UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

JULIANA MONTENEGRO PARENTE

**Ações Proteolíticas da Metaloproteinase de Matriz
(MMP)-2 nas Alterações Morfofuncionais de Artérias de
Resistência e de Condutância na Hipertensão
Renovascular**

Ribeirão Preto – São Paulo

2017

JULIANA MONTENEGRO PARENTE

**Ações Proteolíticas da Metaloproteinase de Matriz
(MMP)-2 nas Alterações Morfofuncionais de Artérias de
Resistência e de Condutância na Hipertensão
Renovascular**

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Michele Mazzaron de Castro

Ribeirão Preto – São Paulo

2017

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Parente, Juliana Montenegro

Ações proteolíticas da metaloproteinase de matriz (MMP)-2 nas alterações morfofuncionais de artérias de resistência e de condutância na hipertensão renovascular. Juliana Montenegro Parente; Orientadora: Prof^a Dr^a Michele Mazzaron de Castro. Ribeirão Preto, 2017. 79 folhas.

Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

1. Metaloproteinases, 2. Remodelamento vascular, 3. Função vascular, 4. Hipertensão renovascular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Montenegro Parente

Ações proteolíticas da metaloproteinase de matriz (MMP)-2 nas alterações morfofuncionais de artérias de resistência e de condutância na hipertensão renovascular.

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

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: _____

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Michele Mazzaron de Castro

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Lusiane Maria Bendhack

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Marcelo Damário Gomes

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Luciano de Figueiredo Borges

Instituição: UNIFESP – Diadema Assinatura: _____

*Dedico este trabalho aos meus pais que sempre
incentivaram todos os meus sonhos e que desde
cedo me ensinaram que nada é impossível para
um coração cheio de vontade.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ser meu companheiro, por iluminar o meu caminho e por ser meu refúgio nos melhores e piores momentos.

Agradeço aos meus pais, José Carlos e Denise, por todo o amor e paciência que tiveram comigo durante essa jornada. Agradeço também aos meus irmãos, Davi e Jessica, por serem meus companheiros de vida. Obrigada por sempre estarem por perto mesmo a tantos quilômetros de distância. Vocês são a minha coragem e a minha fortaleza. Essa conquista também é de vocês!

Agradeço à Prof^a Dr^a. Michele Mazzaron de Castro por sua orientação, amizade, dedicação e paciência durante essa fase tão importante. Todas as nossas conversas, discussões e ideias me fizeram crescer profissional e pessoalmente. Você é uma inspiração para mim.

Agradeço à Prof^a Dr^a Lusiane Maria Bendhack, Prof. Dr. Luciano de Figueiredo Borges e Prof. Dr. Marcelo Damário Gomes pela leitura dessa dissertação e pelas importantes considerações e por participarem da banca examinadora.

Agradeço à Eliane, minha amiga, mãe do coração e técnica, por todo o apoio durante esses anos. Só nós sabemos os tombos, alegrias, desafios e conquistas que vivemos. Sou muito grata a Deus por ter encontrado em você alguém com quem sempre posso contar. Obrigada por acreditar em mim e por me incentivar a sempre perseverar.

Agradeço à Carla, minha amiga-irmã, por todos os conselhos e por ter dividido a casa e também o coração. Obrigada por tornar a minha vida mais leve e por estar sempre comigo.

Agradeço ao Leonardo por ser minha companhia e minha alegria durante essa jornada. Obrigada por me escutar, apoiar e torcer sempre por mim. Seu amor e sua paciência me ajudaram a alcançar esse sonho.

Agradeço aos meus amigos da vida inteira, Ana Luiza, Jade, Daniel, Danilo, Allan, Jessica, Beatriz, Ana Paula, Sílvia e Marina por tornarem os meus dias mais felizes e por acreditarem em mim. Obrigada por sempre estarem ao meu lado.

Agradeço aos meus amigos de Ribeirão Preto em especial ao Jeimison, Atlante, Marcela, Naielly, Gabriel, Pedro, Taiz, Ivaldo e Gustavo por tornarem a vida mais alegre e leve.

Agradeço aos meus colegas de laboratório e do laboratório do Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos por todo o apoio e ajuda durante os experimentos.

Agradeço por último a todos os funcionários, colegas e amigos do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo apoio e pela amizade. Agradeço também a CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e
da persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence
obstáculos no mínimo fará coisas admiráveis.”*

José de Alencar

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO.....	17
HIPÓTESE.....	27
OBJETIVOS.....	29
MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
RESULTADOS.....	46
DISCUSSÃO.....	61
CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
APÊNDICE.....	80

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figuras:

Figura 1 – Esquema representativo das modificações da camada média arterial no remodelamento vascular.....	21
Figura 2 – Estrutura esquemática da MMP-2 de 72 kDa.....	22
Figura 3 – Ativação proteolítica e/ou não proteolítica das MMPs.....	23
Figura 4 - Efeito do tratamento com doxiciclina sobre a PAS e peso corporal sete dias após a cirurgia 2R-1C.....	48
Figura 5 - Efeito do tratamento com doxiciclina sobre a atividade e expressão de MMP-2.....	49
Figura 6 - Efeito do tratamento com doxiciclina sobre a atividade de MMP-2..	50
Figura 7 - Efeito do tratamento com doxiciclina sobre a proliferação de CMLVs.....	52
Figura 8 - Efeito do tratamento com doxiciclina sobre CSA e razão M/L em aortas e segundos ramos de artérias mesentéricas.....	53
Figura 9 - Efeito do tratamento com doxiciclina sobre CSA e razão M/L nos primeiros ramos de artérias mesentéricas.....	54
Figura 10 - Efeito da doxiciclina sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aortas e nos terceiros ramos de artérias mesentéricas.....	56
Figura 11 - Efeito do tratamento com doxiciclina na expressão de calponina-1 em aortas e segundos ramos de artérias mesentéricas.....	59

Figura 12 - Efeito do tratamento com doxiciclina na expressão de calponina-1 em artérias mesentéricas obtida por western blot.....	60
---	----

Tabelas:

Tabela 1 - Efeito do tratamento com doxiciclina sobre os parâmetros morfológicos e mecânicos de artérias mesentéricas.....	55
---	----

Tabela 2 - Efeito do tratamento com doxiciclina na resposta contrátil a fenilefrina em aortas e nos terceiros ramos de artérias mesentéricas.....	56
--	----

LISTA DE ABREVIações

$\mu\text{M}/\mu\text{L}/\mu\text{m}$ -Micromolar, microlitro,micrômetro	M - Molar
2R-1C – Dois Rins – Um Clipe	M/L – Média por Lúmen
BSA – Albumina Bovina	mg/mL – Miligrama/mililitro
CaCl₂ – Cloreto de Cálcio	MgSO₄.7H₂O – Sulfato de Magnésio Heptahidratado
CMLV – Célula Muscular Lisa Vascular	mM - Milimolar
CO₂ – Dióxido de Carbono	mmHg – Milímetros de Mercúrio
CSA – Área de Secção Transversal	MMP – Metaloproteinase de Matriz
DE – Diâmetro Externo	MT-MMP – Metaloproteinase de Matriz de Membrana
DI – Diâmetro Interno	NaCl – Cloreto de Sódio
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra- Acético	NaHCO₃ – Bicarbonato de Sódio
EGTA – Ácido Etileno Glicol-bis(β - aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetra-acético	O₂ - Oxigênio
E_{max} – Efeito Máximo	PAS – Pressão Arterial Sistólica
ERK 1/2 – Quinase Regulada por sinal Extracelular	PBS – Tampão Fosfato Salino
g - grama	pD₂ - Potência
H₂O - Água	pH – Potencial de Hidrogênio
HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica	PKC – Proteína Quinase C
HCl – Ácido Clorídrico	RNA – Ácido Ribonucléico
HEPES – Ácido 4-(2-hydroxiethyl)-1- piperazinoetanosulfonico	Rpm - Rotações por Minuto
KCl – Cloreto de Potássio	SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
kD - Quilodalton	TBS – Tampão Tris Salino
Kg - Quilograma	TGF-β – Fator de Crescimento Transformador Beta
KH₂PO₄ – Fosfato Monopotássico	TIMP – Inibidor Tecidual de MMP

RESUMO

PARENTE, J.M. **Ações proteolíticas da metaloproteinase de matriz (MMP)-2 nas alterações morfofuncionais de artérias de resistência e de condutância na hipertensão renovascular.** 2017. 79 fls. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) apresenta alterações vasculares significativas como o remodelamento vascular e o aumento da atividade das metaloproteinases de matriz (MMPs), principalmente a MMP-2, responsáveis pela proteólise da matriz extracelular. No remodelamento vascular, ocorre uma mudança no fenótipo das células musculares lisas vasculares (CMLV) de contrátil para sintético, com redução de proteínas da maquinaria contrátil como a calponina-1. Essa alteração fenotípica confere às CMLV a capacidade de migração e proliferação, contribuindo ao remodelamento arterial durante a HAS. A calponina-1 foi degradada pela MMP-2 em aorta de ratos endotoxêmicos e este efeito contribuiu para a menor contração vascular da sepse. Sua redução foi associada ao aumento de atividade de MMP-2 e proliferação de CMLV em aortas de ratos hipertensos. A hipótese do presente trabalho é de que a MMP-2 contribui para as alterações morfofuncionais induzidas pela hipertensão em artérias de condutância e de resistência pela regulação de calponina-1. Para testar tal hipótese, ratos Wistar foram submetidos ao modelo de hipertensão dois rins-um clipe (2R-1C) ou apenas laparotomia e tratados por via oral com doxiciclina (inibidor da atividade de MMPs na dose de 30 mg/kg/dia) ou água durante sete dias. A pressão arterial sistólica (PAS) foi aferida diariamente por pletismografia de cauda. Aorta e

artérias mesentéricas foram removidas para a execução de zimografia *in situ* e em gel, imunofluorescência para calponina-1, imunohistoquímica para Ki-67 e análise morfológica. Artérias mesentéricas e aortas também foram utilizadas para curva concentração-efeito com fenilefrina. Observou-se que a PAS aumentou em ratos 2R-1C e o tratamento com doxíciclina não a reduziu. A análise morfológica da aorta mostrou que a razão média por lúmen e a área de secção transversal aumentaram nos animais hipertensos em relação aos grupos Sham. Não houve alteração nestes parâmetros nas artérias mesentéricas. Houve aumento de proliferação das CMLV em aortas de ratos 2R-1C e a doxíciclina reverteu essa alteração. Nas artérias mesentéricas não foi observada alteração na proliferação celular. A atividade gelatinolítica de MMP-2 e sua expressão estão aumentadas nos dois leitos arteriais de ratos 2R-1C e o tratamento com doxíciclina as reduziu. A expressão de calponina-1 está reduzida nas aortas e aumentada nas artérias de resistência de animais 2R-1C e o tratamento reverteu estes efeitos. A contração à fenilefrina das aortas e artérias mesentéricas está aumentada nos animais 2R-1C e o tratamento a reduziu. Os resultados indicam que a MMP-2 tem ações diferentes na regulação de calponina-1 nos dois leitos arteriais. Nas artérias de condutância, a redução de calponina-1 pela MMP-2 pode ser o gatilho para a mudança de fenótipo das células musculares lisas vasculares, o que conduz ao remodelamento hipertrófico. Nas artérias de resistência, a MMP-2 pode contribuir para a função contrátil do leito arterial aumentando os níveis de calponina-1.

ABSTRACT

PARENTE, J.M. **Proteolytic actions of matrix metalloproteinase (MMP) -2 in morphological and vascular changes of resistance and conductance arteries in renovascular hypertension.** 2017. 79 fls. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Hypertension is a global public health problem that lead to significant vascular changes. Among them, the chronic remodeling and increased activity of matrix metalloproteinase (MMP)-2, which is responsible for extracellular matrix proteolysis, are the main mediators of the vascular maladaptation. During vascular remodeling, there is a change in the phenotype of vascular smooth muscle cells (VSMC) of contractile to synthetic form, with a reduction of contractile proteins such as calponin-1. This phenotype switch provides to the VSMC the ability of migration and proliferation, thus contributing to hypertension-induced arterial remodeling. Calponin-1 was degraded by MMP-2 in rat endotoxemic aortas and this effect contributed to the vascular hypocontractility. In addition, its reduction was associated with increased activity of MMP-2 and proliferation of VSMC in aortas of rats submitted to renovascular hypertension. Therefore, the hypothesis of this study is that MMP-2 contributes to hypertension-induced morphological and functional changes in conductance and resistance arteries by regulating calponin-1. To test such hypothesis, male Wistar rats were submitted to the two kidney- one clip (2K-1C) hypertension model and were treated with doxycycline (inhibitor of MMPs activity at 30 mg/kg/day) or water for one week. Systolic blood pressure (SBP) was daily checked by tail-cuff plethysmography. Aortas and mesenteric arteries were

removed to perform *in situ* and gel zymography, immunofluorescence for calponin-1, immunohistochemistry for Ki-67 and morphological analysis. Mesenteric arteries and aortas were also used for concentration-effect curve for phenylephrine. It was observed that SBP has increased in 2K-1C rats and doxycycline did not reduce it. Morphological analysis of the aorta showed that both media per lumen ratio and arterial cross sectional area increased in hypertensive animals compared to Sham. There was no changes in this two parameters in mesenteric arteries. Furthermore, there was an increase of VSMC proliferation in rat aortas and doxycycline was able to revert this alteration. In the mesenteric arteries, no changes were observed in VSMC proliferation. Gelatinolytic activity of MMP-2 and its expression were increased in both arterial beds of 2K-1C rats and treatment with doxycycline reduced it. Calponin-1 expression was reduced in aortas and increased in resistance arteries from 2K-1C animals and the treatment was able to improve both scenarios. The contractile function of aortas and mesenteric arteries was increased in 2K-1C rats and treatment has reduced it. So, what follows is that MMP-2 has different actions in the regulation of calponin-1 in both arterial beds. In conductance arteries, reduction of calponin-1 by MMP-2 may trigger the VSMC phenotype switch, which leads to the hypertrophic remodeling. In resistance arteries, MMP-2 contributes to the hypercontractility of the arterial bed by increasing calponin-1. This effect may be particularly related to extracellular actions of MMP-2.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) e o Remodelamento Vascular

A HAS, doença caracterizada pelo aumento da pressão arterial, é um problema de saúde pública mundial e é o fator de risco mais importante para doenças cardiovasculares e renais. No mundo, as doenças cardiovasculares causam 17 milhões de mortes por ano, representando quase um terço do total de óbitos (1). Dessas doenças, as complicações decorrentes da hipertensão somam 9,4 milhões de mortes (2). No Brasil, as doenças cardiovasculares são responsáveis por cerca de 30% dos óbitos com causas conhecidas e geram 1,2 milhões de hospitalizações por ano. A HAS é a mais prevalente de todas as doenças cardiovasculares, afetando mais de 36 milhões de brasileiros (3).

Por ser uma doença de caráter crônico, a HAS apresenta alterações cardíacas e vasculares significativas, que possuem um importante papel no desenvolvimento da doença. Entre elas, o remodelamento vascular se destaca, caracterizado por aumento da razão média por lúmen (M/L), rigidez arterial, inflamação, calcificação e disfunção vascular (4). O remodelamento arterial representa qualquer alteração morfológica ou funcional da parede do vaso sanguíneo que ocorre em resposta à doença ou idade (5). Embora seja uma resposta adaptativa do vaso a uma situação atípica, o remodelamento arterial caracteriza a patogênese de doenças cardiovasculares associadas à HAS, como o acidente vascular encefálico e insuficiência renal, por exemplo.

A parede vascular é basicamente composta por três camadas: íntima, média e adventícia. A camada íntima, mais interna, é formada principalmente por células endoteliais e a camada adventícia, mais externa, por tecido conjuntivo. A camada média é formada por células musculares lisas vasculares

(CMLV) que expressam proteínas importantes para a contratilidade, o que permite que essas células modulem o tônus vascular. Além disso, a diferenciação de fenótipo contrátil a sintético das CMLVs pode contribuir para o processo de remodelamento arterial por aumentar a proliferação e migração (6).

