomicrographs ($\times 400$) with red fluorescence of dihydroethidium (DHE)-aortic cryosections. Panel B shows the quantification of aortic red fluorescence in each experimental group ($n = 4-5$ per group). Panel C shows nonphagocytic, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent superoxide production measured in the aortic rings ($n = 6-8$ per group). Panel D shows thiobarbituric acid reactive substances concentrations in plasma samples expressed in terms of malondialdehyde (MDA; $n = 10$ per group). Data are shown as mean $\pm$ S.E.M. * $P < 0.05$ for 2K1C groups versus sham. ** $P < 0.05$ for 2K1C at 6 and 10 weeks versus sham.

sham controls (Fig. 6E; $P < 0.05$), especially after 6 and 10 weeks of hypertension.

2.7. Angiotensin II induces oxidative stress and increases aortic situ gelatinolytic activity

We carried out experiments and validate experimentally the idea that ROS is upstream of MMP activation, especially in a context of increased angiotensin II concentrations. Aortas from normotensive rats were obtained, and angiotensin II ($1 \mu\text{mol/L}$) was used to elicit vascular production of ROS. We observed a temporal increase in the intensity of red fluorescence in aortic sections incubated with DHE ($10 \mu\text{mol/L}$) (Fig. 7; $P < 0.05$). This signal was abolished when apocynin ($100 \mu\text{mol/L}$) was used (Fig. 7; $P < 0.05$), thus suggesting that it was caused by NADPH oxidase activity. Moreover, the increase in vascular ROS after incubation with angiotensin II was associated with increased aortic gelatinolytic activity (Fig. 8; $P < 0.05$), which was also abolished in the presence of apocynin or in the presence of the MMP inhibitor phenanthroline ($50 \mu\text{mol/L}$; Fig. 8; $P < 0.05$).

3. Discussion

Structural and functional alterations of conduit arteries are clearly involved in the increased cardiovascular morbidity and mortality associated with hypertension. This is the first study to report a time course involvement of MMPs in the vascular alterations of renovascular hypertension. We showed increased collagen and elastin contents in the aortic media layer which were associated with vascular hypertrophy, increased vascular MMP-2 and MMP-14 (but not TIMP-2) levels, and increased gelatinolytic activity, possibly as a result of

increased vascular NADPH oxidase and oxidative stress. This is the first study to show these alterations during the development of 2K1C hypertension.

The vascular remodeling that we found, with increased number of vascular smooth muscle cells, CSA and M/L ratio, is known to reduce vascular wall tension in response to elevated blood pressure (Intengan and Schiffrin, 2001). Aortic media layer hypertrophy was associated with significant increases in collagen and elastin (percentage area) in the early phase of hypertension and tended to further increase with time. These results confirm previous findings showing similar alterations in chronic phases of 2K1C hypertension (Castro et al., 2008; Ceron et al., 2010; Marcal et al., 2010). However, in the aortic coarctation model, cell proliferation and increased collagen contents were found early and peaked after 2 weeks of hypertension and then declined with time (Hu et al., 2008). Another study using midthoracic aortic coarctation evaluated the animals suggested that a coordinated regulation of cell proliferation and cell death contributes to arterial remodeling in response to acute sustained elevation of blood pressure (Xu et al., 2001).

While the vascular structural changes caused by hypertension involve complex mechanisms (revised elsewhere (Intengan and Schiffrin, 2001)), we found increased ACE activity associated with these alterations, thus indicating an important activation of the RAAS in the 2K1C model (Sharifi et al., 2003; Ceroni et al., 2010). Moreover, it is known that increased pressure can locally increase angiotensin II levels in the vascular wall, thus contributing to the development of hypertrophy independently of the circulating angiotensin II levels (Meggs et al., 1993; Leri et al., 1998). Interestingly, ACE activity decreased to normal levels after 10 weeks of hypertension, and this finding suggests that RAAS activation plays an important role at initial phases of 2K1C hypertension, but not in the late phase.

