UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CÉSAR ARRUDA MESCHIARI

**Efeitos inibitórios de drogas ativadoras da via NO-GMP
cíclico sobre a produção estimulada de MMP-9 em células
endoteliais**

Ribeirão Preto

2014

CÉSAR ARRUDA MESCHIARI

**Efeitos inibitórios de drogas ativadoras da via NO-GMP
cíclico sobre a produção estimulada de MMP-9 em células
endoteliais**

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

Área de concentração: Farmacologia

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

Ribeirão Preto

2014

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Meschiari, César Arruda

Efeitos inibitórios de drogas ativadoras da via NO-GMP cíclico sobre a produção estimulada de MMP-9 em células endoteliais. Ribeirão Preto, 2014.

86 p. il. ; 30cm

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

Orientador: Tanus-Santos, José Eduardo

1. Metaloproteinases da matriz-9, 2. Óxido nítrico, 3. Células endoteliais, 4. Nitrito, 5. GMPc, 6. Fator nuclear kappa B.

FOLHA DE APROVAÇÃO

MESCHIARI, C. A. **Efeitos inibitórios de drogas ativadoras da via NO-GMP cíclico sobre a produção estimulada de MMP-9 em células endoteliais.**

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

Aprovado em: _____

Banca examinadora:

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*Dedico esse trabalho aos meus pais, minhas irmãs, meu namorado e
aos meus amigos, pelo carinho, paciência e o convívio.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que me deram amor, carinho, educação e tantas outras coisas boas que estas páginas seriam pouco para descrevê-las. Também me deram broncas, por isso me tornei uma pessoa de caráter. Amo vocês!

As minhas irmãs que sempre me deram apoio e atenção.

Ao meu orientador Professor Doutor José Eduardo Tanus dos Santos, pelos ensinamentos, discussões de ideias e pela prontidão em me ajudar nas dificuldades encontradas na trajetória acadêmica.

Ao meu namorado, Lucas, que sempre soube me colocar pra cima e acreditou que eu seria capaz.

Aos meus colegas de trabalho Gustavo, Élen, Danielle, Sandra, Lucas, Vanessa, Célio, Grazielle, e também aos colegas que passaram pelo laboratório deixando sua marca em nossos corações.

À Professora Doutora Raquel Fernanda Gerlach Raquel Fernanda Gerlach, pelo apoio e paciência.

Aos colegas de trabalho do laboratório da Professora Doutora Raquel Fernanda Gerlach, Aline Alejandro, Junia, Fellipe, Raquel e Myrella.

Ao pessoal do anexo C, Cris, Ronaldo Lílian e Estela.

Agradeço aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e atenção concedida.

Ao apoio financeiro da Fapesp.

Às minhas amigas Clévia e a Luciana que sempre acreditaram em mim e no meu potencial mesmo quando eu duvidava.

Ao Fox, por estar ao meu lado nos momentos em que eu estava triste e por me ajudar a estudar, fazendo cara de quem estava entendendo.

Aos funcionários Sônia, Ramon e Fátima pelo excelente auxílio técnico, colaboração e pela competência e prontidão para resolver meus problemas. Agradeço a amizade que colaboraram direta ou indiretamente para meu crescimento pessoal e profissional.

When we hit our lowest point we are open to the greatest change.

Aang

RESUMO

MESCHIARI, C. A. **Efeitos inibitórios de drogas ativadoras da via NO-GMP cíclico sobre a produção estimulada de MMP-9 em células endoteliais.** 2014. 86f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e o aumento na atividade das metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) são alguns dos principais mecanismos fisiopatogênicos envolvidos nas doenças cardiovasculares (DCV). Foi demonstrado que o NO pode reduzir a expressão e atividade de MMPs em células musculares lisas vasculares, células mesangiais, entre outras. Em outro estudo, foi mostrado que drogas inibidoras da NO sintase (NOS) podem aumentar a expressão de MMPs. Apesar de o NO apresentar-se diminuído e as MMPs aumentadas durante as DCV, não há evidência clara de que os níveis de NO possam modular diretamente a atividade de MMPs no aparelho cardiovascular. Também não se sabe se este possível efeito seria mediado pelo NF κ B, nem se este possível efeito é dependente da ativação da guanilato ciclase [que promove a formação de GMP cíclico (GMPc)]. Desta maneira, este estudo teve como objetivos: A) investigar os efeitos de drogas ativadoras da via NO-GMP sobre os aumentos da atividade e expressão de MMP-9 em células endoteliais que acontecem sob efeito de phorbol 12-miristato 13-acetato (PMA, droga indutora da expressão de MMP-9); e B) determinar se a inibição de NOS em células endoteliais é acompanhada por aumento da atividade e expressão de MMPs, e C) determinar se estes efeitos são dependentes da ativação de NF κ B ou da formação de GMPc. Células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) foram cultivadas em DMEM e tratadas por 24 horas com 10 nmol/L de PMA ou diferentes concentrações de drogas ativadoras da via NO-GMP ou de inibidor da NOS. Meio de cultura condicionado ou lisado celular foram coletados e submetidos aos ensaios de zimografia, ELISA, imunoblotting ou análise da concentração de nitrito. Os tratamentos com detanonoato, SNAP, atorvastatina e nitrito de sódio diminuíram os aumentos da atividade gelatinolítica e expressão de MMP-9 estimulados por PMA sem afetar as concentrações do inibidor tecidual da metaloproteinase da matriz-1 (TIMP-1). Esses efeitos não foram modificados pelos tratamentos com ODQ (inibidor da guanilato ciclase solúvel) ou 8-bromo-cGMP (um análogo de GMPc) ou hemoglobina (um sequestrador de NO). Enquanto o PMA aumentou a concentração de fosfo-NF κ B p65, os tratamentos com SNAP, atorvastatina ou nitrito não apresentaram influência sobre esse efeito. O tratamento com L-NAME, um inibidor da NOS, não apresentou efeito sobre a atividade gelatinolítica de MMP-9. Em conclusão, foram demonstrados que os efeitos inibitórios de drogas ativadoras da via NO-GMPc sobre a produção estimulada de MMP-9 em células endoteliais são independentes de mecanismos mediados por GMPc e NF κ B, e a inibição da NOS não altera a atividade de MMP-9.