O remodelamento vascular pode ser classificado em hipotrófico, eutrófico ou hipertrófico com redução (*inward*) ou aumento (*outward*) do lúmen. O tipo de remodelamento que se instala num leito vascular depende do estímulo e da função do vaso sanguíneo. O aumento da razão M/L sem qualquer alteração da área de secção transversal (CSA) é chamado de remodelamento eutrófico e é característico de artérias de resistência nas fases iniciais da HAS. Essa eutrofia é geralmente acompanhada de diminuição de lúmen, o que provoca uma vasoconstrição e contribui para a manutenção da resistência vascular periférica. Quando a HAS atinge estágios mais crônicos, o remodelamento passa a ser hipertrófico, com aumento de proliferação celular, razão M/L e CSA (7-9). O aumento da razão M/L com aumento de CSA arterial é chamado de remodelamento hipertrófico e é característico de artérias de condutância (10). O remodelamento vascular hipotrófico, caracterizado pela diminuição de CSA é predominante em situações de fluxo sanguíneo reduzido (9).

Estímulos mecânicos, como o aumento de pressão arterial, são gatilhos para o início do processo de remodelamento, promovendo uma mudança no fenótipo das CMLVs. Essas células, em condições fisiológicas, exibem um fenótipo contrátil (quiescente) (6, 11) e expressam um conjunto de marcadores, tais como as proteínas do citoesqueleto e as proteínas envolvidas no processo

de contração muscular, como a α -actina, a cadeia leve da miosina, a calponina-1, a esmotelina B e a SM-22 (12), proteínas necessárias para a manutenção do tônus vascular. Quando estimuladas, as CMLVs transitam para o fenótipo sintético (proliferativo). Essa mudança fenotípica é acompanhada de redução de proteínas da maquinaria contrátil e do citoesqueleto, o que facilita a migração e a proliferação celular (6, 11). Uma vez que cessa o estímulo, as CMLVs retornam ao seu fenótipo contrátil, com ressíntese de proteínas estruturais e de matriz extracelular. A desregulação dessa troca de fenótipos é um dos fatores que contribuem para o remodelamento fisiopatológico (6).

O remodelamento vascular fisiopatológico, com alteração fenotípica das CMLVs, é dependente da degradação e reorganização da matriz extracelular do vaso. As metaloproteinases de matriz (MMPs), especialmente a MMP-2, são enzimas especializadas na degradação das proteínas que compõem a matriz e são muito importantes no processo de remodelamento arterial da HAS (13) (Figura 1).

1.2 – MMPs e suas Ações no Remodelamento Vascular

As MMPs são endopeptidases cálcio e zinco dependentes (15). A classificação básica das MMPs se refere aos substratos de matriz extracelular que elas degradam, estrutura primária e localização subcelular. Os grupos de MMPs são: collagenases (MMP -1, -8 e -13), estromelisinases (MMP-3 e -10), matrilisinases (MMP-7 e -26), MMPs de membrana (MT-MMPs) e gelatinases (MMP-2 e -9) (16). As gelatinases são preferencialmente associadas às alterações funcionais e estruturais presentes em algumas doenças cardiovasculares, como a HAS. As ações das MMPs estão relacionadas ao

remodelamento tecidual fisiopatológico, incluindo desenvolvimento de órgãos, hipertrofia vascular, cicatrização de feridas, inflamação e câncer (13).

Figura 1 – O remodelamento vascular na HAS é dependente da desorganização da matriz extracelular arterial e da mudança de fenótipo das CMLVs, que podem assim, migrar e proliferar. A MMP-2 parece ser uma enzima chave para esse processo (Adaptado de Belo *et al.*, 2015) (14).

Como consequência das propriedades potencialmente destrutivas de suas ações como proteases, todas as MMPs são inicialmente sintetizadas na forma de zimogênios (pró-MMPs), enzimaticamente inativos. As estruturas das MMPs são semelhantes e consistem em um peptídeo de sinalização na região N-terminal, que permite a secreção da enzima pelo retículo endoplasmático e o transporte para fora da célula. Adjacente ao peptídeo sinalizador há um domínio pró-peptídeo hidrofóbico, que protege a porção catalítica, a qual possui um íon zinco. O sítio catalítico das gelatinases é singular e difere das outras MMPs porque contém três domínios de fibronectina tipo II que permite a clivagem do colágeno tipo IV, da laminina, da elastina e da fibronectina, entre

outras proteínas da matriz extracelular (13). A região C-terminal de hemopexina é conectada ao sítio catalítico por uma ligação flexível que permite a ligação de outras proteínas, as quais podem alterar a atividade da MMPs (16) (Figura 2).

Figura 2 – Estrutura esquemática da MMP-2 de 72 kDa, mostrando o domínio pré-peptídico na porção N-terminal, o domínio pró-peptídico ligado ao sítio catalítico composto de um íon zinco e três domínios de fibronectina e o domínio hemopexina na porção C-terminal (Adaptado de Kandasamy *et al.*, 2010) (17).

As MMPs podem ser reguladas por transcrição gênica, por ativação de zimogênios pós-tradução, através de reações como glutatilação e fosforilação, e por interação das MMPs secretadas com inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (13). Os TIMPs são inibidores endógenos de MMPs e atuam na regulação da atividade dessas enzimas. O TIMP-2, embora seja o principal inibidor endógeno de MMP-2, também pode participar de sua ativação ao se associar à MT1-MMP. A ativação das pró-MMPs requer a dissociação da ligação sulfidrílica entre o resíduo de cisteína no domínio pró-peptídico e o íon zinco no sítio catalítico. A ativação extracelular das MMPs acontece pela ação de proteases, como plasmina e MT-MMPs (18). Além disso, citocinas, fatores de crescimento, angiotensina II e principalmente o estresse oxidativo também podem regular a atividade das MMPs (19). A remoção proteolítica do domínio pró-peptídico do zimogênio (72 kDa) resulta na forma ativa da MMP-2 de 64 kDa (16) (Figura 3).

Estudos *in vitro* mostram que as MMP-2 e MMP-9 talvez possam ser ativadas no meio intracelular por mecanismos de modificação pós-traducionais. Em situações onde há aumento de estresse oxidativo, pode haver a S-glutatiolação do resíduo de cisteína encontrado no domínio pró-peptídico. Essa alteração, que ocorre na presença de peroxinitrito e glutathiona celular, resulta na dissociação da ligação sulfidril que conecta o domínio pró-peptídico ao sítio catalítico e provoca uma modificação estrutural que altera a conformação da MMP-2, deixando o sítio catalítico exposto sem a retirada do pró-peptídeo. O deslocamento do pró-peptídeo pode tornar a MMP-2 de 72 kDa ativa no meio intracelular (20) (Figura 3).

Figura 3 – Ativação proteolítica e/ou não proteolítica das MMPs. Pode haver ruptura total do domínio pró-peptídico gerando a forma ativa de 64kDa ou somente deslocamento dessa porção, resultando numa forma ativa de 72 kDa (Adaptado de Kandasamy *et al.*, 2010) (17).

Além dos TIMPs, algumas drogas sintéticas podem inibir a atividade das MMPs. A doxíciclina é um potente inibidor de MMPs por ser um quelante do íon zinco. Durante o tratamento de ratos hipertensos, diminuiu a hipertrofia e a disfunção vascular (16). O tratamento com doxíciclina reduziu as alterações

estruturais vasculares características da HAS em aortas de ratos hipertensos e, como consequência, diminuiu a pressão sistólica desses animais (21). Em outro estudo, a doxíciclina reduziu transitoriamente a atividade da MMP-2 e a razão M/L em artérias de resistência. Contudo, a ação da MMP-2 no remodelamento eutrófico parece ser diferente do remodelamento hipertrófico que ocorre em artérias de condutância, sugerindo que há mecanismos alternativos de ação dessa enzima no remodelamento de artérias de resistência (22).

1.3 – Ação Intracelular da MMP-2 e seu Efeito no Remodelamento Vascular

As ações extracelulares das MMPs sobre as proteínas da matriz extracelular como colágeno por exemplo, são bastante conhecidas. Contudo, estudos tem revelado que essas enzimas também exercem ação proteolítica sobre alguns peptídeos vasoativos como a *big* endotelina-1, gerando um peptídeo vasoconstritor mais potente (23). O peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, desfazendo sua capacidade vasodilatadora (24) e o peptídeo vasodilatador adrenomedulina, resultando em produtos vasoconstritores (25). Além disso, a MMP-2 tem ação intracelular na proteólise de proteínas estruturais e contráteis, participando do processo de remodelamento e controle do tônus vascular. A ação intracelular da MMP-2 foi demonstrada em corações submetidos à isquemia e reperfusão, em que a MMP-2 foi capaz de degradar proteínas importantes da maquinaria contrátil como a troponina I, α -actinina, titina e cadeia leve da miosina, contribuindo para disfunção cardíaca (20). As proteínas da maquinaria contrátil das CMLVs também podem ser alvos da MMP-2. A calponina-1 foi degradada pela MMP-2 em aortas de ratos

endotoxêmicos e isto contribuiu para o estado de menor contração vascular na sepse (26).

A calponina-1, proteína com peso molecular de 34 kDa, é semelhante estruturalmente à troponina T (27) e tem papel na regulação da função contrátil celular inibindo a atividade Mg-ATPase da miosina (28). Sua ação na maquinaria contrátil pode ser regulada por fosforilação, aumentando a contratilidade celular (28). A calponina-1 está envolvida na regulação da contração do músculo liso vascular por mediar respostas intracelulares de sinalização para alguns vasoconstritores. Em CMLVs de aorta estimuladas com fenilefrina, a calponina-1 fosforilada interage com as vias da proteína quinase C (PKC) e da quinase regulada por sinal extracelular (ERK)1/2 para promover contração (29).

A calponina-1 não está restrita à maquinaria contrátil e se co-localiza ao citoesqueleto (30), o que pode ajudar na polimerização da actina e manter o arcabouço celular. Por isto, a calponina-1 pode ser considerada um marcador de diferenciação celular. Essa proteína está expressa quando as CMLVs estão em seu estado diferenciado. Contudo, no processo de proliferação celular *in vitro*, há diminuição de calponina-1 assim como de outros marcadores de diferenciação celular (31). Em estudo com aortas de ratos submetidos à hipertensão renovascular, a redução de calponina-1 foi associada ao aumento da proliferação celular de CMLVs e ao aumento da atividade de MMP-2 e isto precedeu o remodelamento vascular observado numa fase mais tardia de HAS (32). Além disso, neste mesmo estudo, não houve alteração do RNA mensageiro de calponina-1 nem da expressão de miocardina, seu principal fator de transcrição. Estes autores sugerem que a diminuição de calponina-1

observada nos animais hipertensos seja decorrente de uma alteração pós-traducional como a proteólise por MMP-2.

Em animais submetidos à coarctação da aorta, houve redução de proteínas da maquinaria contrátil como a calponina-1, a esmotelina e a caldesmona durante o curso da HAS. Essa diminuição foi acompanhada de aumento da proliferação das CMLVs (33). Além disso, um estudo feito em ratos hipertensos pelo modelo experimental de acetato de desoxicorticosterona (DOCA)-sal mostrou aumento da proliferação celular em aortas acompanhado de redução da expressão de calponina-1 e miocardina (34). A redução dessas proteínas pode estar associada à transição fenotípica das CMLVs durante o remodelamento vascular, o que é marcado pelo aumento da proliferação e da migração celular. A possível redução de calponina-1 pela MMP-2 pode contribuir ao remodelamento e função vascular na HAS por aumentar a migração e proliferação celular e por causar vasoconstrição.

Hipótese

2. HIPÓTESE

Considerando que durante a HAS ocorre remodelamento vascular com aumento da atividade das MMPs, principalmente da MMP-2, e que a MMP-2 pode possuir ações proteolíticas intracelulares em doenças cardiovasculares associadas ao estresse oxidativo, a hipótese deste trabalho é:

O aumento da atividade de MMP-2 contribui para a redução de calponina-1 em artérias de resistência e de condutância e isto pode levar às alterações morfofuncionais na HAS.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

- Avaliar se a atividade da MMP-2 está aumentada e se isso pode contribuir para redução de calponina-1 em artérias de resistência e de condutância, provocando as alterações morfofuncionais no modelo de hipertensão arterial 2R-1C.

3.2 – Objetivos Específicos

- Avaliar se há aumento da atividade da MMP-2 em artérias de resistência e de condutância de ratos hipertensos;
- Verificar se a MMP-2 regula a calponina-1 em artérias de resistência e de condutância de ratos hipertensos;
- Analisar se essa regulação contribui para as alterações morfofuncionais das artérias de resistência e de condutância;
- Todos estes objetivos serão analisados na presença do inibidor de MMPs, doxíciclina, e comparados os grupos controle.

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Animais

Os protocolos experimentais deste estudo foram realizados utilizando ratos machos Wistar com 180 a 200 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto em salas com temperatura controlada (22-25°C), com ciclos claro/escuro de 12 horas e com livre acesso à água e ração. Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais desta universidade e está registrado sob o nº de protocolo 012/2015-1.

4.2 – Hipertensão Arterial Induzida pela Técnica de Goldblatt

Os animais utilizados nesse estudo foram submetidos à técnica descrita por Goldblatt (dois rins- um clipe, 2R-1C) para indução de HAS. Esta técnica consiste na indução de estenose na artéria renal esquerda pela inserção de um clipe de prata com abertura interna de 0,2 milímetros. Este método leva a uma ativação do sistema renina – angiotensina – aldosterona, resultando em aumento da pressão arterial (35). Os animais usados como controle foram submetidos à laparotomia sem a introdução do clipe na artéria. A cirurgia foi realizada sobre efeito de anestesia geral com ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) injetada por via intraperitoneal.

4.3 – Delineamento experimental

Com o objetivo de estudar os mecanismos envolvidos no remodelamento vascular na fase aguda da hipertensão arterial, os grupos experimentais foram analisados após sete dias de indução da HAS. O estudo

foi feito com sete dias de hipertensão renovascular a fim de se investigar o mecanismo que precede as alterações morfofuncionais da HAS. Amostras de aorta e de artérias mesentéricas foram coletadas. O desenho dos grupos experimentais segue abaixo:

- Sham e Sham + Doxíciclina: Ratos submetidos apenas à laparotomia e que receberam água e doxíciclina por gavagem, na dose de 30 mg/kg/dia (21, 32);
- 2R-1C e 2R-1C + Doxíciclina: Ratos submetidos à estenose da artéria renal esquerda e que receberam água e doxíciclina por gavagem, na dose de 30 mg/kg/dia (21, 32).

A doxíciclina na dose de 30 mg/kg/dia foi escolhida como ferramenta farmacológica neste estudo por inibir a atividade de MMPs e, por esse motivo, melhorar as alterações vasculares da HAS quando administrada de forma aguda (32) e crônica (21).

Somente animais que apresentaram aumento mínimo de 25 mmHg da pressão arterial sistólica (PAS), comparada à pressão basal, foram utilizados nesse estudo. O tratamento foi iniciado no terceiro dia após a indução da hipertensão renovascular e seguiu até o sétimo dia de HAS, conforme previamente descrito (32).

4.4 – Avaliação da Pressão Sistólica por Pletismografia de Cauda

A PAS e o peso corporal dos animais foram avaliados no dia que antecede a laparotomia (basal) e nos sete dias seguidos à cirurgia. A PAS foi verificada pelo método de pletismografia de cauda. Para isto, um manguito

acoplado ao transdutor de pressão foi colocado em torno da cauda dos animais acordados e previamente aquecidos (em placas com temperatura de 37°C). As variações da pressão foram medidas por programa específico de aquisição de dados (CODA, Kent Scientific, EUA). Os resultados foram representados pela média de no mínimo três medidas consecutivas para cada animal.