Fig. 4. Representative SDS-PAGE gelatin zymograms of aortic extracts at 2, 4, 6, and 10 weeks of 2K1C hypertension (Panel A). Molecular weights of MMP-2 bands (75 kDa, 72 kDa and 64 kDa MMP-2) were identified after electrophoresis on 12% SDS-PAGE. Std: internal standard. Panels B, C, D, and E show the values for the 75 kDa, 72 kDa, 64 kDa molecular weight forms, and total MMP-2 levels, respectively, in the aortic extracts. Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M. ($n = 8-10$ per group). * $P < 0.05$ 2K1C group versus sham. ** $P < 0.05$ 2K1C group versus sham and 2K1C at 2 weeks group. *** $P < 0.05$ 2K1C group versus all other groups.

Our results show upregulated MMPs expression and activity in 2K1C hypertension, possibly as a result of RAAS activation and increased oxidative stress (Luchtefeld et al., 2005; Kandasamy et al., 2010). Indeed, we found increased MMP-2 levels by immunohistochemistry in the early phase (2 weeks) of 2K1C hypertension, although our zymograms showed increased MMP-2 levels only after 6 weeks of hypertension. However, we found increased vascular gelatinolytic activity in the early stages of hypertension (2 weeks), and it is possible that increased NADPH oxidase activity leads to increased vascular ROS levels and MMPs activation (Luchtefeld et al., 2005; Kandasamy et al., 2010), even though MMPs levels may not increase so much in the early phases. Previous studies showed that MMP-2 is activated by ROS (Kandasamy et al., 2010), and our results showing increased ROS levels in 2K1C hypertension, possibly contributing to vascular remodeling are in line with previous studies (Oliveira-Sales et al., 2008; Castro et al., 2009; Ceron et al., 2010). In line with these results, we found increased vascular ROS in the aortic media layer from normotensive animals incubated with angiotensin II, which were associated with increased gelatinolytic activity, and both were inhibited by previous incubation with apocynin, a NADPH oxidase inhibitor, thus supporting the notion that increased ROS levels may activate MMPs. The present findings expand previous conclusions and show an early increase in oxidative stress that probably activates MMPs and promote later increases in MMPs levels, thus accelerating the remodeling process with time. Progressive increases in MMPs levels and activities may enhance collagen and elastin cleavage (Schulz, 2007) and result in accelerated accumulation of these ECM constituents (Castro et al., 2008), as we found in the present study.

While increased MMP-2 levels and activity have been reported in different animal models of hypertension (Lehoux et al., 2004; Bouvet et al., 2005; Rizzi et al., 2009; Ceron et al., 2010), our results show for the first time increased vascular MMP-2 and MMP-14 levels without significant changes in TIMP-2 expression in the early phases of 2K1C hypertension. Importantly, MMPs are inhibited by their endogenous inhibitors, the TIMPs. Whereas angiotensin II was shown to enhance TIMP-2 levels (Castoldi et al., 2007), we found no increases in TIMP-2 expression, either in the early phase of 2K1C hypertension, when the RAAS is more clearly activated (as suggested by increased ACE activity), or in the late phase of 2K1C hypertension. Although our findings are in line with previous studies showing no increases in TIMP-2 levels in the late phase of 2K1C hypertension (Castro et al., 2008, 2010), it is possible that differences between hypertension models may explain these conflicting results.

The progressive increases in MMP-2:TIMP-2 and MMP-14:TIMP-2 ratios reported here confirm previous findings (Castro et al., 2010) and support that notion that MMP-14 may be relevant for MMP-2 activation (English et al., 2006; Spinale, 2007; Castro et al., 2010). In fact, increased MMP-14 levels were found in previous studies showing that this enzyme promotes vascular smooth muscle cell migration and proliferation (Filippov et al., 2005).