Palavras-chave: metaloproteinase da matriz extracelular-9, óxido nítrico, células endoteliais, nitrito, GMPc, fator nuclear kappa B.

ABSTRACT

MESCHIARI, C. A. **Inhibitory effects of NO-GMPc pathway stimulating drugs on MMP-9 production by endothelial cells.** 2014. 86p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Impaired nitric oxide (NO) bioavailability and imbalanced matrix metalloproteinases (MMPs) activity have important roles in the pathophysiological mechanisms involved in cardiovascular disease (CVD). It was shown that NO can reduce MMPs expression and activity in vascular smooth muscle cells, mesangial cells, and others. In another study, a NO synthase (NOS) inhibitor has increased MMPs expression. Although NO was decreased and MMPs was increased during CVD, there is clear evidence that NO levels can directly modulate MMPs activity in the cardiovascular system. Also, it is not known whether this effect would be mediated by NF κ B, nor whether this effect is dependent on guanylate cyclase activity (which promotes the formation of cyclic GMP). Thus, this project aims to study whether A) the effect of NO donors might decrease MMP-9 activity and expression in endothelial cells stimulated by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (a well-known inducer of MMP-9), and B) the effect of NOS inhibitors might increase MMPs activity and expression in endothelial cells, and C) to determine whether those effects are mediated by the NF κ B activation or cGMP levels. Endothelial cells from human umbilical vein (HUVECs) were grown in modified DMEM and were treated for 24 hours with 10 nmol/L PMA or different concentrations of NO-GMPc pathway stimulating drugs or NOS inhibitor. Conditioned medium or cell lysate were collected after treatments and analyzed by zymography, ELISA, immunoblotting or to determine nitrite concentration. Detanonoate, SNAP, atorvastatin or sodium nitrite treatments attenuated PMA-induced increases in MMP-9 gelatinolytic activity and expression, but they had no effect on tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) concentrations. These effects were not modified by ODQ (a soluble guanylate cyclase inhibitor), or 8-bromo-cGMP (cGMP analogue), or hemoglobin (a NO scavenger). While PMA increased phospho-NF κ B p65 concentration, SNAP, atorvastatin or nitrite had no influence on this effect. The treatment with L-Name, a NOS inhibitor, had no effect on MMP-9 activity. In conclusion, this study shows that the inhibitory effects of NO-GMPc pathway stimulating drugs on MMP-9 production by endothelial cells are independent of cGMP- and NF κ B-mediated mechanisms, and NOS inhibitor had no effect on MMP-9 levels.

Keywords: endothelial cells, nitric oxide, matrix metalloproteinase-9, nitrite, cGMP, nuclear factor kappa B.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ensaio de viabilidade celular com MTT-formazan.....	35
Figura 2: Efeitos do tratamento com PMA sobre HUVECs	38
Figura 3: Efeitos das drogas doadoras de NO sobre a produção de MMP-9 estimulada por PMA	39
Figura 4: Efeitos das drogas doadoras de NO sobre a expressão de TIMP-1 estimulada por PMA	40
Figura 5: Efeitos do ODQ na produção de MMP-9 e TIMP-1 estimulada por PMA ..	41
Figura 6: Efeitos do 8-bromo-cGMP na produção de MMP-9 e TIMP-1 estimulada por PMA.....	42
Figura 7: Efeitos do bay 11-7082 na produção de MMP-9 e TIMP-1 estimulada por PMA.....	44
Figura 8: Efeitos do SNAP sobre o NF κ B p65 total e fosfo-NF κ B p65 estimulados por PMA.....	46
Figura 9: Efeitos do L-NAME na atividade gelatinolítica da MMP-9 determinada por zimografia.....	47
Figura 10: Efeitos da atorvastatina e do sildenafil na produção de MMP-9 estimulada por PMA	48
Figura 11: Efeitos da atorvastatina e do sildenafil sobre as concentrações de nitrito.....	49
Figura 12: Efeitos do nitrito de sódio sobre a atividade gelatinolítica de MMP-9 estimulada por PMA	50
Figura 13: Efeitos do nitrito de sódio e hemoglobina sobre a atividade gelatinolítica de MMP-9 estimulada por PMA.....	52
Figura 14: Efeitos da atorvastatina e do nitrito de sódio sobre a subunidade fosfo-NF κ B p65 estimulados por PMA	53

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

2K1C -	Hipertensão renovascular 2 rins, 1 clipe
AP-1 -	Proteína ativadora-1
BSA -	Albumina sérica bovina
CaCl₂ -	Cloreto de cálcio
Detanonoato -	(Z)-1[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]-diazene-1-ium-1,2-diolate
DCV -	doenças cardiovasculares
ECM -	matriz extracelular
ELISA -	Enzyme linked immunosorbent assay
ERO -	espécies reativas de oxigênio
DMEM -	Dulbecco's modified Eagle medium
g -	gramas
g -	unidade de aceleração gravitacional
GMPc -	Monofosfato cíclico de guanosina
H₂O₂ -	peróxido de hidrogênio
HUVECs -	Células endoteliais de veia umbilical humana
HRP -	horseradish peroxidase
IKK -	quinase inibitória kappa B
IκBα -	inibidor do fator nuclear kappa B alfa
IL -	Interleucina
kDa -	Kilodaltons
L -	Litros
L-NAME -	L-N-Nitroarginine methyl ester
M -	Molar
mg -	Miligrama

ml -	Mililitros
mmol -	Milimol
μmol -	micromol
MMPs -	Metaloproteinases da matriz extracelular
MMP-2 -	metaloproteinase da matriz extracelular-2
MMP-9 -	metaloproteinase da matriz extracelular-9
MT- MMPs -	MMP de membrana
MTT -	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5- diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NADPH -	nicotinamida adenina dinucleotído fosfato
ng -	nanograma
NFκB -	fator nuclear kappa B
nm -	nanometros
nmol -	nanomol
NOS -	óxido nítrico sintase
ODQ -	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one
PBS -	Tampão salina fosfato
pH -	Potencial hidrogeniônico
PI -	Padrão interno
PKC -	proteína quinase C
PMA -	phorbol 12-miristato 13-acetato
RNA_m -	RNA mensageiro
SDS -	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE -	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SFB -	soro fetal bovino
SNAP -	S-nitroso-N-acetylpen- icillamine
TEMED -	tetrametil etilenodiamina
TIMPs -	Inibidores teciduais das MMPs