4.5 – Preparo dos Extratos de Aorta e Artérias Mesentéricas

As aortas torácicas foram cuidadosamente coletadas dos animais e o tecido perivascular foi manualmente retirado. Após a extração, as aortas foram trituradas em nitrogênio líquido e misturadas ao tampão de extração (10 mM Fluoreto de Sódio (#201154, Sigma-Aldrich, EUA) ; 1 mM Ortovanadato de Sódio (#S6508, Sigma-Aldrich, EUA); 1x Coquetel Inibidor de Proteases (#S8820, Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão RIPA gelado (#R0278, Sigma-Aldrich, EUA) numa proporção de 100 µl de tampão de extração para cada 10 mg de tecido. As amostras trituradas foram então deixadas em contato com o tampão por 2 horas, sob agitação lenta e constante, a 4°C. Em seguida, os extratos foram centrifugados a 13.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C.

Para retirada das artérias mesentéricas do animal, a artéria mesentérica principal foi canulada com o animal ainda vivo e anestesiado. Passou-se pela cânula, com o auxílio de uma seringa, 10 mL de solução de Krebs (118 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 1,2 mM KH₂PO₄; 1,6 mM MgSO₄.7H₂O; 24,9 mM NaHCO₃; 11,1 mM glicose e 2,5 mM CaCl₂.2H₂O – pH 7,4) para retirada do sangue. Em seguida, o intestino foi removido do animal e aberto em placa de Petri para visualização do leito mesentérico. As artérias mesentéricas, com exceção da

artéria mesentérica principal, tiveram o tecido gorduroso cuidadosamente retirado com auxílio de pinças. As artérias coletadas foram então trituradas em nitrogênio líquido e misturadas ao mesmo tampão de extração das aortas, sendo 200 µl de tampão para cada amostra coletada. As amostras trituradas foram deixadas em contato com tampão por 2 horas, sob agitação lenta e constante, a 4°C. Em seguida, os extratos foram centrifugados a 13.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C.

4.6 – Dosagem de Proteínas pelo Método de Bradford

A técnica de Bradford é utilizada para a determinação de proteínas totais. Baseia-se na interação entre o corante e proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. Na reação, a interação entre a proteína e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, de cor azul, que absorve fortemente em 595 nm (36). Os extratos de aortas e artérias mesentéricas foram diluídos em água destilada nas proporções de 1:10 e 1:5, respectivamente, como previamente padronizado. As amostras diluídas foram aplicadas em placa de 96 poços juntamente com uma curva padrão de calibração de soro fetal bovino (BSA) nas concentrações crescentes de 0,0875, 0,175, 0,35, 0,70, e 1,4 mg/mL. Água deionizada foi usada como “branco” da reação. A placa com as amostras foi deixada em contato com o corante de Bradford por 20 minutos sob agitação lenta e abrigada da luz. Em seguida, as amostras foram analisadas por espectrofotometria para determinação da concentração protéica.

4.7 – Avaliação da Atividade de MMP-2 por Zimografia em Gel

A zimografia em gel é uma técnica utilizada para avaliar a atividade das gelatinases, como a MMP-2. Seu princípio baseia-se no fato da MMP-2 degradar a gelatina presente no gel após a eletroforese. Extratos de aortas (30 µg de proteínas) e de artérias mesentéricas (40 µg de proteínas) foram misturadas a um tampão não redutor na proporção de 1:1 v/v. As amostras foram aplicadas em géis de poliacrilamida a 12% e separadas por eletroforese, conforme a técnica de SDS-PAGE. Após este processo, os géis foram submetidos a dois banhos de Triton X-100 a 2% para remoção do SDS e foram colocados em solução 50 mM Tris-HCl e 10 mM CaCl₂ pH 7.4, por no mínimo 16 horas, a 37°C. Posteriormente, os géis foram corados em solução Coomassie Blue 0,05% por no mínimo uma hora.

Para visualização das bandas referentes à MMP-2, os géis foram descorados com solução de 30% metanol e 10% ácido acético. Observou-se a formação de bandas claras contra o fundo azul escuro do Coomassie (devido à degradação da gelatina incorporada ao gel). Para cada gel foi utilizado um controle interno positivo (BSA a 2%). A quantificação das bandas de MMP-2 foi feita por meio do *software Image J* (National Institute of Health, NIH, EUA). A atividade de MMP-2 foi normalizada pelo padrão de soro fetal bovino em cada gel. A MMP-2 foi identificada por meio dos seus pesos moleculares: 75, 72 e 64 KDa (37).

4.8 – Avaliação da Atividade e Expressão de MMP-2 por Zimografia *in situ* Seguida de Imunofluorescência

A zimografia *in situ* permite analisar a atividade gelatinolítica da MMP-2 diretamente no tecido pela utilização do substrato *DQ-gelatin* a 1mg/mL

(diluição de 1:10 em 50 mM Tris-HCl + 10 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - pH 7.4) em cortes de aorta e do segundo ramo de artérias mesentéricas previamente inseridas em *Tissue-Tek* OCT. Cortes de 5 μm de espessura foram colocados em lâminas silanizadas e incubadas com *DQ-gelatin* a 37°C por uma hora em câmara úmida e escura. Os cortes foram então lavados três vezes por 1 minuto cada com tampão sódio-fosfato (PBS) a 0,1 M. A imunofluorescência para MMP-2 foi feita logo em seguida, incubando os cortes com anticorpo primário para MMP-2 (diluição 1:200; Millipore #MAB3308, EUA) por 1 hora em temperatura ambiente em câmara úmida e escura seguida de 3 lavagens com PBS 0,1 M. O anticorpo secundário anti-*mouse* rodamina (diluição 1:200, Millipore #AP181R, EUA) foi utilizado por 1 hora em temperatura ambiente em câmara úmida e escura, seguida de 3 lavagens com PBS 0,1 M. Os cortes foram incubados com paraformaldeído a 4% por 20 minutos em temperatura ambiente e lavados uma última vez com PBS 0,1 M. A degradação da *DQ-gelatin* emite uma fluorescência verde enquanto que a fluorescência emitida pelo anticorpo secundário de MMP-2 é vermelha. As imagens foram obtidas por microscópio de fluorescência (Carl Zeiss Microscopy Ltd., England) no aumento de 400x para aortas e 200x para artérias mesentéricas. A quantificação das duas fluorescências foi feita por meio do programa *Image J* (NIH, EUA), como previamente descrito (38). A média de intensidade de fluorescência de 40 quadrados para aorta e 80 para artéria mesentérica foi utilizada como resultado de cada amostra. Os quadrados selecionados apresentaram a mesma área para todas as medidas. Artérias de animais Sham tratados com água que foram incubadas somente com PBS 1x, anticorpo primário para MMP-2 ou

anticorpo secundário rodamina foram utilizadas como controles negativos do experimento.

4.9 – Imunofluorescência para Calponina-1

Aortas e segundos ramos de artérias mesentéricas previamente incluídos em OCT foram cortados em 5 µm de espessura no criostato e fixados em acetona gelada por 5 minutos. As artérias foram lavadas com PBS 0,1 M seguido de duas lavagens com 0,3% Triton X-100 em PBS 0,1 M. Os cortes foram então bloqueados com *donkey serum* 10% v/v (#S-30, Millipore, EUA) por 1 hora. Depois disso, as secções arteriais foram incubadas com anticorpo monoclonal para calponina-1 (diluição de 1: 250 em PBS 0,1 M, Abcam, #ab46794) por 1 hora em temperatura ambiente em câmara escura umidificada. O anticorpo secundário anti-*rabbit* Alexa 488 (diluição de 1: 200 para aortas e 1:1.000 para artérias mesentéricas, Molecular Probes, #A21206) foi usado e as amostras foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente em câmara escura umidificada. A seguir, os cortes foram lavados com PBS 0,1 M seguido de duas lavagens com 0,3% Triton X-100 em PBS 0,1 M. As imagens foram examinadas por microscopia fluorescente (Carl Zeiss Microscopy Ltd., England) e capturadas em 400 x para aorta e 200 x para artérias mesentéricas. Os níveis de calponina-1 foram obtidos pela quantificação da fluorescência verde por área, usando o *Image J* (NIH, EUA). A média de intensidade de fluorescência de 40 quadrados para aorta e 80 quadrados para artérias mesentéricas foi utilizada como resultado de cada amostra. Os quadrados selecionados apresentam a mesma área para todas as medidas. Artérias de animais Sham incubadas somente com PBS 1x, anticorpo

primário para calponina-1 ou anticorpo secundário Alexa 488 foram utilizadas como controles negativos do experimento.

4.10 – Western Blot para Calponina-1 em Artérias Mesentéricas

A técnica de Western Blot é utilizada para avaliar a expressão proteica. O método consiste na separação de proteínas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida. Os extratos de artérias mesentéricas (40 µg) foram misturados ao tampão redutor na proporção de 1:1 v/v e aquecidos a 95°C por 5 minutos, seguido de aplicação em gel de poliacrilamida a 10%. Um padrão de peso molecular (#26619, Thermo Scientific, EUA) foi aplicado junto às amostras para facilitar a identificação das proteínas de interesse. Após a eletroforese, os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose com auxílio de um aparato de transferência úmida (#TE22 Mini Tank Transfer Unit, GE Healthcare, EUA) em tampão de transferência (20% metanol, 48 mM Tris-base, 39 mM glicina e 0.04% m/v SDS) para determinação dos níveis de calponina-1 e β -actina. As membranas foram então bloqueadas com leite desnatado a 5% diluído em tampão TBS-T (100 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl; 0,1% Tween) por 1 hora sob agitação lenta e em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* com o anticorpo primário da calponina-1 (diluição 1:10.000 em BSA 5%, Abcam #ab46794) em agitação lenta a 4°C.

No dia seguinte, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-*rabbit* (diluição 1:3.000 em TBS-T, Millipore #12-348) por 1 hora em temperatura ambiente e visualizadas usando um *kit* de reação de quimioluminescência (GE Healthcare, EUA) pelo fotodocumentador (Amersham

Imager 600, GE Healthcare, EUA). Em seguida, as membranas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com o anticorpo primário da β -actina (diluição 1:4.000 em BSA 5%; Millipore #MAB1501). Após esse tempo, o anticorpo secundário anti-*mouse* (diluição 1:10.000 em TBS-T; Millipore, #12349) foi adicionado às membranas por 1 hora. As membranas foram então visualizadas no fotodocumentador. A intensidade das bandas foi quantificada utilizando *software Image J* (NIH, EUA) (26). A razão entre a intensidade das bandas de calponina-1 e β -actina foi utilizada como resultado de cada amostra.

4.11 – Avaliação da Proliferação de CMLVs por Imunohistoquímica para Ki-67

A aorta foi cuidadosamente removida do animal e fixada em paraformaldeído tamponado a 10% v/v (pH 7,0) por 24 horas, seguido por mais 24 horas em etanol 70% v/v. A seguir, os tecidos foram lavados numa sequência de álcool e xilol e incluídos em parafina. Os segundos ramos de artérias mesentéricas foram removidos do leito mesentérico do animal sem retirada do tecido adiposo adjacente e lavados duas vezes por dez minutos cada com solução salina fisiológica livre de cálcio (PSS) (em mM) (NaCl 112; NaHCO₃ 25,7; KCl 4,9; MgSO₄·7H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,2; glicose 11,5; HEPES 10 e EGTA 0,5). Em seguida, foram lavados uma vez por dez minutos com PSS isento de cálcio com nitroprussiato de sódio a 10 μ M a fim de evitar que as artérias mesentéricas colabassem, mantendo assim sua estrutura original (39). As artérias mesentéricas então foram fixadas por 48 horas em paraformaldeído tamponado a 10% v/v (pH 7.0) seguido por 24 horas em etanol a 70% v/v e incorporados em parafina (mesmo protocolo das aortas). Ambos tecidos foram

cortados em 5 µm de espessura no micrótomo e colocados em lâminas de vidro (#112711, StarFrost) .

Para execução da imunohistoquímica, as amostras foram desparafinizadas em xilol e depois reidratadas em uma série de álcool, partindo de etanol a 100% até 70% v/v. As secções arteriais foram então lavadas em tampão de lavagem disponível no *kit* de imunohistoquímica (Millipore #DAB500) e submetidas à recuperação antigênica induzida por calor, inibição da peroxidase endógena e bloqueio, seguindo protocolo do kit de imunohistoquímica (Millipore #DAB500). Posteriormente, as artérias foram incubadas *overnight* com o anticorpo anti-Ki67 (diluição 1:50 em BSA 5%, Abcam #ab16667) e por 2 horas com anticorpo secundário específico (Millipore #DAB500). O antígeno Ki67 foi visualizado pela marcação com substrato 3, 3'-diaminobenzidina (DAB) (Millipore #DAB500). Os cortes foram corados com hematoxilina e examinados usando microscopia de luz (Carl Zeiss Microscopy Ltd., England), sendo capturados em 200 x. Cinco regiões da aorta foram escolhidas e usadas para o cálculo da porcentagem de Ki67 pela quantidade total de núcleos com *Image J* (NIH, EUA). Em artérias mesentéricas, calculou-se o percentual de Ki67 em toda a artéria numa única foto. A marcação para Ki67 foi considerada positiva se uma cor marrom claramente detectável foi observada no núcleo. A média aritmética das cinco áreas foi calculada e expressa da seguinte forma: núcleos marcados com Ki67 / núcleos totais x 100 (32, 33). Cortes de glândula adrenal foram utilizados como controle positivo em cada experimento.

4.12 – Análise Morfológica de Aortas e Artérias Mesentéricas

As aortas torácicas foram incorporadas em parafina, cortadas em 5 μm de espessura no micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina, como previamente descrito em 4.11. Os primeiros e segundos ramos de artérias mesentéricas também foram incluídos em parafina conforme 4.11 e corados com Tricromo de Masson. Essa coloração permite a diferenciação da camada média e da adventícia, facilitando a identificação e quantificação dos parâmetros relacionados à camada média arterial. Os parâmetros morfológicos razão M/L e CSA foram quantificados por *Image J* (NIH, EUA) (21). A razão M/L foi calculada como a divisão da camada média (M) pelo diâmetro interno (DI), onde M é representada pelo diâmetro externo (DE)-DI/2. DE e DI são representados como raiz quadrada de $4 \times \text{área externa} / \pi$ e a raiz quadrada de $4 \times \text{área interna} / \pi$, respectivamente. O CSA foi calculado subtraindo a área interna do lúmen da área externa.

As propriedades estruturais e mecânicas do segundo ramo das artérias mesentéricas foram determinadas por miógrafo pressurizado (Danish Myo Tech, 110P and 111P models, Aarhus, Denmark). Segmentos de artérias mesentéricas (3-4 mm de comprimento) foram canulados entre duas micropipetas de vidro (100 μm de diâmetro) e amarrados com fio de nylon. O comprimento arterial foi ajustado até que as paredes arteriais estivessem em paralelo. Neste momento, a pressão intraluminal foi aumentada para 140 mmHg para o ajuste das condições experimentais. Depois disso, a pressão foi reduzida para 70 mmHg sem fluxo intraluminal e as artérias foram estabilizadas por 30 minutos. As artérias foram mantidas durante todo protocolo em solução fisiológica de Krebs isento de cálcio (em mM) (NaCl 118; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,2;

MgSO₄.7H₂O 1,64; NaHCO₃ 24,9; glicose 11,1; EGTA 10) com 95% de O₂ e 5% CO₂. Após a estabilização, a pressão intraluminal foi reduzida para 3 mmHg e obteve-se uma curva de pressão-diâmetro crescente de 3 mmHg até 140 mmHg (3, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120 e 140 mmHg). A pressão em cada ponto manteve-se durante 3 minutos para medir os DI e DE por *software* específico (MyoVIEW II, Danish Myo Tech). Os valores de DI e DE foram utilizados para calcular as propriedades estruturais e mecânicas de artérias mesentéricas em condições passivas. A razão M/L, CSA, distensibilidade, estresse e tensão foram calculados como descrito anteriormente (40).