Interestingly, we found significant correlations between histological and biochemical parameters, as detailed in Table 1. These analyses included measurements carried out after different times of hypertension, and some measurements reflecting vascular hypertrophy correlated with MMP-2 levels, oxidative stress, and gelatinolytic activity (Table 1). It is relevant to note that while some measurements did not

Fig. 5. In situ gelatinolytic activity and MMP-2 levels assessed by immunofluorescence in the aortas during development of 2K1C hypertension. Panel A shows representative photographs of gelatinolytic activity ($\times 400$), MMP-2 levels, and their co-localization in the aortas. Panel B shows the mean gelatinolytic activity in aortas in each study group assessed by the measurement of bright green fluorescence ($n = 4-5$ per group). Panel C shows the mean MMP-2 levels in the aortas in each study group assessed by bright red fluorescence ($n = 4-5$ per group). Data are shown as mean $\pm$ S.E.M. * $P < 0.05$ for 2K1C group versus sham. ** $P < 0.05$ for 2K1C at 10 weeks group versus sham and 2K1C at 2 weeks group.

significantly correlate with others, most of them were either significant or at least tended to correlate, thus further supporting the notion that increased oxidative stress may activate MMPs, which in turn promote vascular remodeling in hypertension.

In conclusion, our results indicate that the vascular remodeling of renovascular hypertension is an early process associated with increased ECM, oxidative stress, and MMPs activation in the aortic media layer. These findings suggest that using antioxidants or MMPs inhibitors in the early phase of hypertension may help to prevent the structural vascular alterations of hypertension.

4. Experimental procedures

4.1. Animals

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

4.2. Surgical procedures and experimental protocols

2K1C hypertension was induced by clipping the left renal artery with a silver clip (0.2 mm). Sham-operated rats underwent the

same surgical procedure except for the clip placement. The surgical procedures were carried out under anesthesia with ketamine 100 mg/kg and xylazine 10 mg/kg i.p. Tail systolic blood pressure (SBP) was assessed weekly by tail-cuff plethysmography. Animals were randomly assigned to one of the two groups: 2K1C and Sham. These groups were subdivided into four subgroups of animals studied at 2, 4, 6 and 10 weeks after surgery. After 2, 4, 6 and 10 weeks of hypertension, the animals were killed by decapitation and their thoracic aortas were isolated and cleaned of connective tissue and fat. Arterial blood samples were centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min and plasma fractions were immediately stored at -70 °C until used for biochemical measurements.

4.3. Plasma angiotensin-converting enzyme (ACE) activity

Plasma ACE activity was assessed using a fluorimetric method that measures the hydrolysis of the synthetic substrate hippuryl-His-Leu, as previously described (Montenegro et al., 2009). Briefly, 5 μ L of plasma samples were incubated with 245 μ L of assay solution containing 5 mM hippuryl-His-Leu in 0.4 M sodium borate buffer, pH 8.3, and 0.9 M NaCl for 15 min at 37 °C. The reaction was stopped by adding 600 μ L of 0.34 M NaOH. The product of this hydrolysis (His-Leu) was measured fluorimetrically (365 nm excitation and 495 nm emission) after the addition of 50 μ L of o-phthalaldehyde (20 mg/mL in methanol), which was followed 10 min later by the addition of 100 μ L of 3 M HCl, and centrifugation at 800 g for 5 min. A standard curve was obtained with His-Leu (0.1–30 μ M), which produced a linear

Fig. 6. Panel A shows representative aortic photographs of immunostaining of MMP-2, MMP-14, and TIMP-2 performed in the endothelium and media of hypertensive rats ($\times 400$). Panels B, C, and D show the quantification of brown staining of MMP-2 ($n=4-5$ per group), MMP-14 ($n=4-5$ per group), and TIMP-2 ($n=4-5$ per group), respectively. Panel E shows the MMP-2:TIMP-2 ratio and MMP-14:TIMP-2 ratio ($n=4-5$ per group). Data are shown as mean $\pm$ S.E.M. * $P<0.05$ for 2K1C group versus sham group. ** $P<0.05$ for 2K1C versus 2K1C at 2 weeks and sham groups. *** $P<0.05$ for 2K1C versus sham and 2K1C at 2 and 4 weeks groups.