TMB -	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
Tris -	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
μL -	Microlitro
XOR -	xantina oxiredutase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Metaloproteínases da matriz extracelular.....	16
1.2 Efeitos do NO na expressão e atividade de MMPs.....	18
1.3 Efeitos da atorvastatina na expressão e atividade de MMPs	20
1.4 Efeitos do nitrito.....	20
 2 HIPÓTESE	 23
 3 OBJETIVOS.....	 25
 4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	 27
4.1 Materiais.....	27
4.1.1 Soluções utilizadas nos experimentos	27
4.1.2 Equipamentos utilizados nos experimentos.....	28
4.1.3 Programas de aquisição de dados.....	28
4.2 Métodos	28
4.2.1 Cultura de células	28
4.2.2 Ensaio de viabilidade celular	29
4.2.3 Zimografia.....	29
4.2.4 ELISA.....	30
4.2.5 <i>Western Blotting</i>	31
4.2.6 Determinação da concentração de nitrito.....	32
4.2.7 Análise estatística	32
 5 RESULTADOS.....	 34
5.1 Ensaio de viabilidade celular	34
5.2 PMA estimula a expressão de MMP-9 em HUVECs.....	37
5.3 As drogas doadoras de NO diminuem os aumentos de MMP-9 estimulados por PMA.....	38
5.4 As drogas doadoras de NO não alteram os aumentos da expressão de TIMP-1 estimulados por PMA.....	40
5.5 Os efeitos dos doadores de NO são independentes de mecanismos mediados por GMPc.....	40

5.6 Os efeitos dos doadores de NO sobre a expressão de MMP-9 e TIMP-1 são independentes da ativação de NFκB.....	43
5.7 Efeitos da inibição da síntese de NO por L-NAME	47
5.8 Efeitos da atorvastatina sobre a produção de MMP-9	48
5.9 A atorvastatina aumenta a produção de nitrito	49
5.10 Efeitos do nitrito sobre a produção de MMP-9.....	50
5.11 Os efeitos do nitrito sobre a produção de MMP-9 são independentes da formação de NO	51
5.12 Os efeitos da atorvastatina e do nitrito sobre atividade de MMP-9 são independentes da ativação de NFκB.....	53
 6 DISCUSSÃO	55
 7 CONCLUSÕES	60
 8 REFERÊNCIAS	62
 ANEXO	78

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morte na população mundial, totalizando quase 17 milhões de mortes por ano (1). Aproximadamente, 80% da morbidade e mortalidade mundiais causadas pelas DCV ocorrem em países em desenvolvimento, sendo que no Brasil a DCV é a causa de morte mais prevalente. (2).

A fisiopatologia das DCV é poligênica e multifatorial envolvendo alterações morfológicas e funcionais no aparelho cardiovascular associadas a diversos fatores, incluindo estresse oxidativo e o remodelamento vascular, no qual se destaca a atividade das metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) (3-7).

O aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO) leva à diminuição na biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) para as células musculares lisas da parede dos vasos, diminuindo a vasodilatação dependente do endotélio, e este mecanismo contribui para a elevação da pressão arterial (3, 8, 9). Estas alterações podem levar ao aumento do remodelamento das estruturas dos vasos que é caracterizado pela hipertrofia das células do músculo liso vascular e aumento da deposição de matriz extracelular (ECM) (10-12), e este processo envolve alteração da atividade tecidual de um grupo de enzimas, as MMPs.

1.1 Metaloproteinases da matriz extracelular

As MMPs são uma família de endopeptidases zinco-dependentes compostas por 28 membros e conhecidas por degradar componentes da ECM em processos fisiológicos e patológicos (13), sendo classificadas em seis subfamílias: collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas, MMPs de membrana e outras MMPs. Essa classificação leva em conta a estrutura molecular da MMP e os componentes da matriz extracelular (ECM) que elas degradam (14).

As MMPs são produzidas pelos mais diferentes tipos celulares, sendo encontradas em vários tecidos, incluindo fibroblastos, células inflamatórias, células da musculatura lisa vascular, endotélio e plaquetas (15, 16), sendo responsáveis pela degradação de praticamente todos os componentes da ECM, tais como os diversos tipos de colágeno, gelatina, caseína, fibronectina, elastina, laminina e proteoglicana, entre outros (17-19).

Nos últimos anos, tem-se demonstrado que MMPs também podem degradar muitas moléculas não pertencentes à ECM, desempenhando um importante papel em diferentes processos biológicos tais como: adesão celular (18), agregação plaquetária (20) e regulação do tônus vascular pela sua atividade sobre peptídeos vasoativos (21, 22). Além disso, MMPs tem sido descritas como exercendo atividades no meio intracelular (23), como por exemplo, em cardiomiócitos, onde são capazes de degradar troponina I (24), Poly-(ADP-ribose) polymerase (17), titin (25), e a cadeia leve da miosina-1 (26). Ainda, foi demonstrado que as MMPs podem degradar moléculas sinalizadoras, o que indica a participação dessas proteinases em processos de multiplicação e diferenciação celular (27). Algumas quimiocinas também são substratos das MMPs, sendo que a ação das proteinases pode levar a ativação ou inativação do substrato (28, 29), dependendo das características do mesmo.

Portanto, com o crescente número de substratos para MMPs, novas funções regulatórias dessas enzimas têm sido descobertas, o que torna cada vez mais relevantes seu estudo.