4.13 – Curva Concentração-Efeito para Fenilefrina em Artérias Mesentéricas

Os animais foram sacrificados e segmentos de terceiro ramo de artérias mesentéricas, medindo cerca de 2 mm de comprimento, foram montados em miógrafo de tensão (Danish Myo Tech, Model 620M, A/S, Århus, Denmark). As artérias foram mantidas em uma solução de Krebs-Henseleit modificada (KHS) (em mM) (NaCl 130; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,18; MgSO₄ 1,17; 14,9 NaHCO₃, glicose 5,5; EDTA 0,03 e CaCl₂ 1.6), a uma temperatura constante de 37° C, pH 7,4 e gaseificadas com uma mistura de 95% de O₂ e 5% CO₂.

As artérias mesentéricas foram submetidas à tensão de 13,3 kPa (quilopascal) e permaneceram em repouso por 30 minutos para estabilização. As amostras foram então estimuladas com solução de Krebs com alta concentração de potássio (KCl 120 mM) para avaliação da capacidade contrátil dos segmentos. Depois de lavar e retornar para a tensão basal, as artérias foram previamente contraídas com fenilefrina (3 µM) e depois estimuladas com

a acetilcolina (ACh, 10 μ M), para avaliar a presença de endotélio funcional. As amostras que exibiram uma resposta vasodilatadora para ACh maior que 80% foram consideradas com endotélio intacto. Depois de lavar as amostras e deixar por um período de estabilização, realizou-se a curva concentração-efeito para fenilefrina. As artérias mesentéricas foram estimuladas com fenilefrina (0,1 nM a 30 μ M) para produzir contrações, que foram medidas como o aumento da tensão de linha de base. A potência dos agonistas foi expressa como pD_2 (logaritmo negativo da concentração molar que produz 50% da resposta máxima) e E_{max} (efeito máximo possível para o agonista).

4.14 – Curva Concentração-Efeito para Fenilefrina em Aortas:

Animais anestesiados com 250 mg/kg de tribromoetanol por via intraperitoneal tiveram a aorta torácica cuidadosamente removida, limpa de tecidos aderentes conjuntivos e gordura e cortada em anéis de 4mm de comprimento. Os anéis da aorta foram montados para a obtenção de tensão isométrica e colocados em câmaras para banho de órgãos (5 mL) contendo solução de Krebs modificada (em mM) (130 NaCl; 1,6 $CaCl_2$; 1,2 $MgSO_4$; 1,2 KH_2PO_4 ; 4,7 KCl; 14,9 $NaHCO_3$; 5,5 glicose) (41). A solução foi mantida a 37°C e pH 7,4 e continuamente gaseificada com 95% de O_2 e 5% CO_2 . O sistema foi conectado a um transdutor de força isométrica (Letica Scientific Instruments, Barcelona, Spain) para medida da tensão, sendo os registros gravados no programa LabChart versão 4.04 (PowerLab, AD Instruments, 2000). Os anéis foram submetidos à tensão basal de 1,5 g durante um período de estabilização de 60 minutos e a solução do banho foi trocada a cada 15-20 minutos.

Depois da estabilização, a integridade endotelial foi avaliada pelo grau de relaxamento que a ACh (1 μ M) suscitou na presença de tônus contrátil induzido pela fenilefrina (100 nM). Curvas concentração-efeito cumulativas de fenilefrina (a partir de 0,1 nM a 10 μ M) foram então construídas em anéis da aorta com endotélio intacto. A potência da fenilefrina foi expressa como pD_2 e o efeito máximo como Emax.

4.15 – Análise Estatística

Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Bonferroni usando GraphPad Prism Software, versão 5.0 (Califórnia, EUA). Considerou-se estatisticamente significativos os valores com $p < 0,05$. Os gráficos foram representados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As curvas concentração-efeito foram analisadas por regressão não-linear usando GraphPad Prism Software, versão 5.0 (Califórnia, EUA). A análise estatística dos valores de Emax e pD_2 foi realizada pela análise de regressão não-linear, seguido por ANOVA de duas vias.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 – Aumento da atividade da MMP-2 em Artérias de Condutância e Resistência na Hipertensão Renovascular

A PAS aumentou nos ratos submetidos à cirurgia 2R-1C na primeira semana de HAS ($p<0,05$) e o tratamento com doxiciclina não a reduziu ($p>0,05$) (figura 4A). A PAS se manteve aumentada desde o terceiro dia após a cirurgia até o sétimo dia e o tratamento não foi capaz de reduzi-la (figura 4C). A HAS reduziu o peso corporal dos animais ($p<0,05$) e o tratamento com doxiciclina não foi capaz de restaurá-lo ($p>0,05$) (figura 4B).

A atividade de MMP-2 foi avaliada por zimografia *in situ* e imunofluorescência nos dois leitos arteriais. A doxiciclina reverteu o aumento da atividade de MMP-2 causado pela hipertensão nas aortas e artérias mesentéricas ($p<0,05$). A expressão de MMP-2 por imunofluorescência foi reduzida após o tratamento quando comparada ao grupo hipertenso ($p<0,05$) (figura 5A e 5B). A atividade de MMP-2 também foi analisada por zimografia em gel tanto em aortas (figura 6A) quanto em artérias mesentéricas (figura 6B) e, embora não se tenha observado aumento de atividade de MMP-2 nas aortas de animais 2R-1C quando comparados aos grupos Sham, houve aumento nas artérias mesentéricas e a doxiciclina reverteu esta alteração ($p<0,05$).

Figura 4 - Efeito do tratamento com doxiciclina sobre a PAS (painéis A e C) e peso corporal (painel B) sete dias após a cirurgia 2R-1C (n= 13). * $p < 0,05$ versus Sham e Sham + Doxi.

Figura 5 - Efeito do tratamento com doxiciclina sobre a atividade e expressão de MMP-2. Fotografias representativas (400 x), média de atividade gelatinolítica e níveis de MMP-2 na aorta (painel A) e em artérias mesentéricas (painel B) (n = 6-10). Dados são * $p < 0,05$ versus todos os grupos. # $p < 0,05$ versus Sham e Sham+Doxi. Escala é 20 μ m.

Figura 6 - Efeito do tratamento com doxiciclina sobre a atividade de MMP-2. Painel A mostra figura representativa, atividade de 72 kDa MMP-2, atividade de 64 kDa MMP-2 e atividade total de MMP-2 em aortas (n = 3-5) e o painel B em artérias mesentéricas (n = 4-9). * $p < 0,05$ versus todos os grupos; # $p < 0,05$ versus Sham e Sham + Doxi.

5.2 –Aumento de Atividade de MMP-2 Contribuiu para as Alterações Morfofuncionais Sete Dias Após Cirurgia 2R-1C

O aumento da atividade de MMP-2 nas aortas contribuiu para o remodelamento e a disfunção vascular observadas na HAS. A figura 7A mostra que houve aumento de proliferação de CMLVs nas aortas de ratos 2R-1C, representada pelo aumento da expressão de Ki67 nos núcleos ($p < 0,05$). Esse efeito é revertido com o tratamento com doxíciclina ($p < 0,05$). Para verificar se esse aumento de proliferação celular contribui para o remodelamento hipertrófico da aorta, os parâmetros morfológicos CSA e razão M/L foram analisados. Sete dias após a cirurgia 2R-1C houve aumento de CSA e da razão M/L nos animais hipertensos comparados aos grupos Sham ($p < 0,05$), caracterizando um remodelamento do tipo hipertrófico, característico de artérias de condutância (Figura 8A). O tratamento com doxíciclina, embora tenha revertido a proliferação de CMLVs, não foi capaz de reverter o remodelamento ($p > 0,05$ vs. 2R-1C, Figura 8A). Entretanto, oito semanas de tratamento com doxíciclina foi capaz de reverter o remodelamento hipertófico observado em aortas de ratos 2R-1C (21).

Por outro lado, uma semana de HAS não foi capaz de induzir a proliferação de CMLVs e nenhum tipo de remodelamento nos primeiros e segundos ramos das artérias mesentéricas (Tabela 1, Figuras 7B, 8B e 9). Além disso, também não houve alteração de propriedades mecânicas de artérias mesentéricas, como a distensibilidade, em animais 2R-1C (Tabela 1).

Figura 7 - Efeito do tratamento com doxiciclina sobre a proliferação de CMLVs. Painel A mostra figuras representativas (200x) e índice de Ki67 obtido por imunohistoquímica em aortas (n = 5-6) e o painel B mostra os mesmos parâmetros em artérias mesentéricas (n = 5-10). *p<0,05 versus Sham, Sham+Doxi e 2R-1C+Doxi. Escala é 50 µm. M= Camada média e L= Lúmen.

A

Sham

Sham + Doxi

2R-1C

2R-1C + Doxi

B

Sham

Sham + Doxi

2R-1C

2R-1C + Doxi

Figura 8 - Efeito do tratamento com doxiciclina sobre CSA e razão M/L em aortas (Painel A - n = 5-7, 25x, Escala 200 μm) e segundos ramos de artérias mesentéricas (Painel B - n = 2-8, 200x, Escala 50 μm). * p<0,05 versus Sham e Sham + Doxi.

Figura 9 - Efeito do tratamento com doxiciclina sobre CSA e razão M/L nos primeiros ramos de artérias mesentéricas de animais hipertensos (n = 3-7, 100x).

Tabela 1 - Efeito do tratamento com doxíciclina sobre os parâmetros morfológicos e mecânicos de artérias mesentéricas.

Artérias mesentéricas				
	Sham	Sham+Doxi	2R-1C	2R-1C+Doxi
Diâmetro Interno (μm)	205,7 $\pm$ 11,8	205,6 $\pm$ 14,9	209,2 $\pm$ 13,2	212,0 $\pm$ 14,1
Diâmetro externo (μm)	284,0 $\pm$ 11,9	297,8 $\pm$ 14,4	302,9 $\pm$ 12,9	300,8 $\pm$ 11,1
M/L (%)	0,22 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,02	0,23 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,02
CSA (μm^2)	3,75x10 ⁴ $\pm$ 2,05x10 ³	3,89x10 ⁴ $\pm$ 1,42x10 ³	4,23x10 ⁴ $\pm$ 2,23x10 ³	3,79x10 ⁴ $\pm$ 0,71x10 ³
Distensibilidade (% mmHg ⁻¹)	0,45 $\pm$ 0,12	0,57 $\pm$ 0,14	0,48 $\pm$ 0,12	0,55 $\pm$ 0,14
Estresse ($\chi 10^6$ dynas cm ²)	0,22 $\pm$ 0,06	0,24 $\pm$ 0,07	0,24 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,09
Tensão	0,36 $\pm$ 0,08	0,51 $\pm$ 0,12	0,39 $\pm$ 0,09	0,47 $\pm$ 0,10

(n=6)

Houve aumento significativo na potência para indução de contração da fenilefrina em aortas de animais hipertensos quando comparados aos grupos Sham ($p < 0,05$, Figura 10A e Tabela 2), mas nenhuma alteração foi observada no Emax. O tratamento com doxíciclina foi capaz de diminuir este efeito da fenilefrina em animais hipertensos ($p < 0,05$ versus 2R-1C, Figura 10A e Tabela 2). Embora não tenha sido observada diferença no remodelamento de artérias de resistência com uma semana de HAS, os terceiros ramos de artérias mesentéricas de animais 2R-1C apresentaram resposta contrátil maior à fenilefrina quando comparados aos grupos Sham e a doxíciclina foi capaz de reverter essa vasoconstrição em animais hipertensos ($p < 0,05$ versus 2R-1C, Figura 10B e Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito do tratamento com doxiciclina na resposta contrátil à fenilefrina em aortas e nos terceiros ramos de artérias mesentéricas.

Aorta				
	Sham	Sham+Doxi	2R-1C	2R-1C+Doxi
Efeito máximo (g)	1,86 ± 0,05	2,03 ± 0,10	2,06 ± 0,12	2,12 ± 0,11
pD_2	7,01 ± 0,04	7,24 ± 0,09	8,41 ± 0,25 *	7,65 ± 0,17

Artérias Mesentéricas				
	Sham	Sham+Doxi	2R-1C	2R-1C+Doxi
Efeito máximo (%KCl)	129,3 ± 2,66	136,6 ± 2,68	146,9 ± 2,21 *	131,2 ± 1,52
pD_2	6,18 ± 0,06	6,10 ± 0,05	6,19 ± 0,03	6,16 ± 0,02

n= 5 em aortas e n=3-6 em artérias mesentéricas. * $p<0,05$ versus Sham, Sham+Doxi e 2R-1C+Doxi.

A - Aorta

B – Artérias Mesentéricas

Figura 10 - Efeito da doxiciclina sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aortas (Painel A, n = 5) e nos terceiros ramos de artérias mesentéricas (Painel B, n = 3-6). * $p<0,05$ versus Sham, Sham+Doxi e 2R-1C+Doxi.

5.3 – MMP-2 Regula Calponina-1 de Maneira Diferente em Aortas e Artérias Mesentéricas na HAS

A calponina-1 é um alvo potencial de MMP-2 na vasculatura durante fases iniciais da HAS (32) e na endotoxemia (26). Como a calponina-1 é um importante marcador de diferenciação de CMLVs e regula a contração da musculatura lisa por inibir o ciclo de ligação de actina e miosina, ela pode ser um mecanismo pelo qual MMP-2 promove remodelamento e disfunção vascular na fase aguda da HAS.

Aortas de ratos hipertensos tiveram redução da expressão proteica de calponina-1 obtida por imunofluorescência quando comparada aos grupos controles ($p < 0,05$, Figura 11A). O tratamento com doxiciclina foi capaz de reverter essa alteração em animais 2R-1C ($p < 0,05$ versus 2R-1C, Figura 11A). Contudo, nos segundos ramos de artérias mesentéricas de ratos hipertensos a situação observada foi a oposta: houve aumento da expressão proteica de calponina-1 em animais 2R-1C quando comparados aos grupos controles ($p < 0,05$, Figura 11B). O tratamento com doxiciclina parece reverter este cenário ($p = 0,06$ versus 2R-1C, Figura 11B).

A expressão proteica de calponina-1 obtida por western blot de artérias mesentéricas não mostrou nenhuma alteração. Isso talvez se deva ao fato de que para executar esta técnica, foi utilizado todos os ramos de artérias mesentéricas do leito mesentérico. Como os ramos são expostos a diferentes condições pressóricas, talvez os estímulos para remodelamento e alteração de função vascular sejam diferentes, o que de certa forma neutralizou a resposta

de aumento de expressão de calponina-1 observado somente nos segundos ramos dessas artérias (Figura 12).

Esses resultados sugerem que a MMP-2 pode diminuir os níveis de calponina-1 em artérias de condutância de ratos hipertensos e isto pode levar ao remodelamento hipertrófico e a disfunção vascular observados nesses animais. Por outro lado, a MMP-2 pode aumentar a expressão de calponina-1 em artérias de resistência, o que não leva ao remodelamento vascular mas contribui para a hipercontratibilidade vascular observada na fase inicial da HAS. O mecanismo que envolve a MMP-2 aumentando expressão de calponina-1 em artérias de resistência ainda não foi elucidado, mas talvez esteja relacionado as ações extracelulares dessa protease e necessita de novas investigações. A MMP-2, ao clivar o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), talvez possa aumentar a expressão proteica de calponina-1 por ativar a via de sinalização RhoA-GTPase culminando na maior expressão de miocardina, principal fator de transcrição da calponina-1.

Figura 11 - Efeito do tratamento com doxiciclina na expressão de calponina-1. Painel A mostra figuras representativas (400x) e expressão de calponina-1 obtida por imunofluorescência em aortas (n = 8-7) e o painel B mostra os mesmos parâmetros em artérias mesentéricas (n = 11-7). * $p < 0,05$ versus Sham, Sham+Doxi e 2R-1C+Doxi. & $p < 0,05$ versus Sham e Sham+Doxi. Escala é 20 μm .