Fig. 7. Temporal evaluation of in situ reactive oxygen species production in the presence of angiotensin II. Panel A shows representative photomicrographs ($\times 400$) of red fluorescence in dihydroethidium (DHE)-aortic cryosections in the presence of angiotensin II (ANG II – 1 μmol/L), or apocynin (APO – 10 μmol/L), or the association of these drugs. Panel B shows the quantification of aortic red fluorescence in each group ($n=4$ per group). Data are shown as mean $\pm$ S.E.M. * $P<0.05$ for DHE + ANG II versus the other groups.

Fig. 8. Temporal evaluation of in situ gelatinolytic activity assessed with DQ gelatin in the presence of angiotensin II. Panel A shows representative photographs of aortic gelatinolytic activity ($\times 400$) in the presence of angiotensin II (ANG II – 1 $\mu\text{mol/L}$), or apocynin (APO – 100 $\mu\text{mol/L}$), or phenanthroline (PHE – 50 $\mu\text{mol/L}$), or both drugs. Panel B shows the mean aortic gelatinolytic activity in each group assessed by measuring bright green fluorescence ($n = 4$ per group). Apocynin and phenanthroline are NADPH and MMP inhibitors, respectively. Data are shown as mean $\pm$ S.E.M. * $P < 0.05$ for DQ + ANG II versus other groups.

relationship of relative fluorescence and His-Leu concentrations (data not shown).

4.4. Morphometric analysis and composition of the vascular wall

The middle portion of thoracic aortas were fixed in 4% phosphate-buffered paraformaldehyde, pH 7.4, and embedded in paraffin blocks. Four μm thick slices ($n = 6$) were stained with hematoxylin and eosin (H&E), Orceine and Picrosirius Red. Media cross-sectional area (CSA) was calculated by subtracting the lumen internal area (A_i) from the

external area (A_e), which was measured in tissue sections ($\times 40$). The external diameter (ED) and the internal diameter (ID) were calculated as the square root of $4A_e/\pi$ and $4A_i/\pi$, respectively. Media thickness (M) was calculated as $(ED-ID)/2$. Finally, Media to lumen diameter (M/L) was also calculated (Castro et al., 2008; Castro et al., 2010).

The number of vascular smooth muscle cells (VSMCs) in the aortic wall was measured by the tri-dimensional dissector method on two consecutive sections, as previously described (Castro et al., 2008, 2010). This method is independent of nuclei orientation, form and

Table 1

Pearson's correlations (r coefficients and P values) for associations between histological and biochemical parameters measured at the different time points.

	CSA	Collagen	Elastin	MMP-2	DHE	NADPH	MDA
Collagen	$r = 0.621$ $P = 0.131$						
Elastin	$r = 0.959$ $P = 0.005$	$r = 0.812$ $P = 0.047$					
MMP-2	$r = 0.866$ $P = 0.029$	$r = 0.397$ $P = 0.254$	$r = 0.794$ $P = 0.054$				
DHE	$r = 0.524$ $P = 0.182$	$r = 0.973$ $P = 0.003$	$r = 0.742$ $P = 0.075$	$r = 0.366$ $P = 0.272$			
NADPH	$r = 0.805$ $P = 0.097$	$r = 0.980$ $P = 0.010$	$r = 0.881$ $P = 0.060$	$r = 0.410$ $P = 0.295$	$r = 0.997$ $P = 0.001$		
MDA	$r = 0.813$ $P = 0.047$	$r = 0.598$ $P = 0.144$	$r = 0.832$ $P = 0.040$	$r = 0.947$ $P = 0.007$	$r = 0.609$ $P = 0.138$	$r = 0.446$ $P = 0.277$	
Gelatinolytic activity	$r = 0.982$ $P = 0.001$	$r = 0.721$ $P = 0.085$	$r = 0.988$ $P = 0.001$	$r = 0.857$ $P = 0.032$	$r = 0.657$ $P = 0.114$	$r = 0.813$ $P = 0.093$	$r = 0.861$ $P = 0.030$

CSA = aortic cross-sectional area; Collagen = collagen deposition (percentage area).