As MMPs são sintetizadas e secretadas na forma de zimogênios, e para exercer sua atividade é necessária o rompimento da ligação entre o resíduo de cisteína do pró-peptídeo e o íon zinco do domínio catalítico. Desta maneira, ocorre a exposição do domínio catalítico e a enzima se torna ativa. (30). A ligação entre o pró-peptídeo e o íon zinco do domínio catalítico pode ser rompida pela reação com radicais livres, tais como, ERO e NO. Em seguida, o pró-peptídeo pode ou não ser clivado pela ação de uma protease (31, 32).

A regulação da atividade das MMPs pode ser feita de três modos: ativação do zimogênio (descrita anteriormente), indução da expressão gênica, e expressão dos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (33). Fatores de crescimento, citocinas, hormônios, estresse de cisalhamento, angiotensina II e o ERO são fatores que podem aumentar a expressão e atividade das MMPs (32, 34). A regulação endógena pós-transcricional da atividade das MMPs pode ocorrer pelos TIMPs, sendo estes muito importantes para regular a remodelação da ECM. Os TIMPs são uma família de proteínas composta por quatro membros: TIMP-1 ao TIMP-4 (35).

Atividade excessiva ou desequilibrada de MMPs está ligada ao mecanismo de lesão de várias doenças tais como ruptura de placa aterosclerótica, infarto do miocárdio, desenvolvimento de aneurismas, metástase tumoral, destruição de

cartilagem em artrite, doença periodontal, entre outras (33, 36-39). As DCV estão relacionadas a aumentos da atividade das MMPs, principalmente a MMP-2 e MMP-9 (26, 32). Essas enzimas desempenham um importante papel no remodelamento vascular patológico (40), que inclui migração e proliferação de células do músculo liso vascular na parede dos vasos, além do acúmulo de ECM e proteínas como o colágeno e fibronectina (41, 42).

O aumento da expressão da MMP-2 e MMP-9 foi encontrado no modelo animais de hipertensão renovascular 2 rins, 1 clipe (2R1C) associado ao remodelamento cardiovascular e estresse oxidativo (6, 43-45). Além disso, altos níveis de MMP-9 são encontrados em regiões vulneráveis de placas ateroscleróticas (46) e, níveis circulantes de MM-2 e MMP-9 tem sido propostos como marcador de risco cardiovascular em pacientes com doença arterial coronariana (47), infarto (48) e hipertensão (49).

1.2 Efeitos do NO na expressão e atividade de MMPs

Correlações inversas entre a atividade de MMP-9 e concentração de marcadores da biodisponibilidade de NO (nitrito+nitrato) e GMP cíclico (GMPc) foram encontradas em estudo com voluntários saudáveis (50), sugerindo que o NO possa exercer uma ação regulatória sobre a expressão de MMPs. Além disso, foi demonstrado em alguns modelos experimentais de culturas de células que o NO é capaz de reduzir a expressão de MMPs. Eberhardt *et al.* observaram que o tratamento de células mesangiais com interleucina-1 beta (IL-1 β) aumentou a expressão e atividade de MMP-2, MMP-9 e TIMP-1, e doadores de NO atenuaram esses aumentos das MMPs (51). Efeito semelhante foi observado por Sinha *et al.* Neste trabalho, tratamento com o doador de NO (detanonoato) atenuou os aumentos da atividade gelatinolítica e expressão de MMP-9 induzidas por IL-1 β em linhagem de células musculares lisas de aorta e anéis de aorta de ratos (52). Phillips *et al.* observaram aumento na expressão e atividade de MMP-9 em células endoteliais humanas de veia umbilical (HUVECs) co-cultivadas com células tumorais de pulmão tratadas com aminoguanidino (inibidor seletivo da NOS induzível) (53), e diminuição na expressão de MMP-9 quando a cultura foi tratada com um doador de NO (spermine-NONOate) (54). Ainda, um inibidor da síntese de NO intensificou os aumentos da expressão de RNA mensageiro (RNAm) para MMP-9 estimulado por

IL-1 β (51). Em conjunto, estes dados sugerem fortemente que doadores de NO podem inibir aumentos de MMP-9 nos tecidos.

O fator nuclear kappa B (NF κ B) é um complexo proteico sensível a aumentos de EROs e NO, que controla transcrições de certas regiões do DNA, dentre elas, as regiões promotoras de genes que codificam algumas MMPs, inclusive a MMP-9 (55). Desta maneira, a ativação do NF κ B pode estar relacionada com a inflamação e o remodelamento vascular (56-59).

Foi observado que deficiência de NO em cultura de células endoteliais tratadas com o inibidor da NO sintase (NOS) *N*-monometil-*L*-argenina promove ativação de NF κ B, e essa ativação foi atenuada com doadores de NO (nitroprussiato de sódio) (60). Estudos demonstram que o NO pode inativar várias proteínas por meio da reação com os grupos tiol presentes em resíduos de aminoácidos como a cisteína (61). Assim, alguns trabalhos sugerem que a S-nitrosilação da subunidade p50 diminua a atividade de ligação do NF κ B ao DNA, impedindo a expressão gênica (61, 62). O NO também poderia causar a S-nitrosilação da quinase inibitória κ B (IKK) reduzindo a sua capacidade de fosforilar a I κ B α , e esta subunidade continuaria exercendo sua atividade inibitória sobre o NF κ B (63).

O PMA (phorbol 12-miristato 13-acetato) é um análogo de diacilglicerol, que é um segundo mensageiro responsável pela ativação da proteína quinase C (PKC) (64). Esta proteína quinase possui expressão e atividade aumentadas em DCV, como hipertensão (65) e diabetes (66), e pode fosforilar vários substratos, levando à ativação da via mitogênica Raf-MEK-ERK, o que resulta na expressão de proto-oncogenes como c-jun e c-fos (67). A união dessas duas proteínas forma o complexo da proteína ativadora-1 (AP-1), o qual se liga a sítios específicos do DNA, promovendo a expressão de vários genes, dentre os quais está a MMP-9 (68, 69). Outra via de indução de MMP-9 pelo PMA seria pela ativação do NF κ B (70-72). Os efeitos do PMA sobre as HUVECs podem reproduzir *in vitro* os efeitos exercidos por fatores aterogênicos *in vivo*, especialmente na indução de MMP-9 (73, 74).