Figura 12 - Efeito do tratamento com doxiciclina na expressão de calponina-1 em artérias mesentéricas obtida por western blot (n = 9-8).

Discussão

6. DISCUSSÃO

Este estudo mostrou que a atividade e expressão de MMP-2 está aumentada em artérias de condutância e resistência na HAS e isto contribui para o remodelamento e disfunção vascular observados na fase aguda da doença. Esses efeitos estão particularmente relacionados à divergência na regulação que a MMP-2 exerce sobre a calponina-1, tornando seus níveis diminuídos em artérias de condutância e aumentados em artérias de resistência.

O aumento de PAS contribui para o remodelamento vascular crônico e disfunção vascular, o que leva a alterações na matriz extracelular e a mudança de fenótipo de CMLVs (42). Essas alterações têm sido relacionadas ao aumento de atividade de MMPs. O tratamento crônico com doxíciclina em animais com hipertensão renovascular foi capaz de melhorar o remodelamento e a disfunção vascular observadas na doença, além de diminuir a PAS, e isto foi relacionado à diminuição da atividade de MMPs (21). Embora na fase aguda da HAS a doxíciclina não tenha reduzido a PAS, o tratamento foi capaz de reverter a vasoconstrição induzida por MMP-2 em artérias de resistência e a proliferação de CMLVs em aortas, sugerindo que o aumento na atividade de MMP-2 precede as alterações vasculares comuns à HAS.

O modelo de hipertensão renovascular 2R-1C escolhido para esse estudo consiste na ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona pela inserção de um clipe de prata na artéria esquerda do animal (35). Uma vez ativado, o sistema aumenta a angiotensina II circulante que, via receptor AT_1 , contribui para o aumento da expressão de MMP-2 em CMLVs (43). Além disso, a angiotensina II também aumenta a atividade de NADPH oxidase que contribui

para o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que colabora para a ativação de MMP-2. O tratamento de ratos hipertensos com tempol e apocinina reduziu significativamente a atividade de MMP-2 (44).

A ativação intracelular de MMP-2 tem sido ligada ao aumento do estresse oxidativo. O peroxinitrito juntamente com a glutathione pode modular a atividade da forma de 72 kDa de MMP-2 por modificar o resíduo de cisteína no domínio pró-peptídico do zimogênio, liberando o sítio catalítico, um processo que pode ser relevante a processos fisiopatológicos associados ao aumento do estresse oxidativo, como a HAS (45). Em aorta de ratos endotoxêmicos (situação em que há aumento na produção de EROs), a S-glutathionilação de MMP-2 foi evidenciada (26). O estresse oxidativo gerado pela HAS pode provocar ativação intracelular de MMP-2 e isso pode contribuir para o quadro de remodelamento vascular característico da doença.

A inibição de MMP-2 na fase aguda da HAS pode ser essencial para controlar o aumento da PAS e as alterações vasculares crônicas. A MMP-2 é uma protease importante que regula o remodelamento vascular fisiopatológico na HAS crônica (14, 21, 22, 42). O aumento da atividade dessa enzima contribui para a proteólise de componentes da matriz extracelular, o que resulta no aumento da migração de CMLVs e hipertrofia da camada média arterial.

No remodelamento hipertrófico, a migração e proliferação de CMLVs contribuem para o aumento da espessura da camada média e da CSA, o que culmina em rigidez arterial por aumentar a deposição de colágeno devido a reestruturação de matriz extracelular (14, 21, 22, 42). Diferentemente do remodelamento hipertrófico, o remodelamento eutrófico é caracterizado pela migração de CMLVs sem que ocorra proliferação celular. As CMLVs migram

para que haja um novo arranjo estrutural da camada média, permitindo que essas células possam se sobrepor ao redor do lúmen arterial, provocando vasoconstrição (8, 46). De fato, com uma semana de HAS, o aumento da proliferação celular nas aortas culminou em remodelamento hipertrófico e não houve alteração na proliferação de CMLVs em artérias mesentéricas, confirmando os achados prévios.

A atividade de MMP-2 está aumentada em artérias de condutância e resistência em diferentes modelos de HAS e isto geralmente contribui para o remodelamento vascular crônico (21, 22, 47, 48). Além disso, atividade aumentada de MMP-2 foi observada em apenas algumas horas de incubação de arteríolas de ratos com noradrenalina e angiotensina II *in vitro*, efeito que resultou em remodelamento eutrófico de artérias de resistência (47). Contudo, os mecanismos nos quais MMP-2 contribui para as alterações vasculares da HAS precisam ser mais estudados.

Este trabalho mostra pela primeira vez que a atividade e expressão de MMP-2 estão aumentadas nas artérias de resistência na fase inicial da hipertensão renovascular, e isto contribuiu para a vasoconstrição observada nos animais 2R-1C, mas não para o remodelamento vascular durante o período do estudo. Já se sabe que uma vasoconstrição contínua induzida por alguns agonistas pode ajudar a desenvolver o remodelamento eutrófico em artérias de resistência (49, 50), logo, o aumento da resistência vascular periférica provocada por MMP-2 pode ser o gatilho para o desenvolvimento do remodelamento eutrófico em artérias de resistência numa fase mais tardia da doença. Um trabalho prévio mostrou que o remodelamento eutrófico de artérias mesentéricas de ratos submetidos à HAS por administração de L-NAME surge

apenas com duas semanas da doença e isto foi associado ao aumento da atividade de MMP-2 (22).

Embora não tenha sido observada nenhuma alteração estrutural em artérias de resistência com uma semana de HAS, o cenário foi completamente oposto em artérias de condutância. O aumento da atividade de MMP-2 contribuiu para o aumento da proliferação de CMLVs e para o remodelamento hipertrófico e o tratamento com doxíciclina reduziu somente a proliferação celular. Contudo, a doxíciclina pode reduzir a hipertrofia da camada média induzida por HAS quando usada de forma crônica (21, 38, 51). Além disso, um estudo prévio do nosso laboratório mostrou que o aumento da atividade de MMP-2 em aortas de ratos 2R-1C contribuiu para a proliferação de CMLVs mesmo sem ter havido hipertrofia da camada media arterial (32). Sabe-se que MMP-2 induz migração e proliferação de CMLVs durante a HAS (42, 50) e que a mudança de fenótipo das CMLVs de contrátil para sintético contribui para o espessamento da parede arterial (52).

A potência da fenilefrina para induzir contração em aortas de ratos 2R-1C estava aumentada e o tratamento com doxíciclina foi capaz de reverter essa alteração, sugerindo que MMP-2 contribui diretamente para a hipercontratilidade das aortas e para o remodelamento hipertrófico. A MMP-2 pode regular o tônus vascular por clivar a grande endotelina-1 e a adrenomedulina gerando peptídeos vasoconstritores mais potentes (23, 25, 53), o que pode contribuir para o aumento da contratilidade arterial observada na HAS. A MMP-2 também contribui para a proteólise do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (24) e do domínio extracelular do receptor β_2 adrenérgico em artérias de ratos hipertensos, o que resulta na diminuição da

função vasodilatadora e no aumento do tônus arterial na HAS (54). A MMP-2 provoca disfunção endotelial também por clivar a proteína de choque térmico (HSP90), um co-fator da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), o que provoca prejuízo à vasodilatação arterial, causando HAS em modelo animal de resistência à insulina (55).

MMP-2 foi recentemente descrita como uma protease intracelular que é capaz de clivar importantes proteínas da maquinaria contrátil de cardiomiócitos e de CMLVs (20, 26, 32, 56). A calponina-1, uma proteína de 34 kDa, pode ser considerada como um marcador de diferenciação de CMLVs. Essa proteína está expressa quando as CMLVs estão em seu estado diferenciado e, durante o processo de proliferação celular *in vitro*, há diminuição de calponina-1 assim como de outros marcadores de diferenciação celular (31). Além disso, a calponina-1 ainda regula a contração da musculatura lisa por inibir a ligação entre actina e miosina (28). Essa proteína é também um alvo de MMP-2 em aortas durante da fase aguda da HAS (32) e na endotoxemia (26). Sua diminuição contribui para a mudança de fenótipo das CMLVs de contrátil para sintético, o que contribui para a migração e proliferação celular (33, 34, 52).

Neste estudo foi mostrado que a calponina-1 está diminuída nas aortas de ratos hipertensos e que o tratamento com doxiciclina reverteu esse parâmetro, um efeito que possivelmente contribuiu para o aumento da proliferação de CMLVs e para o remodelamento hipertrófico na fase aguda da HAS. Este mecanismo pode estar relacionado à proteólise de calponina-1 pela MMP-2, já que um estudo prévio do nosso laboratório mostrou que neste tempo de HAS não há redução do RNA mensageiro para calponina-1 e nem de miocardina, seu fator de transcrição (32). A calponina-1 é uma proteína

inibidora da atividade da Mg-ATPase da “cabeça” da miosina, o que a torna uma importante reguladora da contração vascular (28). Sua ausência pode contribuir para o aumento da potência de contração à fenilefrina em aortas de ratos hipertensos e o tratamento com doxíciclina reverteu este efeito.

Por outro lado, os níveis de calponina-1 estavam aumentados nas artérias mesentéricas de ratos 2R-1C na primeira semana de HAS e o tratamento com doxíciclina parece reverter este cenário. Este aumento de calponina-1 pode ocorrer para compensar o aumento da resistência vascular periférica observada na HAS, já que a calponina-1 inibe a ligação entre actina e miosina. Este resultado é somado à ausência de remodelamento vascular observado nessa fase da HAS em artérias de resistência.

A calponina-1 também pode ser fosforilada quando as artérias são estimuladas com fenilefrina, agindo como um conector das vias de sinalização da PKC e da ERK 1/2 para promover contração vascular (57, 58). Portanto, é provável que o aumento da calponina-1 nas artérias de resistência pode torná-la mais suscetível a fosforilação e então contribuir para o aumento da contratilidade vascular na HAS. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para investigar este objetivo.

Os resultados mostraram que a MMP-2 tem ações diferentes na regulação de calponina-1 nos dois leitos arteriais. Nas artérias de condutância, a redução de calponina-1 pela MMP-2 pode ser o gatilho para a mudança de fenótipo das CMLVs, o que conduz ao remodelamento hipertrófico. Já nas artérias de resistência, a MMP-2 pode contribuir para a função contrátil do leito arterial aumentando os níveis de calponina-1. Este efeito pode ser particularmente relacionado com os mecanismos extracelulares de MMP-2.

Para tentar explicar este efeito, supõe-se que o aumento da ativação extracelular de TGF- β por MMP-2 pode estar envolvido no aumento da expressão de calponina-1 em artérias de resistência de animais hipertensos (59, 60) via sinalização Rho-A GTPase e miocardina. O TGF- β é uma proteína reguladora de divisão, diferenciação, migração celular e promove a produção de matriz extracelular, entre outras funções. Ele é sintetizado como uma proteína inativa, chamada de TGF- β latente, que possui um peptídeo de latência associado (LAP). O LAP se associa com a proteína de ligação ao TGF- β latente (LTBP) e este complexo permanece ancorado à matriz extracelular, sendo ativado por proteases, como as MMPs. Uma vez ativado, o TGF- β se liga ao seu receptor nas CMLVs e estimula a produção de componentes da matriz extracelular e de MMPs, formando um ciclo de auto-regulação (59). Logo, sua ativação pela MMP-2 pode contribuir para a regulação de componentes da maquinaria contrátil como a calponina-1 e isto ajuda na manutenção do tônus vasocontrátil de artérias de resistência.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

O aumento da atividade de MMP-2 contribuiu para a regulação de calponina-1 de formas diferentes em artérias de resistência e de condutância e isto levou às alterações morfofuncionais observadas nos sete dias de hipertensão renovascular 2R-1C.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. Causes of death 2008: data sources and methods In: Informatics DoHSA, editor. Geneva: World Health Organization 2011.
2. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2224-60.
3. Cipullo JP, Martin JF, Ciorlia LA, Godoy MR, Cacao JC, Loureiro AA, et al. [Hypertension prevalence and risk factors in a Brazilian urban population]. *Arq Bras Cardiol*. 2010;94(4):519-26.
4. Harvey A, Montezano AC, Touyz RM. Vascular biology of ageing- Implications in hypertension. *J Mol Cell Cardiol*. 2015.
5. van Varik BJ, Rennenberg RJ, Reutelingsperger CP, Kroon AA, de Leeuw PW, Schurgers LJ. Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. *Front Genet*. 2012;3:290.
6. Davis-Dusenbery BN, Wu C, Hata A. Micromanaging vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(11):2370-7.
7. Laurent S, Boutouyrie P. The structural factor of hypertension: large and small artery alterations. *Circ Res*. 2015;116(6):1007-21.
8. Martinez-Lemus LA, Hill MA, Meininger GA. The plastic nature of the vascular wall: a continuum of remodeling events contributing to control of arteriolar diameter and structure. *Physiology (Bethesda)*. 2009;24:45-57.

9. Mulvany MJ. Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this? *Cardiovasc Res.* 1999;41(1):9-13.
10. Renna NF, de Las Heras N, Miatello RM. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *Int J Hypertens.* 2013;808353.
11. Shinohara S. Regulation of Differentiated Phenotypes of Vascular Smooth Muscle Cells. *Current Basic and Pathological Approaches to the Function of Muscle Cells and Tissues – From Molecules to Humans Japan: Intech*; 2012. p. 331-44.
12. Wang G, Jacquet L, Karamariti E, Xu Q. Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Physiol.* 2015.
13. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* 2002;90(3):251-62.
14. Belo VA, Guimaraes DA, Castro MM. Matrix Metalloproteinase 2 as a Potential Mediator of Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Chronic Vascular Remodeling in Hypertension. *J Vasc Res.* 2015;52(4):221-31.
15. Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol.* 2007;26(8):587-96.
16. Chow AK, Cena J, Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol.* 2007;152(2):189-205.
17. Kandasamy AD, Chow AK, Ali MA, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc Res.* 2010;85(3):413-23.

18. Bode W, Maskos K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol Chem.* 2003;384(6):863-72.
19. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 2007;87(4):1285-342.
20. Schulz R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:211-42.
21. Castro MM, Rizzi E, Figueiredo-Lopes L, Fernandes K, Bendhack LM, Pitol DL, et al. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis.* 2008;198(2):320-31.
22. Bouvet C, Gilbert LA, Girardot D, deBlois D, Moreau P. Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition. *Hypertension.* 2005;45(3):432-7.
23. Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res.* 1999;85(10):906-11.
24. Fernandez-Patron C, Stewart KG, Zhang Y, Koivunen E, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. *Circ Res.* 2000;87(8):670-6.
25. Martinez A, Oh HR, Unsworth EJ, Bregonzio C, Saavedra JM, Stetler-Stevenson WG, et al. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin

produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. *Biochem J.* 2004;383(Pt. 3):413-8.

26. Castro MM, Cena J, Cho WJ, Walsh MP, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 proteolysis of calponin-1 contributes to vascular hypocontractility in endotoxemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(3):662-8.

27. Takahashi K, Hiwada K, Kokubu T. Vascular smooth muscle calponin. A novel troponin T-like protein. *Hypertension.* 1988;11(6 Pt 2):620-6.

28. Winder SJ, Walsh MP. Smooth muscle calponin. Inhibition of actomyosin MgATPase and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem.* 1990 15;265(17):10148-55.

29. Menice CB, Hulvershorn J, Adam LP, Wang CA, Morgan KG. Calponin and mitogen-activated protein kinase signaling in differentiated vascular smooth muscle. *J Biol Chem.* 1997;272(40):25157-61.

30. North AJ, Gimona M, Cross RA, Small JV. Calponin is localised in both the contractile apparatus and the cytoskeleton of smooth muscle cells. *J Cell Sci.* 1994;107 (Pt 3):437-44.