Elastin = elastin deposition (percentage area); MMP-2 = total MMP-2.

DHE = Dihydroethidium fluorescence; NADPH = NADPH oxidase activity.

MDA = plasma malondialdehyde concentrations; Gelatinolytic activity = gelatinolytic activity in media.

size. It is possible that nuclei from fibroblasts or myofibroblasts present in the tissue may have been counted in this analysis. Stained sections were examined with light microscopy (DMLB; Leica, Bensheim, Germany) and the image was captured at $\times 400$, as previously described. Picrosirius Red and Orceine staining were used to determine the collagen and elastin contents in the aortic media layer, respectively. These structural analyses in the media were evaluated by using ImageJ Program (NIH – National Institute of Health). The number of elastic lamellae was also assessed.

4.5. Assessment of vascular NADPH oxidase activity, vascular ROS formation, and lipid peroxide levels in plasma

NADPH-dependent superoxide production was measured in aortic rings from all experimental groups. Aortic rings were transferred to luminescence vials containing 1 mL of Krebs-HEPES buffer, pH 7.4. After equilibration and background counts, a nonredox cycling concentration of lucigenin (5 $\mu\text{mol/L}$) and NADPH (300 $\mu\text{mol/L}$) were automatically added and the luminescence counts measured continuously for 15 min in a Berthold FB12 single tube luminometer at 37 °C. Background signals from aortic rings were subtracted from the NADPH-driven signals and the results were normalized for the dry weight and reported as RLU/mg/min, as previously described (Montenegro et al., 2010).

Dihydroethidium (DHE) was used to evaluate *in situ* production of ROS. Briefly, aortic tissues were embedded vertically in Tissue-tek® and cryostatized. The aorta sections were incubated with DHE (10 $\mu\text{mol/L}$) as previously described (Ceron et al., 2010). Sections were examined with fluorescence microscopy (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) and the image was captured at $\times 400$. The intensity of the red fluorescent signal was evaluated by using ImageJ Program (NIH – National Institute of Health) as previously described (Castro et al., 2009).

Plasma lipid peroxide levels were determined by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) using a fluorimetric method that requires excitation at 515 nm and emission at 553 nm as previously described (Cau et al., 2008). The lipoperoxide levels were expressed in terms of malondialdehyde (MDA) (nmol/mL).

4.6. Measurement of aortic MMP-2 levels by gelatin zymography and gelatinolytic activity by *in situ* zymography

Gelatin zymography was performed as previously described (Souza-Tarla et al., 2005; Gerlach et al., 2005, 2007). Tissue extracts were subjected to electrophoresis on 12% SDS-PAGE co-polymerized with gelatin (1%). Gelatinolytic activities were detected as unstained bands against the background of Coomassie blue-stained gelatin, assayed by densitometry using a Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290 (Kodak, Rochester, NY).

Gelatinolytic activity in media and intima of frozen thoracic aorta was measured using DQ Gelatin (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA) as previously described (Castro et al., 2009). Sections were examined with fluorescent microscopy (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) and the image was captured at $\times 400$. The intensity of the green fluorescent signal was evaluated by using ImageJ Program (NIH – National Institute of Health) as previously described (Castro et al., 2010).

Aortic MMPs activity was co-localized with aortic MMP-2 expression by immunofluorescence. After DQ gelatin, tissue sections were incubated with MMP-2 primary mouse anti-human monoclonal antibody (MAB3308, Chemicon, USA). Sections were examined with fluorescent microscopy (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) and the image was captured at $\times 400$. The intensity of the red fluorescent signal was evaluated by using ImageJ Program (NIH – National Institute of Health) as previously described (Castro et al., 2010).