Apesar de o NO apresentar-se diminuído e as MMPs aumentadas durante as DCV, não há evidência clara de que os níveis de NO possam modular diretamente a atividade de MMPs no aparelho cardiovascular. Também não se sabe se este possível efeito seria mediado pelo NF κ B, nem se este possível efeito é dependente da ativação da guanilato ciclase (que promove a formação de GMPc).

1.3 Efeitos da atorvastatina na expressão e atividade de MMPs

As estatinas foram desenvolvidas originalmente como drogas hipolipemiantes, entretanto, existem evidências de que vários efeitos benéficos dessas drogas são independentes de sua ação sobre a síntese de colesterol (75). Dentre estes efeitos, destacam-se efeitos anti-inflamatórios (76), aumento da expressão da NO sintase endotelial (eNOS), com consequente aumento da biodisponibilidade de NO (76, 77), e também, a diminuição na expressão de MMPs em diversos tipos celulares (70, 78, 79).

Recentemente, estudos demonstraram que o tratamento com atorvastatina aumentou a concentração plasmática de nitrito em modelos de embolia pulmonar e diminuiu a atividade gelatinolítica de MMP-9 no pulmão e no plasma destes animais (80). Em modelos de hipertensão renovascular, o tratamento com atorvastatina aumentou as concentrações de nitrito na aorta e no plasma (81). Além disso, a atorvastatina apresentou efeito em diminuir os aumentos de MMP-9 estimulados por PMA em HUVECs (74). Porém, o mecanismo desse efeito ainda permanece desconhecido.

1.4 Efeitos do nitrito

O nitrito (NO_2^-) e o nitrato (NO_3^-) são ânions inorgânicos estáveis presentes na circulação e nos tecidos. Muitos estudos clínicos e experimentais demonstraram esses ânions podem ser endogenamente reciclados a NO por mecanismos enzimáticos e químicos, sendo uma via alternativa e complementar à produção enzimática clássica de NO a partir do substrato L-arginina (82-84). Foi demonstrado que em situações de hipóxia, o nitrito poderia funcionar como um reservatório de NO, sendo transformado nesse gás pela ação da deoxi-hemoglobina (85) ou xantina oxiredutase (XOR) (86, 87). Entretanto, XOR também é capaz de produzir NO a partir de nitrito em condições de normoxia *in vitro* (88).

O nitrito também foi capaz de diminuir a pressão arterial sistólica em animais normotensos quando administrado endovenosamente (89). Neste mesmo trabalho, os autores demonstraram que o nitrito era capaz de produzir relaxamento em anéis isolados de aorta com e sem endotélio, devido à produção de NO. Este efeito foi atenuado pela adição de hemoglobina (que é um sequestrador de NO) ou de 1H-

[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one (ODQ), sugerindo fortemente que ocorra uma produção de NO por heme proteínas das células musculares lisas vasculares, tais como guanilato ciclase solúvel ou mioblobina (89).

Recentemente, foi mostrado que a administração de nitrito aumentou a biodisponibilidade do NO e atenuou a hipertensão em ratos 2R1C (90). Considerando a importância do estresse oxidativo na ativação das MMPs, foi mostrado que a administração de nitrito de sódio ou outros doadores de NO reduziram a atividade de enzimas oxidantes como, por exemplo, a *nicotinamida* adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (91), que é a principal fonte de ERO vascular na hipertensão. Como consequência, a inibição dessa enzima foi associada à redução na formação de ERO em aorta animais hipertensos (91). Com isso, o aumento na biodisponibilidade do NO, após a administração de doadores de NO, poderia atenuar a formação de ERO resultando na diminuição da atividade das MMPs.

Além disso, o nitrito produziu efeitos anti-oxidantes observados no plasma de cães submetidos à embolia pulmonar e também em ensaio de neutrófilos isolados (92).

Em conjuntos, esses dados sugerem que o nitrito pode ser convertido em NO por diversas vias e ainda possuir efeito anti-oxidante. Desta maneira, o nitrito é uma droga promissora para o tratamento de doenças cardiovasculares e por isso, descobrir as vias de sinalização ou mecanismos dessa droga é de extrema importância para o entendimento da real viabilidade do nitrito como droga para doenças cardiovasculares, uma vez que, drogas doadoras de NO possuem meias-vidas muito curtas e muitos efeitos colaterais quando utilizadas *in vivo* (93-95).

Por fim, sabendo-se que expressão e atividade gelatinolítica das MMPs são reguladas por ERO e NO, é possível supor que o nitrito possa modular a expressão dessas enzimas.

HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

Com base no texto exposto acima, foram formuladas as seguintes hipóteses:

- 1) drogas que ativam via NO-GMPc, como os doadores de NO e a atorvastatina, podem atenuar os aumentos das concentrações e atividade de MMPs em células endoteliais induzidos por PMA, possivelmente por atenuar a ativação de NFκB, e que estes possíveis efeitos das drogas ativadoras da via NO-GMPc sejam independentes do aumento das concentrações celulares de GMPc.
- 2) o NO pode inibir a ativação do NFκB, assim, a diminuição da sua produção endógena por drogas pode levar ao aumento da ativação deste fator, resultando no aumento da síntese e secreção de MMPs, e que estes possíveis efeitos do inibidor da NOS sejam independentes do aumento das concentrações celulares de GMPc.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

- A. Determinar se drogas ativadoras da via NO-GMPc podem atenuar os aumentos da atividade gelatinolítica e/ou expressão de MMP-9 em células endoteliais que acontecem sob efeito do PMA.
- B. Determinar se a inibição da síntese de NO em células endoteliais é acompanhada por aumento da síntese e secreção de MMPs.
- C. Determinar se estes efeitos são dependentes da ativação de NF κ B ou da formação de GMPc.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Soluções utilizadas nos experimentos