31. Gimona M, Herzog M, Vandekerckhove J, Small JV. Smooth muscle specific expression of calponin. *FEBS Lett.* 1990;274(1-2):159-62.

32. Belo VA, Parente JM, Tanus-Santos JE, Castro MM. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 decreases calponin-1 levels and contributes to arterial remodeling in early hypertension. *Biochem Pharmacol.* 2016;118:50-8.

33. Hu JJ, Ambrus A, Fossum TW, Miller MW, Humphrey JD, Wilson E. Time courses of growth and remodeling of porcine aortic media during hypertension:

a quantitative immunohistochemical examination. *J Histochem Cytochem.* 2008;56(4):359-70.

34. Pfisterer L, Feldner A, Hecker M, Korff T. Hypertension impairs myocardin function: a novel mechanism facilitating arterial remodelling. *Cardiovasc Res.* 2012;96(1):120-9.

35. Goldblatt H. Experimental renal hypertension; mechanism of production and maintenance. *Circulation.* 1958;17(4, Part 2):642-7.

36. Zaia DAMZ, C.T.V.B; Lichtig, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes *Química Nova.* 1998;21(6):787-93.

37. Souza-Tarla CD, Uzuelli JA, Machado AA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Clin Biochem.* 2005;38(5):410-4.

38. Castro MM, Rizzi E, Prado CM, Rossi MA, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling. *Matrix Biol.* 2010;29(3):194-201.

39. Zhang J, Hamlyn JM, Karashima E, Raina H, Mauban JR, Izuka M, et al. Low-dose ouabain constricts small arteries from ouabain-hypertensive rats: implications for sustained elevation of vascular resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297(3):H1140-50.

40. Briones AM, Xavier FE, Arribas SM, Gonzalez MC, Rossoni LV, Alonso MJ, et al. Alterations in structure and mechanics of resistance arteries from

ouabain-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(1):H193-201.

41. Guimaraes DA, Rizzi E, Ceron CS, Pinheiro LC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Atorvastatin and sildenafil lower blood pressure and improve endothelial dysfunction, but only atorvastatin increases vascular stores of nitric oxide in hypertension. *Redox Biol*. 2013;1:578-85.

42. Lemarie CA, Tharaux PL, Lehoux S. Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48(3):433-9.

43. Kopaliani I, Martin M, Zatschler B, Bortlik K, Muller B, Deussen A. Cell-specific and endothelium-dependent regulations of matrix metalloproteinase-2 in rat aorta. *Basic Res Cardiol*. 2014;109(4):419.

44. Castro MM, Rizzi E, Rodrigues GJ, Ceron CS, Bendhack LM, Gerlach RF, et al. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. *Free Radic Biol Med*. 2009;46(9):1298-307.

45. Viappiani S, Nicolescu AC, Holt A, Sawicki G, Crawford BD, Leon H, et al. Activation and modulation of 72kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione. *Biochem Pharmacol*. 2009;77(5):826-34.

46. Intengan HD, Schiffrin EL. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*. 2000;36(3):312-8.

47. Martinez-Lemus LA, Zhao G, Galinanes EL, Boone M. Inward remodeling of resistance arteries requires reactive oxygen species-dependent activation of matrix metalloproteinases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300(6):H2005-15.

48. Pires PW, Rogers CT, McClain JL, Garver HS, Fink GD, Dorrance AM. Doxycycline, a matrix metalloprotease inhibitor, reduces vascular remodeling and damage after cerebral ischemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(1):H87-97.
49. Castorena-Gonzalez JA, Staiculescu MC, Foote C, Martinez-Lemus LA. Mechanisms of the inward remodeling process in resistance vessels: is the actin cytoskeleton involved? *Microcirculation*. 2014;21(3):219-29.
50. Bakker EN, Buus CL, VanBavel E, Mulvany MJ. Activation of resistance arteries with endothelin-1: from vasoconstriction to functional adaptation and remodeling. *J Vasc Res*. 2004;41(2):174-82.
51. Guimaraes DA, Rizzi E, Ceron CS, Oliveira AM, Oliveira DM, Castro MM, et al. Doxycycline dose-dependently inhibits MMP-2-mediated vascular changes in 2K1C hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011;108(5):318-25.
52. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*. 2004;84(3):767-801.
53. Abdalvand A, Morton JS, Bourque SL, Quon AL, Davidge ST. Matrix metalloproteinase enhances big-endothelin-1 constriction in mesenteric vessels of pregnant rats with reduced uterine blood flow. *Hypertension*. 2013;61(2):488-93.
54. Rodrigues SF, Tran ED, Fortes ZB, Schmid-Schonbein GW. Matrix metalloproteinases cleave the beta2-adrenergic receptor in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(1):H25-35.
55. Nagareddy PR, Rajput PS, Vasudevan H, McClure B, Kumar U, Macleod KM, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-2 improves endothelial function

and prevents hypertension in insulin-resistant rats. *Br J Pharmacol*. 2012;165(3):705-15.

56. Ali MA, Cho WJ, Hudson B, Kassiri Z, Granzier H, Schulz R. Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2010;122(20):2039-47.

57. Kim HR, Appel S, Vetterkind S, Gangopadhyay SS, Morgan KG. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. *J Cell Mol Med*. 2008;12(6A):2165-80.

58. Je HD, Gangopadhyay SS, Ashworth TD, Morgan KG. Calponin is required for agonist-induced signal transduction--evidence from an antisense approach in ferret smooth muscle. *J Physiol*. 2001;537(Pt 2):567-77.

59. Ruiz-Ortega M, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res*. 2007;74(2):196-206.

60. Wang M, Zhao D, Spinetti G, Zhang J, Jiang LQ, Pintus G, et al. Matrix metalloproteinase 2 activation of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta1-type II receptor signaling within the aged arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(7):1503-9.

Apêndice

**Manuscrito submetido à revista Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology
(BCPT-2017-29 - (6395))**

**Matrix metalloproteinase (MMP)-2 diverges in the regulation of
calponin-1 in conductance and resistance arteries in
hypertension-induced early vascular dysfunction and remodeling**

Juliana M Parente^a, Camila A Pereira^a, Gustavo H Oliveira-Paula^a, José
Eduardo Tanus-Santos^a, Rita C Tostes^a and Michele M Castro^{a*}

^a Department of Pharmacology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao
Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

**Running title: MMP-2 diverges in regulate hypertension-induced early vascular
dysfunction and remodeling.**

Address for correspondence:

* Profa. Dra. Michele Mazzaron de Castro

Department of Pharmacology, Ribeirao Preto Medical School

University of Sao Paulo

Av. Bandeirantes, 3900

14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

Phone: +55 16 33153038

FAX: +55 16 33150220

E-mail: castro@fmrp.usp.br

Abstract

Matrix metalloproteinase (MMP)-2 participates in hypertension-induced maladaptive vascular remodeling by degrading many extra and intracellular proteins. The consequent extracellular matrix rearrangement and phenotype switch of vascular smooth muscle cells (VSMC) lead to increased cellular migration and proliferation. Calponin-1 degradation by MMP-2 leads to VSMC proliferation during hypertension, indicating that increased MMP-2 activity may contribute to hypertension-induced dysfunction and maladaptive remodeling in conductance and resistance arteries via regulation of calponin-1. Male two-kidney one-clip (2K-1C) hypertensive rats and corresponding controls were treated with doxycycline (30 mg/kg/day) or water until reaching one week of hypertension. Systolic blood pressure (SBP) was increased in 2K-1C rats and doxycycline did not reduce it. Aortas and mesenteric arteries were analyzed. MMP-2 activity and expression were increased in both arteries and doxycycline reduced it. Significant hypertrophic remodeling and VSMC proliferation were observed in aortas, but not in mesenteric arteries of 2K-1C rats. Phenylephrine increased the contractility of mesenteric arteries from 2K-1C rats and doxycycline prevented this alteration. The potency of phenylephrine to contract aortas of 2K-1C rats was increased and doxycycline decreased it. Whereas calponin-1 expression was increased in 2K-1C mesenteric arteries, calponin-1 was reduced in aortas. Doxycycline treatment reverted changes in calponin-1 expression. MMP-2 contributes to hypertrophic remodeling in aortas by decreasing calponin-1 levels, which may result in VSMC proliferation. On the other hand, MMP-2-dependent increased calponin-1 in mesenteric arteries may contribute to vascular hypercontractility in 2K-1C rats. Divergent regulation of calponin-1 by MMP-2 may be an important mechanism that leads to maladaptive vascular effects in hypertension.

Introduction and Background

Arterial hypertension is one of the leading causes of stroke, heart failure and renal damage as it contributes to long-lasting alterations in the vascular function. Maladaptive vascular remodeling is characterized as either a rearrangement or hypertrophy/hyperplasia of the vascular smooth muscle cells (VSMC) in the arterial media to compensate for hypertension-induced increased wall stress [1, 2]. Hypertrophic remodeling normally occurs in the large arteries and is represented by increased arterial cross sectional area (CSA) and media-to-lumen (M/L) ratio, which is accompanied by VSMC hypertrophy or hyperplasia and re-synthesis of extracellular matrix [3, 4]. Hypertension also leads to inward eutrophic remodeling in resistance arteries, which corresponds to a reduced passive luminal diameter and increased M/L, without any change in CSA [4-6]. VSMC are crucial for both hypertrophic and eutrophic remodeling as they have the ability to migrate and proliferate. Hypertension also leads to increased peripheral vascular resistance and vasoconstriction, which may be intrinsically related to the manifestation of vascular remodeling [5]. It is well known that the maladaptive vascular changes accompany hypertension and its cardiovascular complications, however whether these changes are mediated by early VSMC proliferation and hypercontractility both in conductance and resistance arteries needs to be further investigated.

The zinc-dependent family of proteases, the matrix metalloproteinases (MMPs), are crucial for vascular remodeling due to extra- and intracellular proteolytic effects on VSMC [2]. Studies have suggested that increased MMP-2 activity contributes to hypertension-induced hypertrophic and eutrophic remodeling. Accordingly, MMP inhibitors reduce M/L ratio and deposition of extracellular matrix in large and resistance arteries [3, 4, 7-9]. MMP-2 may contribute to increased vascular tone in hypertension by inducing proteolysis of the extracellular portion of β_2 adrenergic receptor, thus decreasing its vasodilatory signaling [10], and by proteolytic cleavage of many vasoactive peptides, thus forming potent vasoconstrictors [11-13]. MMP-2 also contributes to VSMC migration by disrupting cell-matrix interaction [2, 14], which then switches cell phenotype from contractile to synthetic, thus downregulating many contractile proteins [15]. Calponin-1, a protein specially located in the contractile machinery of the

differentiated VSMC, regulates contraction by binding to filamentous actin [15, 16]. Calponin-1 also inhibits the actomyosin ATPase activity to regulate vascular contractility [17]. Activation of MMP-2, which is also an intracellular protease, contributes to calponin-1 proteolysis in aortas of endotoxemic and hypertensive rats [18, 19]. In hypertension, decreased calponin-1 is associated with increased proliferation of VSMC, which contributes to hypertension-induced aortic hypertrophic remodeling [19, 20]. On the other hand, the resistance arteries seem to be continually constricted in hypertension as a consequence of a decreased lumen size and VSMC migration [5]. However, whether MMP-2 regulates calponin-1 and contributes to early hypertension-induced constriction and remodeling in resistance arteries has not been investigated yet. We hypothesized that increased MMP-2 activity contributes to early hypertension-induced dysfunction and maladaptive remodeling in conductance and resistance arteries by regulating calponin-1.

Materials and Methods

Ethics statement and animals

All experimental protocols used in this study were in accordance with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (NIH) and were approved by the Ethics Committee on Animal Research of Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo (protocol n° 012/2015-1). Male Wistar rats (180-200g) were acquired from the colony of University of Sao Paulo and were maintained at 25°C with free access to chow and water on 12 hours light/dark cycle.

Two kidney-one clip (2K-1C) hypertension

Rats were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine 100 mg/kg and xylazine 10 mg/kg. Two kidney-one clip (2K-1C) hypertension was induced by inserting a silver clip with 0.2 mm internal gap in the rat left renal artery. Sham rats were also subjected to the same surgical procedure except for the clip. Systolic blood pressure (SBP) was daily accessed by tail-cuff

plethysmography. Rats were considered hypertensive when SBP had increased up to 25 mmHg three days after surgery compared to baseline. Rats were treated with the broad MMP inhibitor, doxycycline at 30 mg/kg/day, or vehicle (water) by gavage [3, 4, 21]. Treatment started at the third day after surgery and was maintained for one week [19]. Rats were randomly allocated into four experimental groups: Sham and 2K-1C that received vehicle, and Sham + Doxy and 2K-1C + Doxy that received doxycycline. Body weight was daily measured during the experimental period.

MMP-2 activity - gelatin and in situ zymography followed by immunofluorescence

MMP-2 activity was first analyzed in aortas and second branches of mesenteric arteries by *in situ* zymography followed by immunofluorescence. Both arteries were included in Tissue-Tek®, frozen and cryosectioned at 5 µm. Tissue sections were incubated with dye-quenched (DQ) Gelatin at 1 mg/mL (#E12055, Molecular Probes, USA), 1:10 dilution in 50 mM Tris-HCl buffer (10 mM CaCl₂, pH 7.4), for 1 hour at 37°C in dark humidified chambers. Sections were then washed with 0.1 M sodium phosphate buffer (PBS, pH 7.2- 7.4) and incubated with mouse monoclonal MMP-2 antibody for 1 hour at room temperature (1:200 dilution, Millipore #MAB3308, USA). Slices were then incubated with mouse rhodamine conjugated secondary antibody for 1 hour (1:200, Millipore #AP181R, USA). Sections were rinsed again with 0.1 M PBS and then fixed with 4% v/v paraformaldehyde. Images were analyzed by using a fluorescence microscopy (Carl Zeiss Microscopy Ltd., Cambridge, England) and captured at 400 x for aortas and 200 x for mesenteric arteries. The quantification of green and red intensities was determined in 40 fields selected around the arterial media of aortas and 80 fields of mesenteric arteries by ImageJ, and the arithmetic mean was calculated for each sample, as previously described [19, 22]. Arteries of sham rats incubated only with primary or secondary antibodies were used as negative controls.

The gelatin zymography method was used in mesenteric beds to complement *in situ* zymography protocols performed in second branches of mesenteric arteries. Most of the

arteries were dissected to reduce fat proportion and then were crushed at liquid nitrogen and lysed using 200 μ l of cold RIPA-buffer (#R0278, Sigma-Aldrich, USA) that contained a cocktail of protease inhibitors (#S8820, Sigma-Aldrich, USA, 1x), 1 mM sodium orthovanadate (#S6508, Sigma-Aldrich, USA) and 10 mM sodium fluoride (#201154, Sigma-Aldrich, USA). Tissue homogenates were centrifuged at 13.000 rpm for 10 minutes at 4°C and then supernatants were collected for analysis. Protein concentration was analyzed by using Bradford (#B6916, Sigma-Aldrich, USA) and then the samples were heated for 15 minutes at 37°C and loaded onto 12% polyacrylamide gels under non-reducing conditions (30 μ g protein/sample). After electrophoresis, gels were incubated with 2% v/v Triton X-100 buffer two times for 30 minutes each at room temperature and then incubated with 50 mM Tris-HCl buffer (10 mM CaCl_2 pH 7.4), overnight at 37°C. Gels were colored with 0.05 % Coomassie Blue. The 75, 72 and 64 kDa MMP-2 bands were visualized by using Amersham Imager 600 (GE Healthcare, USA) and quantified by ImageJ software.