4.7. Immunohistochemistry to detect vascular MMP-2, MMP-14 and TIMP-2

In order to assess MMP-2, MMP-14, and TIMP-2 levels and localization in the thoracic aorta, frozen aortic sections were analyzed using specific antibodies (MAB3308, MAB3317 and MAB13446, Chemicon, USA, respectively), and an Anti-Mouse Poly Horseradish peroxidase (HRP) Immunohistochemistry (IHC) Detection Kit (Chemicon, USA) as previously described (Castro et al., 2010). Sections were counterstained with hematoxylin, examined with fluorescent microscopy (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) and the image was captured at $\times 400$. Immunoreactivity intensity was quantified in endothelium and media of aortas sections by using ImageJ Program (NIH – National Institute of Health) as previously described (Castro et al., 2010).

4.8. Vascular ROS formation and gelatinolytic activity induced by angiotensin II in control animals

Dihydroethidium (DHE) was used to evaluate *in situ* production of ROS induced by angiotensin II. Aortic sections were incubated with DHE (10 $\mu\text{mol/L}$) only (Castro et al., 2009), or DHE in the presence of angiotensin II (Ang II) 1 $\mu\text{mol/L}$ and/or apocynin (APO) 100 $\mu\text{mol/L}$, as previously described (Ceron et al., 2010).

Gelatinolytic activity in media and intima of frozen thoracic aorta was measured using DQ Gelatin in the presence of angiotensin II. Aortic sections were incubated with DQ Gelatin only (Castro et al., 2009), DQ Gelatin in the presence of angiotensin II (Ang II) 1 $\mu\text{mol/L}$ and/or apocynin (APO) 100 $\mu\text{mol/L}$, or phenanthroline (PHE) 50 $\mu\text{mol/L}$, as previously described (Martinez-Lemus et al., 2011).

Sections were examined with fluorescence microscopy (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) at the moment of incubation with drugs, and after 10 and 30 min to assess the changes in fluorescence with the time. The images were captured at X400. Apocynin and phenanthroline (a NADPH and a MMP inhibitor, respectively) were also incubated 15 min before the DHE or DQ Gelatin. The intensity of the red fluorescent signal was evaluated by using ImageJ Program (NIH – National Institute of Health) as previously described (Castro et al., 2009; Martinez-Lemus et al., 2011).

4.9. Statistical analysis

Results are expressed as means $\pm$ S.E.M. Each subgroup of hypertensive animals was compared to respective control group (the age as the hypertensive animals) using unpaired Student *t*-test. Multiple comparisons between hypertensive groups were made with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test. The Pearson's correlation (*r*, *P*) was calculated to test for associations between histological and biochemical analyses. A probability value <0.05 was considered significant.

Acknowledgments

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

References

- Arribas, S.M., Hinek, A., Gonzalez, M.C., 2006. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacol. Ther.* 111, 771–791.
- Bode, W., Maskos, K., 2003. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol. Chem.* 384, 863–872.
- Bouvet, C., Gilbert, L.A., Girardot, D., deBlois, D., Moreau, P., 2005. Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition. *Hypertension* 45, 432–437.
- Burgelova, M., Vanourkova, Z., Thumova, M., Dvorak, P., Opocensky, M., Kramer, H.J., Zelizko, M., Maly, J., Bader, M., Cervenka, L., 2009. Impairment of the angiotensin-