- PBS (phosphate saline buffered): 137 mmol/L NaCl, 2,7 mmol/L KCl, 8,1 mmol/L Na_2HPO_4 , 1,5 mmol/L KH_2PO_4 , pH 7,3;
- Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) modificado: acrescido de glicose 4,5 g/L, l-glutamina 0,5840 g/L, sulfato de ferro heptahidratado 0,0001 g/L e bicarbonato de sódio 1,5 g/L, não contendo os reagentes vermelho de fenol e nitrato de ferro;
 - Solução de bloqueio: PBS adicionado de BSA (albumina sérica bovina) a 1%;
- Solução de acrilamida 30% e bisacrilamida (0,8%);
- Solução de gelatina: 40 mg/mL,
- Tampão utilizado no gel de separação: Tris-HCl/SDS, pH 8,8;
- Tampão utilizado no gel de largada: Tris-HCl/SDS, pH 6,8;
- Persulfato de Amônio 10%;
- TEMED;
- Tampão de amostra não-redutor 6x: SDS 10%, 125 mmol/L Tris, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,01%; pH 6,8;
- Tampão de amostra redutor 6x: SDS 10%, 125 mmol/L Tris, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01% e beta-mercaptoetanol 5%, pH 6,8;
- Solução de TritonX-100 a 2%;
- Solução de Agarose 3%;
- Solução de coloração: Coomassie Brilliant Blue G-250 0,05%, metanol 30%, ácido acético 10%;
- Solução de descoloração: Metanol 25% e Ácido acético 7%;
- Solução tampão de Tris- CaCl_2 (50 mmol/L Tris, 10 mmol/L CaCl_2 , 1 $\mu\text{mol/L}$ ZnCl_2);
- Kits Quantikine and DuoSet human ELISA Development kits (R&D Systems, DY911 e DY970) e InstantOne ELISA (eBioscience, 85-86083-11);
- Kit de substrato colorimétrico: BD OptEIA (55214);
- Estreptavidina-HRP: DY998 (R&D Systems);
- TBS (Tris-Buffered Saline): 50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7,6;
- Solução de triodeto: 120 mmol/L de iodo, 6 mmol/L de KI e 77% de ácido acético;

- Os demais reagentes não especificados foram adquiridos da Sigma (St. Louis, USA);
- kit ELC (Millipore);

4.1.2 Equipamentos utilizados nos experimentos

- Balança de precisão (Sciencetech SA 120);
- pHmetro (Digimed DM-20);
- Centrífuga refrigerada (Eppendorf 5810R);
- Micropipetas: Eppendorf;
- Espectrofotômetro: μ QuantTM microplate reader (Bio-Tek Instruments Inc);
- Fonte de eletroforese (Biorad);
- Sistema de fotodocumentação: DNR MF-chemiBis 1.6.
- Sistema de fotodocumentação: Chemidoc (Biorad).
- Analizador de NO (Sievers Model 280 NO analyzer, Boulder, CO).

4.1.3 Programas de aquisição de dados

- KCJunior (Molecular Devices Inc., USA);
- GelCapture 5.0 (DNR Bio Imaging System Ltd., Israel);
- Image J (NIH)
- Graphpad Prism 5.0 for Windows (Software Mackiev, USA).

4.2 Métodos

4.2.1 Cultura de células

Serão utilizadas nos experimentos HUVECs comerciais (CRL-2873) cultivadas em meio DMEM modificado (no qual nitrato de ferro III foi substituído por sulfato de ferro III, entre outras) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) em garrafas para cultura de células (74). As culturas serão mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. Para o subcultivo, as células serão desprendidas utilizando um scraper e cultivadas no meio de cultura descrito (96). Todos os experimentos foram realizados com HUVECs entre a segunda até a quinta passagem após serem descongeladas.

Foram plaqueadas 48.000 células/poço em uma placa de cultura de 24 poços, e em seguida, incubadas com 300 µL de DMEM mais 10% de SFB durante 24 h. Logo após, o meio de cultura foi substituído por 300 µL de DMEM sem SFB contendo 0,1% de albumina bovina (BSA) e incubado por mais 24 h. Este passo é conhecido como “starvation” e serviu para preparar as células ao meio de cultura ao qual foram realizados os tratamentos com as drogas, uma vez que, o SFB é rico em MMPs e TIMPs, artefatos que inviabilizariam os demais ensaios realizados. Por fim, o meio de cultura foi substituído por 300 µL de DMEM com 0,1% de BSA mais as concentrações de drogas ou veículos e incubadas durante 24 horas. Ao final de cada tratamento, foram recolhidos os meios de cultura condicionados e o lisado celular.

4.2.2 Ensaio de viabilidade celular

A toxicidade celular associada ao tratamento com as drogas foi determinada por meio do método de MTT (97). Foram plaqueadas 8.000 células/poço em uma placa de cultura de 96 poços em um volume de 100 µL, e em seguida, foram realizados incubações e tratamentos de maneira idêntica à descrita anteriormente. Após o período de tratamento, as HUVECs foram incubadas com 200 µL DMEM com 0,1% de BSA mais 10 µL de solução a 1 mg/mL de MTT por 4 h. Logo após, a placa foi submetida à centrifugação de 4.000 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 100 µL de DMSO. Foi determinada a absorbância das amostras no comprimento de onda de 492 nm no espectrofotômetro µQuant (Bio-Tek). As intensidades das absorbâncias de MTT-formazan de HUVECs tratadas foram comparadas com o controle (HUVECs sem tratamento). Os veículos possuíam concentrações de DMSO de 0,1% ou menores ou concentrações de 10^{-4} mol/L de NaOH ou menores.

4.2.3 Zimografia

A técnica de zimografia é muito utilizada para determinação da atividade gelatinolítica de MMPs no plasma e outras amostras biológicas (98-100).

Resumidamente, o método se baseia na copolimerização de um substrato (gelatina) ao gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). As proteínas aplicadas no gel de

eletroforese são separadas por uma corrente elétrica de acordo com sua massa molecular. A intensidade das bandas formadas e sua posição no gel indicam, respectivamente, a atividade e a massa molecular da enzima analisada.