Measurement of calponin-1 by immunofluorescence

Cryosectioned aortas and second branches of mesenteric arteries were fixed in cold acetone for 5 minutes. Arterial sections were washed with 0.1 M PBS followed by two washes with 0.3% v/v Triton-X 100 in PBS (pH 7.2 - 7.4). Sections were then blocked with 10% v/v normal donkey serum (#S-30, Millipore, USA) for 1 hour. The arterial samples were incubated with rabbit monoclonal calponin-1 (C-terminus) antibody (1:250 dilution, #ab46794, Abcam) for 1 hour in dark humidified chambers. Secondary antibody conjugated to donkey anti-rabbit Alexa 488® (1:200 dilution for aortas and 1:1000 dilution for mesenteric arteries, #A21206, Invitrogen, USA) was used for 1 hour incubation at room temperature in a dark humidified chamber. After that, sections were washed with 0.1 M PBS followed by two washes with 0.3% Triton X-100 in 0.1 M PBS. The images were analyzed with fluorescent microscopy (Carl Zeiss Microscopy Ltd., Cambridge, England) and captured at 400 x for aortas and 200 x for the mesenteric arteries. Calponin-1 levels were obtained by quantifying the green fluorescence in the arterial media

using ImageJ. Arteries of sham groups incubated with only primary or secondary antibodies were used as negative controls.

Immunohistochemistry of Ki67 for VSMC proliferation

Aortas were carefully removed and fixed in 10% v/v phosphate-buffered paraformaldehyde (pH 7.0) for 24 hours, followed by further 24 hours in 70% v/v ethanol. Tissues were then rinsed in a sequence of ethanol (80%, 95% and 100%), xylene and embedded in paraffin. For mesenteric arteries, the second branches were collected with fat and washed two times for ten minutes each in calcium-free physiological salt solution (mM): (PSS, NaCl 112; NaHCO₃ 25.7; KCl 4.9; MgSO₄·7H₂O 1.2; KH₂PO₄ 1.2; glucose 11.5; HEPES 10 and EGTA 0.5) and then washed one time for ten minutes with calcium-free PSS plus 10 µM sodium nitroprusside [23]. Mesenteric arteries were then fixed for 48 hours in 10% v/v phosphate-buffered paraformaldehyde (pH 7.0) followed by 24 hours in 70% v/v ethanol, and embedded in paraffin. Tissue sections were cut at 5 µm and placed on glass slides for immunohistochemistry, as previously described [19]. Briefly, sections were incubated for 1 hour with the anti-Ki67 antibody (1:50 dilution, Abcam) and for 2 hours with biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (Millipore #20782). Ki67 antigen was visualized with a labeled-streptavidin peroxidase technique with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrate (Millipore #DAB150). Sections were counterstained with hematoxylin, examined using light microscopy (Carl Zeiss Microscopy Ltd., Cambridge, England) and captured at 200 x. Five regions of aorta and the entire mesenteric artery were chosen and used to count the percentage of Ki67 among total nucleus by ImageJ. The arithmetic mean of five areas was calculated and expressed as the ratio of Ki67-nucleus/total nucleus x 100 [20]. Tissue sections of adrenal gland were used as positive controls (data not shown).

Morphometric analysis - Hematoxylin and Eosin (H&E), Masson's Trichrome and pressurized myograph

Thoracic aortas were embedded in paraffin, cut at 5 μm and then stained with H&E. The morphometric parameters CSA and M/L ratio were analyzed and measured using Image J as previously described [3]. These parameters show whether the aorta underwent to hypertrophic remodeling. The CSA was calculated by subtracting the internal lumen area from the external area, while M/L ratio was calculated as media (M) per internal diameter (ID), where M is represented by external diameter (ED)-ID/2. ED and ID are represented as the square root of $4 \times \text{external area}/\pi$ and the square root of $4 \times \text{internal area}/\pi$, respectively. We also analyzed the structural alterations, CSA and M/L ratio, of the second branches of mesenteric arteries by staining them with Masson's Trichrome [24, 25] and a pressurized myograph (Danish Myo Tech, 110P and 111P models, Aarhus, Denmark). Second branches of mesenteric arteries (3-4 mm length) were cannulated between two glass micropipettes (100 μm diameter) and attached by using a nylon wire. Length was adjusted until arterial walls were paralleled without any stretch. At this moment, intraluminal pressure was increased to 140 mmHg to adjust experimental conditions. The pressure was then reduced to 70 mmHg without intraluminal flux and the arteries were stabilized for 30 minutes. The arteries were maintained during all protocol in a calcium-free physiological Krebs solution (mM): (NaCl 118; KCl 4.7; KH_2PO_4 1.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.64; NaHCO_3 24.9; glucose 11.1; EGTA 10) with 95% O_2 and 5% CO_2 . After stabilization, intraluminal pressure was reduced to 3 mmHg and a pressure-diameter curve was obtained increasing pressure from 3 to 140 mmHg (as follow: 3, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120 and 140mmHg). Pressure in each point was maintained for 3 minutes to measure ID and ED by the software MyoVIEW II (Danish Myo Tech). ID and ED values were used to calculate structural and mechanical properties of mesenteric arteries under passive conditions. M/L, CSA, circumferential wall stress and arterial stiffness were measured as previous described [24].

Vascular reactivity

Thoracic aortas were carefully excised, cleaned of adherent connective tissues and fat and cut into 4 mm long rings. Aortic rings were mounted for isometric tension recording and placed in

organ bath chambers (5 ml) containing modified Krebs salt solution with the following composition (mM): NaCl 130, CaCl₂ 1.6, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, KCl 4.7, NaHCO₃ 14.9, glucose 5.5. The solution was maintained at 37°C and pH 7.4 and was continuously aerated with 95% O₂ and 5% CO₂. The system was connected to an isometric force transducer (Letica Scientific Instruments, Barcelona, Spain) to measure changes in isometric tone, which were recorded on a computer system using the LabChart version 4.04, PowerLab ADInstruments (2000) program. The rings were stretched to a basal tension of 1.5 g during a 60-minute equilibration period, with the bath fluid being changed every 15-20 minutes. Endothelial integrity was evaluated by the degree of relaxation elicited by acetylcholine (10⁻⁶ M) in arteries contracted with phenylephrine (10⁻⁷ M). Cumulative concentration-response curves to phenylephrine (from 10⁻¹⁰ to 10⁻⁵ M) were performed in endothelium-intact aortic rings.

For the mesenteric arteries, third-branch segments (about 2 mm in length) were mounted in a small vessel myograph (Danish Myo Tech, Model 620M, A/S, Århus, Denmark). Arteries were maintained in a modified Krebs Henseleit solution (in mM): NaCl 130, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.18, MgSO₄ 1.17, NaHCO₃ 14.9, Glucose 5.5, EDTA 0.03, CaCl₂ 1.6, at a constant temperature of 37°C, pH 7.4, and gassed with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂. Mesenteric resistance arteries were set to reach a tension of 13.3 kPa (kilopascal) and remained at rest for 30 minutes for stabilization. The arteries were stimulated with Krebs solution containing a high concentration of potassium [K⁺ (120 mM)] to evaluate the contractile capacity of the segments. After washing and return to the basal tension, arteries were pre-contracted with phenylephrine (3x10⁻⁶ M) and then stimulated with acetylcholine (10⁻⁵ M) to determine the presence of a functional endothelium. Arteries exhibiting a vasodilator response to acetylcholine greater than 80% were considered endothelium-intact vessels. After washing and another period of stabilization, concentration-response curves to phenylephrine were performed. Mesenteric resistance arteries were stimulated with phenylephrine (10⁻¹⁰ to 3x10⁻⁵ M) to produce contractions, measured as increases in baseline tension. The potency of agonists was expressed as pD₂ values and the maximum effect as E_{max}.

Statistical analyses

The results were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test by using GraphPad Prism Software, Version 5.0 (California, USA). $p < 0.05$ values were considered statistically significant. The graphics were represented with mean values $\pm$ SEM. Concentration-response curves and pD_2 and E_{max} values were analyzed by non-linear regression followed by two-way ANOVA by also using GraphPad Prism Software, Version 5.0 (California, USA).

Results

Early hypertension increases MMP-2 activity in aorta and mesenteric artery

To verify whether conductance and resistance arteries rapidly respond to stretch alteration caused by hypertension, which may alter vascular function and structure, 2K-1C rats were studied at one-week of hypertension. At this time, SBP was significantly increased in 2K-1C rats, which also presented decreased body weight when compared to Sham ($p < 0.05$; Fig. 1A-C). Treatment of 2K-1C rats with doxycycline did not reduce SBP (which was measured every day up to one-week post-surgery) and neither ameliorated the loss of body weight ($p > 0.05$, Fig. 1A-C).

MMP-2 activity was then analyzed in aortas and mesenteric arteries as a potential mechanism to contribute to hypertension-induced early vascular dysfunction and remodeling, as it significantly induces proteolysis of many extra- and intracellular proteins in VSMC [2]. Increased activity of MMP-2 was significantly observed in the media layer of aortas of 2K-1C rats ($p < 0.05$ vs. Sham and Sham + Doxy), an effect that was reversed by treatment of hypertensive rats with doxycycline ($p < 0.05$, Fig. 2A). Furthermore, doxycycline also reduced increased MMP-2 activity in mesenteric arteries second branches and mesenteric bed of 2K-1C rats (Fig. 2B and 2C).

Increased MMP-2 activity contributes to early hypertension-induced vascular changes

Increased MMP-2 activity in aortas contributed to early hypertension-induced vascular dysfunction and remodeling. Figure 3A shows increased VSMC proliferation in the aortic media of 2K-1C rats as represented by the increased number of Ki67 marker ($p < 0.05$ vs. Sham and Sham + Doxy; Fig. 3A). This proliferative effect was completely prevented when hypertensive rats were treated with doxycycline ($p < 0.05$; Fig. 3A). Furthermore, to verify whether VSMC proliferation contributes to hypertrophic remodeling in aortas of 2K-1C rats, we further analyzed their structural morphology by CSA and M/L ratio. At one-week of hypertension, 2K-1C rats showed an increase of both CSA and M/L ratio ($p < 0.05$ vs. Sham and Sham + Doxy; Figure 4A). Treatment with doxycycline did not reduce these parameters at this time ($p > 0.05$, Figure 4A). However, eight-weeks treatment with doxycycline did decrease the hypertrophic remodeling in aortas of 2K-1C rats [3]. On the other hand, it seems that hypertension-induced eutrophic or hypertrophic remodeling in resistance arteries did not occur at one-week of hypertension as no changes in CSA or M/L ratio (Figure 4B and Table 1) or VSMC proliferation in the second branches of mesenteric arteries ($p > 0.05$, Fig. 3B) were observed. Furthermore, the mechanical properties of the media of mesenteric arteries, such as distensibility, were not altered in the hypertensive rats (Table 1).

A significant increase in phenylephrine potency was observed in aortas of 2K-1C rats ($p < 0.05$ vs. Sham and Sham + Doxy, Table 2), although no differences were seen in the Emax values. Treatment with doxycycline abolished this potentiated effect of phenylephrine in 2K-1C aortas ($p < 0.05$; Table 2). Furthermore, although we did not observe any remodeling in the mesenteric arteries of 2K-1C at this time, they were more responsive to phenylephrine when compared to Sham arteries, and treatment with doxycycline significantly abolished this increased vascular reactivity in the hypertensive rats ($p < 0.05$; Table 2).

MMP-2 diverges in the regulation of calponin-1 in aortas and mesenteric artery of 2K-1C hypertensive rats

Calponin-1 is a potential target of MMP-2 in the vasculature during the early phases of hypertension [19] and endotoxemia [18]. As calponin-1 is an important marker of VSMC differentiation and also regulates smooth muscle contraction by inhibiting the actin-myosin cross-bridge cycling, we analyzed it as a potential mechanism used by MMP-2 to promote vascular dysfunction and remodeling in early hypertension. Examination of aortas from 2K-1C rats by immunofluorescence showed a significant reduction in the 34 kDa calponin-1 in the media ($p<0.05$ vs. Sham and Sham + Doxy, Fig. 5A), which was completely restored by treating the hypertensive rats with doxycycline ($p<0.05$; Fig. 5A). Interestingly, the opposite scenario was observed in second branches of mesenteric arteries from 2K-1C, in which calponin-1 was significantly upregulated when compared to Sham ($p<0.05$, Fig. 5B). Treatment with doxycycline decreased its levels in mesenteric arteries of hypertensive rats. These results suggest that MMP-2 may decrease calponin-1 in the conductance arteries of hypertensive rats to lead to hypertrophic remodeling and dysfunction whereas MMP-2 intriguingly upregulates calponin-1 in resistance arteries, which is not involved in vascular remodeling at this point. The potential mechanism involved in MMP-2-induced calponin-1 upregulation in the mesenteric arteries may be extracellular and needs further investigation.

Discussion

This study shows for the first time that MMP-2 activity is increased in both conductance and resistance arteries in hypertension and contributes to early vascular dysfunction and remodeling. These maladaptive effects were related to the divergent regulation of calponin-1 by MMP-2, which then decreased calponin-1 in aortas while increased it in the resistance arteries. Although treatment with doxycycline did not attenuate the increases in SBP, it reversed MMP-2-induced contraction in resistance arteries and VSMC proliferation in aortas, thus suggesting that MMP-2 activity may precede hypertension-induced severe vascular changes. Early inhibition of MMP-2 may be essential to control hypertension and its chronic vascular alterations that lead to other cardiovascular diseases.

MMP-2 is a critical protease that regulates pathophysiological vascular remodeling in chronic hypertension [1-4]. Its increased activity contributes to the proteolysis of many extracellular matrix components, which then normally results in VSMC migration and arterial media hypertrophy. In the hypertrophic remodeling, VSMC migration and proliferation normally contribute to hypertension-induced increased media thickness and CSA, which then culminate with collagen deposition and rigidity [1-4]. Different from hypertrophic remodeling, the migration of VSMC in eutrophic remodeling allows cells to rearrange and overlap themselves around the vessel lumen, which impair the capacity of resistance arteries to naturally dilate [5, 6]. In fact, MMP-2 activity was significantly increased in the conductance and resistance arteries in different time courses and models of hypertension and normally contributed to the resulting chronic vascular remodeling [3, 4, 7, 8]. Furthermore, increased MMP-2 activity was also observed after only few hours of incubation of rat arterioles with noradrenaline and angiotensin II *in vitro*, an effect that resulted in the inward eutrophic remodeling [7]. However, the exact mechanisms used by MMP-2 to contribute to hypertension-induced changes in the vasculature need to be further explored. We showed here for the first time that increased MMP-2 activity in the resistance arteries in the early phase of renovascular hypertension contributed to the accentuated vasoconstriction instead of the remodeling, since we did not observe any changes neither in the structure nor in the mechanical properties of the second branches of mesenteric arteries. On the other hand, the maximum response to phenylephrine was significantly increased in mesenteric arteries of 2K-1C rats. As long-lasting vasoconstriction by some agonists may help to develop the inward eutrophic remodeling [26, 27], it may be assumed that MMP-2 contributes to increase vascular resistance and that precedes eutrophic remodeling in renovascular hypertension. A previous study also showed that the eutrophic remodeling in the mesenteric arteries of L-NAME hypertensive rats started to emerge only after two weeks of hypertension, and it was associated with increased MMP-2 activity [4]. However, further studies need to be performed to clarify whether increased vasoconstriction would precede the remodeling in 2K-1C hypertensive rats via increasing MMP-2 activity as we analyzed here only at the first week of hypertension.