- converting enzyme 2-angiotensin-(1–7)-Mas axis contributes to the acceleration of two-kidney, one-clip Goldblatt hypertension. *J. Hypertens.* 27, 1988–2000.
- Campos, R.R., Oliveira-Sales, E.B., Nish, E.M., Boim, M.A., Dolnikoff, M.S., Bergamaschi, C.T., 2011. The role of oxidative stress in renovascular hypertension special series: stress and hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 38, 144–152.
- Castoldi, G., di Gioia, C.R., Travaglini, C., Busca, G., Redaelli, S., Bombardi, C., Stella, A., 2007. Angiotensin II increases tissue-specific inhibitor of metalloproteinase-2 expression in rat aortic smooth muscle cells in vivo: evidence of a pressure-independent effect. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 205–209.
- Castro, M.M., Rizzi, E., Figueiredo-Lopes, L., Fernandes, K., Bendhack, L.M., Pitol, D.L., Gerlach, R.F., Tanus-Santos, J.E., 2008. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis* 198, 320–331.
- Castro, M.M., Rizzi, E., Rodrigues, G.J., Ceron, C.S., Bendhack, L.M., Gerlach, R.F., Tanus-Santos, J.E., 2009. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 1298–1307.
- Castro, M.M., Rizzi, E., Prado, C.M., Rossi, M.A., Tanus-Santos, J.E., Gerlach, R.F., 2010. Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling. *Matrix Biol.* 29, 194–201.
- Cau, S.B., Dias-Junior, C.A., Montenegro, M.F., de Nucci, G., Antunes, E., Tanus-Santos, J.E., 2008. Dose-dependent beneficial hemodynamic effects of BAY 41–2272 in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. *Eur. J. Pharmacol.* 581, 132–137.
- Ceron, C.S., Castro, M.M., Rizzi, E., Montenegro, M.F., Fontana, V., Salgado, M.C., Gerlach, R.F., Tanus-Santos, J.E., 2010. 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, 77–87.
- Ceroni, A., Moreira, E.D., Mostarda, C.T., Silva, G.J., Krieger, E.M., Irigoyen, M.C., 2010. Ace gene dosage influences the development of renovascular hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 37, 490–495.
- English, J.L., Kassiri, Z., Koskivirta, I., Atkinson, S.J., Di Grappa, M., Soloway, P.D., Nagase, H., Vuorio, E., Murphy, G., Khokha, R., 2006. Individual Timp deficiencies differentially impact pro-MMP-2 activation. *J. Biol. Chem.* 281, 10337–10346.
- Filippov, S., Koenig, G.C., Chun, T.H., Hotary, K.B., Ota, I., Bugge, T.H., Roberts, J.D., Fay, W.P., Birkedal-Hansen, H., Holmbeck, K., Sabeh, F., Allen, E.D., Weiss, S.J., 2005. MT1-matrix metalloproteinase directs arterial wall invasion and neointima formation by vascular smooth muscle cells. *J. Exp. Med.* 202, 663–671.
- Fontana, V., Silva, P.S., Belo, V.A., Antonio, R.C., Ceron, C.S., Biagi, C., Gerlach, R.F., Tanus-Santos, J.E., 2011. Consistent alterations of circulating matrix metalloproteinases levels in untreated hypertensives and in spontaneously hypertensive rats: a relevant pharmacological target. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 109, 130–137.
- Galis, Z.S., Khatri, J.J., 2002. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ. Res.* 90, 251–262.
- Gerlach, R.F., Uzuelli, J.A., Souza-Tarla, C.D., Tanus-Santos, J.E., 2005. Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Anal. Biochem.* 344, 147–149.
- Gerlach, R.F., Demacq, C., Jung, K., Tanus-Santos, J.E., 2007. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clin. Biochem.* 40, 119–123.
- Hu, J.J., Ambrus, A., Fossum, T.W., Miller, M.W., Humphrey, J.D., Wilson, E., 2008. Time courses of growth and remodeling of porcine aortic media during hypertension: a quantitative immunohistochemical examination. *J. Histochem. Cytochem.* 56, 359–370.
- Humphrey, J.D., 2008. Mechanisms of arterial remodeling in hypertension: coupled roles of wall shear and intramural stress. *Hypertension* 52, 195–200.
- Intengan, H.D., Schiffrin, E.L., 2001. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 38, 581–587.
- Kandasamy, A.D., Chow, A.K., Ali, M.A., Schulz, R., 2010. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc. Res.* 85, 413–423.