Amostras de meio de cultura condicionado foram preparadas em tampão de amostra não-redutor na proporção 5:1, e 20 μ L dessa solução foram aplicados em géis de poliacrilamida a 12% mais gelatina 0,1% e separadas por corrente elétrica de 12 mA. Após o tempo da eletroforese, os géis foram submetidos a dois banhos de solução a 2% de Triton X-100, para remover o SDS, e colocados em tampão de Tris CaCl_2 pH 7,4, por 18 horas, a 37 °C. Posteriormente, os géis foram fixados e corados em solução Coomassie Blue 0,05% por 3 horas. Para a visualização das bandas referentes às MMPs os géis foram descorados com metanol a 25% e ácido acético a 7%. Observou-se a formação de bandas claras contra o fundo azul do Coomassie (devido à degradação da gelatina incorporada ao gel pela atividade das MMPs).

Em cada gel, foi adicionado uma alíquota de um padrão interno (2,5 μ L de SFB). A adição de um padrão interno possibilitou normalizar as atividades gelatinolíticas obtidas entre os géis, eliminando fatores de confusão interensaios, podendo assim, compará-los de maneira mais adequada. As bandas da MMP-9 foram fotografadas com o sistema DNR MF-chemiBis 1.6, e quantificadas com o programa de análise de imagem ImageJ. A intensidade das bandas formadas e sua posição no gel indicam, respectivamente, a atividade e a massa molecular da enzima analisada.

4.2.4 ELISA

O teste de ELISA é conhecido pela sua alta sensibilidade e especificidade em análises quantitativas de moléculas orgânicas, baseada na ligação antígeno-anticorpo. Quando se utilizam dois anticorpos com especificidade e seletividade para o mesmo antígeno, porém diferentes epítomos, esta técnica é chamada de ELISA sandwich (101).

Nesta técnica, é aplicado na microplaca o anticorpo conhecido como anticorpo de captura, que fica aderido na mesma por interações eletrostáticas. A seguir, é aplicada uma solução de bloqueio (PBS/BSA) para que todos os sítios da microplaca passíveis de ligação com proteínas sejam ocupado. Então, são colocadas as amostras contendo os antígenos de interesse, que ficam ligados aos

anticorpos de captura. Logo após, são aplicados o anticorpo de detecção (que esta quimicamente ligado a moléculas de biotina) e uma solução de estreptavidina conjugada a peroxidase. A estreptavidina forma ligação com a biotina, que é proporcional a concentração do anticorpo de detecção existente na placa.

Em seguida, são adicionados os substratos que forneceram coloração a solução. Esta reação é baseada na degradação de peróxido de hidrogênio que produz espécies reativas de oxigênio, e essas oxidam um substrato (TMB) que se torna amarelo, sendo a intensidade desta cor proporcional à quantidade peroxidase presente na placa.

Por fim, é realizada uma leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm onde se determina a absorbância das amostras, e com estes valores se calcula a concentração do antígeno analisado por meio de uma curva de calibração.

Foram realizadas as dosagens de MMP-9 e TIMP-1 no utilizando os kits Quantikine and DuoSet human ELISA Development kits (R&D Systems DY911 e DY970 respectivamente) e de NFκB InstantOne (eBioscience, 85-86083-11), Todos os ensaios foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes.

4.2.5 Western Blotting

A ativação do NFκB pode ser determinada pela presença fosforilação da subunidade p65 no resíduos de aminoácido serina 536, pois este processo aumenta a atividade transcricional deste fator e leva ao aumento da expressão de genes alvos (58). Amostras previamente preparadas em tampão redutor foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% sem gelatina, e transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare). Estas membranas foram incubadas overnight, a 4°C, com anticorpo primário anti fosfo- NFκB p65 (na diluição 1:1000). Depois de lavadas com tampão TBS, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário ligado a peroxidase (diluição 1:2000), por 2 horas a temperatura ambiente. A normalização das amostras foi realizada determinando-se a quantidade de β-actina com um anticorpo específico na diluição (1:5000). As bandas foram reveladas com kit ELC (Millipore) e registradas utilizando um sistema de fotodocumentação (Biorad) e as imagens quantificadas com o programa de análise de imagem (Image J).

4.2.6 Determinação da concentração de nitrito

As concentrações de nitrito nas amostras de meio de cultura condicionado foram determinadas por de um método de quimioluminescência baseada na redução do ozônio. Foram injetados 100 μ L de amostras em uma câmara contendo 8 mL de solução de triiodeto, que reduz o nitrito a NO gasoso, e este é arrastado por uma fase gasosa inerte até o equipamento analisador de NO (Sievers), onde é quantificado.

4.2.7 Análise estatística

Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão. Os dados com distribuição normal foram comparados utilizando: teste *t* de Student não pareado para comparar o tratamento com PMA 10 nmol/L com o controle; ou análise de variância de uma via (one-way ANOVA) para comparar o tratamento com diferentes concentrações de uma droga com o PMA ou veículo (concentração zero da droga); ou análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) para comparar os tratamentos com diferentes concentrações de duas drogas (PMA foi considerado a concentração zero de ambas as drogas). Quando a distribuição dos dados não foi normal, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal– Wallis seguido pelo teste de Dunn's. O valor de probabilidade $<0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de viabilidade celular

Na Figura 1, observam-se os efeitos de diferentes concentrações das drogas sobre a viabilidade de HUVECs. Podem ser observadas colunas correspondentes aos controles (HUVECs sem tratamento), aos veículos (esta coluna está ausente quando o veículo da droga foi água ultra pura) e aos tratamentos com diferentes concentrações de drogas.

A intensidade da absorbância de MTT-formazan de células tratadas com 10^{-5} mol/L de PMA foi estatisticamente diferente em comparação ao controle (Figura 1A, $P < 0,05$). Portanto, esta concentração de PMA foi considerada tóxica. O tratamento com 800 μ mol/L de detanonoato foi considerado estatisticamente diferente em comparação ao controle (Figura 1B, $P < 0,05$). Nenhuma concentração de SNAP utilizada nos tratamentos foi considerada tóxica em comparação ao controle (Figura 1C, $P > 0,05$).