Although we did not observe eutrophic remodeling in resistance arteries in the first week of hypertension, the scenario was completely opposite for the conductance arteries. Increased MMP-2 activity leads to VSMC proliferation and medial hypertrophy at the first week of hypertension and treatment with doxycycline reduced only proliferation at this time. Doxycycline may also reduce hypertension-induced medial hypertrophy in aortas when chronically used, as it reversed the hypertrophic remodeling at the late phase of hypertension [3, 21, 22]. Furthermore, we previously showed that increased MMP-2 activity in aortas of 2K-1C rats contributed to VSMC proliferation even before hypertension-induced medial hypertrophy [19]. It is well known that MMP-2 induces VSMC migration and proliferation in hypertension [1, 27] and VSMC change their phenotype from contractile to synthetic to contribute to the increased arterial wall [15]. Moreover, the potency of phenylephrine to induce contraction in aortas of 2K-1C rats was significantly increased and doxycycline completely abolished it, which suggests that MMP-2 directly contributes to hypertension-induced aortic hypercontractility in addition to the hypertrophic remodeling. Indeed, MMP-2 may regulate vascular tone by degrading big-endothelin-1 and adrenomedullin in more potent vasoconstrictors peptides [11, 12, 28], which may contribute to hypertension-induced increased arterial contractility. Furthermore, MMP-2 also contributes to the proteolysis of calcitonin gene-related peptide [13] and the extracellular domain of β_2 adrenergic receptor in hypertensive rat arteries, which results in the inactivation of their vasodilator function and then increases arteriolar tone in hypertension [10].

MMP-2 was also recently identified as an intracellular protease that cleaves many important proteins in the contractile machinery of cardiomyocytes and VSMC [18, 19, 29, 30]. The 34 kDa calponin-1 is a marker of VSMC differentiation and also regulates smooth muscle contraction by inhibiting the actin-myosin cross-bridge cycling [17]. In addition, calponin-1 is a potential target of MMP-2 in aortas during the early phases of hypertension [19] and endotoxemia [18]. Its absence generally contributes to the phenotype switch of VSMC from contractile to synthetic, thus increasing their capacity to migrate and proliferate [15, 20, 31]. Here we showed that calponin-1 was significantly decreased in aortas of 2K-1C rats and doxycycline reverted it,

an effect that potentially contributed to the increased VSMC proliferation and medial hypertrophy in early hypertension. This mechanism may be related to the proteolysis of calponin-1 by MMP-2 as we have shown before that MMP-2 only reduces the protein levels of calponin-1 in the vasculature during early hypertension and not calponin mRNA nor myocardin [19]. Others works also showed reduced levels of calponin-1 in arteries of DOCA-salt hypertensive rats [31] and hypertensive pigs [20]. Calponin-1 is also an inhibitor of actomyosin ATPase activity in the VSMC, which make it an important regulatory protein to control vascular contractility [17]. Therefore, its absence may also contribute to the increased potency of phenylephrine to induce contraction in the aortas of 2K-1C rats. We also observed that treatment with doxycycline completely restored these effects. The potential intracellular effects of MMP-2 may occur as a result of its inefficiency to be directed to the secretory pathway [32], which then facilitates its activation by S-glutathiolation [18, 33].

On the other hand, calponin-1 levels were surprisingly increased in the mesenteric arteries of 2K-1C rats at the first week of hypertension and treatment with doxycycline completely restored it. This interestingly calponin-1 rise may occur to compensate hypertension-induced increased vascular resistance since calponin-1 is an inhibitor of actomyosin ATPase activity. This result does also add up to the absence of eutrophic or hypertrophic remodeling found in the resistance arteries at this phase of hypertension. On the other hand, calponin-1 may also be phosphorylated when arteries are exposed to phenylephrine and then it acts as an adaptor protein to connect the signaling pathways of protein kinase C (PKC) and extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) to promote vascular contraction [16, 34]. Therefore, it is probable that increased calponin-1 in the resistance arteries make it more susceptible to be phosphorylated and then contributes to the increased contractility signaling of phenylephrine in hypertension. However, further studies are needed to investigate this hypothesis. Furthermore, increased extracellular activation of transforming growth factor (TGF)- β may be involved in MMP-2-induced increased expression of calponin-1 in the resistance arteries [35, 36]. Although we are suggesting MMP-2 as the potential protease to contribute to hypertension-induced

vascular dysfunction and remodeling, we used a broad inhibitor of MMP, which make us not dismiss the potential proteolytic actions of other MMPs or proteases.

In conclusion, the activity of MMP-2 similarly increases in both conductance and resistance arteries during early hypertension to contribute to its vascular dysfunction and remodeling. As for the mechanism, MMP-2 contributes to decrease calponin-1 in aortas, which stimulates VSMC proliferation and hypertrophic remodeling, while increases calponin-1 in the resistance arteries, which may regulate hypertension-induced vascular hypercontractility. These maladaptive vascular effects in hypertension were in fact related to the divergent regulation of calponin-1 by MMP-2.

Acknowledgments

Our study was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Brazil). J.M.P is a master student with a fellowship from Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq-Brazil). C.A.P. is a PhD student and G.H.O.P. is a post-doctoral fellow supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We thank Eliane Aparecida Antunes Maciel for your helping with the histology and immunohistochemistry techniques.

References

1. Lemarie CA, Tharaux PL, Lehoux S. Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48:433-9.
2. Belo VA, Guimaraes DA, Castro MM. Matrix Metalloproteinase 2 as a Potential Mediator of Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Chronic Vascular Remodeling in Hypertension. *J Vasc Res.* 2015;52:221-31.
3. Castro MM, Rizzi E, Figueiredo-Lopes L, Fernandes K, Bendhack LM, Pitol DL, et al. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular

dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis*. 2008;198:320-31.

4. Bouvet C, Gilbert LA, Girardot D, deBlois D, Moreau P. Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition. *Hypertension*. 2005;45:432-7.
5. Martinez-Lemus LA, Hill MA, Meininger GA. The plastic nature of the vascular wall: a continuum of remodeling events contributing to control of arteriolar diameter and structure. *Physiology (Bethesda)*. 2009;24:45-57.
6. Intengan HD, Schiffrin EL. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*. 2000;36:312-8.
7. Martinez-Lemus LA, Zhao G, Galinanes EL, Boone M. Inward remodeling of resistance arteries requires reactive oxygen species-dependent activation of matrix metalloproteinases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300:H2005-15.
8. Pires PW, Rogers CT, McClain JL, Garver HS, Fink GD, Dorrance AM. Doxycycline, a matrix metalloprotease inhibitor, reduces vascular remodeling and damage after cerebral ischemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301:H87-97.
9. DeLano FA, Schmid-Schonbein GW. Proteinase activity and receptor cleavage: mechanism for insulin resistance in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 2008;52:415-23.
10. Rodrigues SF, Tran ED, Fortes ZB, Schmid-Schonbein GW. Matrix metalloproteinases cleave the beta2-adrenergic receptor in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299:H25-35.
11. Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res*. 1999;85:906-11.

12. Martinez A, Oh HR, Unsworth EJ, Bregonzio C, Saavedra JM, Stetler-Stevenson WG, et al. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. *Biochem J.* 2004;383:413-8.
13. Fernandez-Patron C, Stewart KG, Zhang Y, Koivunen E, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. *Circ Res.* 2000;87:670-6.
14. Pauly RR, Passaniti A, Bilato C, Monticone R, Cheng L, Papadopoulos N, et al. Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation. *Circ Res.* 1994;75:41-54.
15. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004;84:767-801.
16. Kim HR, Appel S, Vetterkind S, Gangopadhyay SS, Morgan KG. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. *J Cell Mol Med.* 2008;12:2165-80.
17. Winder SJ, Walsh MP. Smooth muscle calponin. Inhibition of actomyosin MgATPase and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem.* 1990;265:10148-55.
18. Castro MM, Cena J, Cho WJ, Walsh MP, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 proteolysis of calponin-1 contributes to vascular hypocontractility in endotoxemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:662-8.
19. Belo VA, Parente JM, Tanus-Santos JE, Castro MM. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 decreases calponin-1 levels and contributes to arterial remodeling in early hypertension. *Biochem Pharmacol.* 2016;118:50-8.
20. Hu JJ, Ambrus A, Fossum TW, Miller MW, Humphrey JD, Wilson E. Time courses of growth and remodeling of porcine aortic media during hypertension: a quantitative immunohistochemical examination. *J Histochem Cytochem.* 2008;56:359-70.

21. Guimaraes DA, Rizzi E, Ceron CS, Oliveira AM, Oliveira DM, Castro MM, et al. Doxycycline dose-dependently inhibits MMP-2-mediated vascular changes in 2K1C hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011;108:318-25.
22. Castro MM, Rizzi E, Prado CM, Rossi MA, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling. *Matrix Biol.* 2010;29:194-201.
23. Zhang J, Hamlyn JM, Karashima E, Raina H, Mauban JR, Izuka M, et al. Low-dose ouabain constricts small arteries from ouabain-hypertensive rats: implications for sustained elevation of vascular resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297:H1140-50.
24. Briones AM, Rodriguez-Criado N, Hernanz R, Garcia-Redondo AB, Rodriguez-Diez RR, Alonso MJ, et al. Atorvastatin prevents angiotensin II-induced vascular remodeling and oxidative stress. *Hypertension.* 2009;54:142-9.
25. Bund SJ, Lee RM. Arterial structural changes in hypertension: a consideration of methodology, terminology and functional consequence. *J Vasc Res.* 2003;40:547-57.
26. Castorena-Gonzalez JA, Staiculescu MC, Foote C, Martinez-Lemus LA. Mechanisms of the inward remodeling process in resistance vessels: is the actin cytoskeleton involved? *Microcirculation.* 2014;21:219-29.
27. Bakker EN, Buus CL, VanBavel E, Mulvany MJ. Activation of resistance arteries with endothelin-1: from vasoconstriction to functional adaptation and remodeling. *J Vasc Res.* 2004;41:174-82.
28. Abdalvand A, Morton JS, Bourque SL, Quon AL, Davidge ST. Matrix metalloproteinase enhances big-endothelin-1 constriction in mesenteric vessels of pregnant rats with reduced uterine blood flow. *Hypertension.* 2013;61:488-93.
29. Ali MA, Cho WJ, Hudson B, Kassiri Z, Granzier H, Schulz R. Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* 2010;122:2039-47.

30. Schulz R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:211-42.
31. Pfisterer L, Feldner A, Hecker M, Korff T. Hypertension impairs myocardin function: a novel mechanism facilitating arterial remodelling. *Cardiovasc Res.* 2012;96:120-9.
32. Ali MA, Chow AK, Kandasamy AD, Fan X, West LJ, Crawford BD, et al. Mechanisms of cytosolic targeting of matrix metalloproteinase-2. *J Cell Physiol.* 2012;227:3397-404.
33. Viappiani S, Nicolescu AC, Holt A, Sawicki G, Crawford BD, Leon H, et al. Activation and modulation of 72kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione. *Biochem Pharmacol.* 2009;77:826-34.
34. Je HD, Gangopadhyay SS, Ashworth TD, Morgan KG. Calponin is required for agonist-induced signal transduction--evidence from an antisense approach in ferret smooth muscle. *J Physiol.* 2001;537:567-77.
35. Ruiz-Ortega M, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res.* 2007;74:196-206.
36. Wang M, Zhao D, Spinetti G, Zhang J, Jiang LQ, Pintus G, et al. Matrix metalloproteinase 2 activation of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta1-type II receptor signaling within the aged arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1503-9.

Figures and Legends

Figure 1 - **Effect of doxycycline on systolic blood pressure (SBP) measured by tail-cuff plethysmography.** Panel A is SBP after one week and Panel B is SBP during treatment (from day three to seven) following 2K-1C surgery. Panel C shows the body weight measured at one week of hypertension. Data are shown as mean $\pm$ SEM. (n=13/group). *p<0.05 vs. Sham and Sham+Doxy groups.

Figure 2 - **Effect of doxycycline on MMP-2 levels and activity.** Panels A and B show representative photographs and the quantified values of fluorescence of the gelatinase activity (green fluorescence) and MMP-2 levels (red fluorescence) in both aortas and mesenteric arteries of hypertensive rats (n=6-10/group). Bar is 20 μ m. Panel C shows the gelatin zymogram and the quantified values of MMP-2 in the mesenteric arteries of hypertensive rats (n=4-9/group). Data are shown as mean $\pm$ SEM. *p<0.05 vs. Sham, Sham+Doxy and 2K-1C+Doxy groups (p=0.06 between 2K-1C vs. 2K-1C+Doxy in MMP-2 immunofluorescence for mesenteric arteries), # p<0.05 vs. Sham and Sham+Doxy (p=0.05 between 2K-1C vs. 2K-1C+Doxy in gel zymography of total MMP-2 activity).

Figure 3 - **Effect of doxycycline on VSMC proliferation measured by Ki67.** Panels A and B show the representative photographs (200 x) and the quantified values of Ki67, identified as the brown stained into the nuclei in both aortas (n=5-6/group) and mesenteric arteries (n=5-10/group) of hypertensive rats, respectively. Bar is 50 μ m. Data are shown as mean $\pm$ SEM. *p<0.05 vs. Sham, Sham+Doxy and 2K-1C+Doxy groups. M=Media and L=Lumen.

Figure 4 - **Effect of doxycycline on morphological parameters.** Panels A and B show the representative photographs (25 x, bar 200 μm for aortas; 200 x, bar 50 μm for mesenteric arteries) and the quantified values of M/L ratio and CSA for aortas (n=5-7/group) and mesenteric arteries (n=2-8/group) of hypertensive rats, respectively. Data are shown as mean $\pm$ SEM. *p<0.05 vs. Sham and Sham+Doxy groups.

Table 1 - Effect of doxycycline treatment on structural and mechanical parameters of mesenteric arteries.

Mesenteric Arteries				
	Sham	Sham+Doxy	2K-1C	2K-1C+Doxy
ID (μm)	205.7 ± 11.8	205.6 ± 14.9	209.2 ± 13.2	212.0 ± 14.1
ED (μm)	284.0 ± 11.9	297.8 ± 14.4	302.9 ± 12.9	300.8 ± 11.1
M/L (%)	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.22 ± 0.02
CSA (μm ²)	$3.75 \times 10^4 \pm 2.05 \times 10^3$	$3.89 \times 10^4 \pm 1.42 \times 10^3$	$4.23 \times 10^4 \pm 2.23 \times 10^3$	$3.79 \times 10^4 \pm 0.71 \times 10^3$
Distensibility (% mmHg ⁻¹)	0.45 ± 0.11	0.57 ± 0.14	0.48 ± 0.11	0.55 ± 0.14
Stress (x10 ⁶ dynes cm ⁻²)	0.22 ± 0.06	0.24 ± 0.07	0.24 ± 0.07	0.29 ± 0.09
Strain	0.36 ± 0.08	0.51 ± 0.12	0.39 ± 0.09	0.47 ± 0.10

ID: internal diameter, ED: external diameter, M/L: media-to-lumen, CSA: cross-sectional area (n=6)

Table 2 - Effect of doxycycline treatment on phenylephrine vascular reactivity of aortas and mesenteric arteries.

Aortas				
	Sham	Sham+Doxy	2K-1C	2K-1C+Doxy
E _{max} (g)	1.86 ± 0.05	2.03 ± 0.10	2.06 ± 0.12	2.12 ± 0.11
pD ₂	7.01 ± 0.04	7.24 ± 0.09	8.41 ± 0.25 *	7.65 ± 0.17

Mesenteric Arteries				
	Sham	Sham+Doxy	2K-1C	2K-1C+Doxy
E _{max} (%KCl)	129.3 ± 2.66	136.6 ± 2.68	146.9 ± 2.21 *	131.2 ± 1.52
pD ₂	6.18 ± 0.06	6.10 ± 0.05	6.19 ± 0.03	6.16 ± 0.02

* P<0.05 versus Sham, Sham + Doxy and 2K-1C + Doxy groups. n=5 for aortas and n=3-6 for mesenteric arteries.

Figure 5 - **Effect of doxycycline on calponin-1 levels in hypertension.** Panels A and B show the representative photographs and the quantified values of the green fluorescence of calponin-1 levels in both aortas (n=7-8/group) and mesenteric arteries (n=7-11/group) of hypertensive rats. Bar is 20 μ M. Data are shown as mean $\pm$ SEM. *p<0.05 vs. Sham, Sham+Doxycycline and 2K-1C+Doxycycline groups, and #p<0.05 vs. Sham and Sham+doxycycline groups (p=0.06 between 2K-1C vs. 2K-1C+Doxycycline in mesenteric arteries).