- Lehoux, S., Lemarie, C.A., Esposito, B., Lijnen, H.R., Tedgui, A., 2004. Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. *Circulation* 109, 1041–1047.
- Leri, A., Claudio, P.P., Li, Q., Wang, X., Reiss, K., Wang, S., Malhotra, A., Kajstura, J., Anversa, P., 1998. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *J. Clin. Invest.* 101, 1326–1342.
- Luchtefeld, M., Grote, K., Grothues, C., Bley, S., Bandlow, N., Selle, T., Struber, M., Haverich, A., Bavendiek, U., Drexler, H., Schieffer, B., 2005. Angiotensin II induces MMP-2 in a p47phox-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 183–188.
- Marcal, D.M., Rizzi, E., Martins-Oliveira, A., Ceron, C.S., Guimaraes, D.A., Gerlach, R.F., Tanus-Santos, J.E., 2010. Comparative study on antioxidant effects and vascular matrix metalloproteinase-2 downregulation by dihydropyridines in renovascular hypertension. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 383, 35–44.
- Martinez, M.L., Lopes, L.F., Coelho, E.B., Nobre, F., Rocha, J.B., Gerlach, R.F., Tanus-Santos, J.E., 2006. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-9 activity in patients with hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 47, 117–122.
- Martinez-Lemus, L.A., Zhao, G., Galinanes, E.L., Boone, M., 2011. Inward remodeling of resistance arteries requires reactive oxygen species-dependent activation of matrix metalloproteinases. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300, H2005–H2015.
- Meggs, L.G., Coupet, J., Huang, H., Cheng, W., Li, P., Capasso, J.M., Homcy, C.J., Anversa, P., 1993. Regulation of angiotensin II receptors on ventricular myocytes after myocardial infarction in rats. *Circ. Res.* 72, 1149–1162.
- Montenegro, M.F., Pessa, L.R., Tanus-Santos, J.E., 2009. Isoflavone genistein inhibits the angiotensin-converting enzyme and alters the vascular responses to angiotensin I and bradykinin. *Eur. J. Pharmacol.* 607, 173–177.
- Montenegro, M.F., Neto-Neves, E.M., Dias-Junior, C.A., Ceron, C.S., Castro, M.M., Gomes, V.A., Kanashiro, A., Tanus-Santos, J.E., 2010. Quercetin restores plasma nitrite and nitroso species levels in renovascular hypertension. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 382, 293–301.
- Montenegro, M.F., Amaral, J.H., Pinheiro, L.C., Sakamoto, E.K., Ferreira, G.C., Reis, R.I., Marcal, D.M., Pereira, R.P., Tanus-Santos, J.E., 2011. Sodium nitrite downregulates vascular NADPH oxidase and exerts antihypertensive effects in hypertension. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 144–152.
- Newby, A.C., 2006. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc. Res.* 69, 614–624.
- Oliveira-Sales, E.B., Dugaich, A.P., Canillo, B.A., Abreu, N.P., Boim, M.A., Martins, P.J., D'Almeida, V., Dolnikoff, M.S., Bergamaschi, C.T., Campos, R.R., 2008. Oxidative stress contributes to renovascular hypertension. *Am. J. Hypertens.* 21, 98–104.
- Raffetto, J.D., Khalil, R.A., 2008. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* 75, 346–359.
- Rizzi, E., Castro, M.M., Fernandes, K., Barbosa Jr., F., Arisi, G.M., Garcia-Cairasco, N., Bendhack, L.M., Tanus-Santos, J.E., Gerlach, R.F., 2009. Evidence of early involvement of matrix metalloproteinase-2 in lead-induced hypertension. *Arch. Toxicol.* 83, 439–449.
- Schulz, R., 2007. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 211–242.
- Sharifi, A.M., Akbarloo, N., Heshmatian, B., Ziai, A., 2003. Alteration of local ACE activity and vascular responsiveness during development of 2K1C renovascular hypertension. *Pharmacol. Res.* 47, 201–209.
- Souza-Tarla, C.D., Uzuelli, J.A., Machado, A.A., Gerlach, R.F., Tanus-Santos, J.E., 2005. Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Clin. Biochem.* 38, 410–414.
- Spinale, F.G., 2007. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol. Rev.* 87, 1285–1342.
- Xu, C., Lee, S., Singh, T.M., Sho, E., Li, X., Sho, M., Masuda, H., Zarins, C.K., 2001. Molecular mechanisms of aortic wall remodeling in response to hypertension. *J. Vasc. Surg.* 33, 570–578.