Observa-se, na Figura 1D, a concentração de 100 μ mol/L de ODQ diminuiu a intensidade da absorbância de MTT-formazan em comparação ao controle ($P < 0,05$). Nenhuma concentração de 8-bromo-cGMP utilizada nos tratamentos foi considerada tóxica em comparação ao controle (Figura 1E, $P > 0,05$). Na figura 1F, o tratamento com 10 μ mol/L de Bay 11-7082 diminuiu a intensidade da absorbância de MTT-formazan em comparação ao controle ($P < 0,05$).

Os efeitos dos tratamentos com L-NAME, atorvastatina, sildenafil e nitrito podem ser observados nas Figuras 1G, 1H, 1I e 1J, respectivamente. Nenhuma das concentrações analisadas dessas drogas alteraram a viabilidade celular ($P > 0,05$ para todas as comparações).

Nenhuma concentração considerada tóxica no ensaio de viabilidade foi utilizada para o tratamento de HUVECs nos experimentos consecutivos.

Figura 1: Ensaio de viabilidade celular com MTT-formazan. HUVECs foram tratadas com diferentes concentrações de drogas ou veículos. Podem ser observados os efeitos sobre a viabilidade celular dos tratamentos com as seguintes drogas: (A) PMA, (B) detanonoato, (C) SNAP, (D) ODQ, (E) 8-bromo-cGMP, (F) bay 11-7082, (G) L-NAME, (H) atorvastatina, (I) sildenafil e (J) nitrito. Os resultados são apresentados em média $\pm$ erro padrão ($n = 3-5/\text{grupo}$). * $P < 0,05$ em comparação com o controle.

5.2 PMA estimula a expressão de MMP-9 em HUVECs

Este estudo teve como objetivo determinar os efeitos de drogas sobre a produção de MMP-9 em HUVECs. Desta forma, HUVECs foram tratadas com PMA, que é um conhecido indutor de MMP-9 (73, 102). Na Figura 2A, observa-se um gel representativo da zimografia de meio de cultura condicionado de HUVECs tratadas com diferentes concentrações de PMA durante 24 horas. Na Figura 2B, pode-se observar que o PMA aumentou a atividade gelatinolítica de MMP-9 de modo concentração-dependente ($P < 0,05$), embora a concentração de 10^{-6} mol/L ou superiores de PMA tenham sido associadas a aumentos menos da intensidade da atividade gelatinolítica de MMP-9. Com base nesses resultados, a concentração de

10 nmol/L de PMA foi escolhida por apresentar aumentos submáximos na atividade gelatinolítica de MMP-9. A atividade gelatinolítica de MMP-2 não foi aumentada pelo tratamento com diferentes concentrações de PMA, desta maneira, o estudo desta enzima foi descontinuado.

Figura 2: Efeitos do tratamento com PMA sobre HUVECs. (A) Zimograma representativo mostrando as bandas de MMP-9 e MMP-2 de meio de cultura condicionado de HUVECs tratadas com PMA. (B) Intensidade da atividade gelatinolítica no meio de cultura condicionado de HUVECs tratadas com diferentes concentrações de PMA. Soro fetal bovino (SFB) foi utilizado para normalizar os resultados. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão. * $P < 0,05$ em relação ao controle.

5.3 As drogas doadoras de NO diminuem os aumentos de MMP-9 estimulados por PMA

Foi realizado o tratamento com detanonoato, uma droga doadora de NO com meia-vida longa (aproximadamente 20 horas em pH 7,4) em concentrações entre 10 e 400 $\mu\text{mol/L}$ (52, 103, 104). Na Figura 3A, observa-se que o tratamento com detanonoato diminuiu os aumentos da atividade gelatinolítica de MMP-9 estimulados por PMA em concentrações iguais ou maiores a 200 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0,05$). Além disso, o tratamento de HUVECs com detanonoato em concentrações iguais ou

maiores a 200 $\mu\text{mol/L}$ diminuiu os aumentos expressão de MMP-9 estimulados por PMA (Figura 3B, $P<0,05$).

A fim de confirmar esses resultados, foi realizado o tratamento de HUVECs com outra droga doadora de NO, SNAP. O SNAP possui uma meia-vida curta (6 horas) e foi utilizado nas concentrações entre 100 e 300 $\mu\text{mol/L}$. (105, 106). Os efeitos do tratamento com SNAP foram semelhantes aos do detanonoato. Concentrações de SNAP iguais ou maiores a 200 $\mu\text{mol/L}$ diminuíram os aumentos da atividade gelatinolítica e expressão de MMP-9 estimulados por PMA (Figura 3C e 3D, respectivamente, $P<0,05$ para ambas as comparações).

Portanto, os resultados demonstram que as drogas doadoras de NO diminuíram a atividade gelatinolítica e a expressão de MMP-9 estimulados por PMA.

Figura 3: Efeitos das drogas doadoras de NO sobre a produção de MMP-9 estimulada por PMA (10 nmol/L). (A) Efeitos das diferentes concentrações de detanonoato sobre a atividade gelatinolítica e (B) expressão de MMP-9 (determinadas zimografia e ELISA, respectivamente). (C) Efeitos das diferentes concentrações de SNAP sobre a atividade gelatinolítica e (D) expressão de MMP-9. Os resultados são apresentados em média $\pm$ erro padrão (n = 5-9/grupo). * $P<0,05$ em comparação com o controle. # $P<0,05$ em comparação com veículo (concentração zero da droga).

5.4 As drogas doadoras de NO não alteram os aumentos da expressão de TIMP-1 estimulados por PMA

Na Figura 4A, observa-se que o tratamento com PMA aumentou a expressão de TIMP-1 em relação ao controle ($P < 0,05$); entretanto, o tratamento com diferentes concentrações de detanonoato não apresentou efeito sobre esses aumentos da expressão de TIMP-1 ($P > 0,05$). Semelhantemente, o tratamento com diferentes concentrações de SNAP também não apresentou efeito sobre os aumentos da expressão de TIMP-1 estimulados por PMA (Figura 4B, $P > 0,05$).

Desta maneira, os resultados sugerem que as drogas doadoras de NO podem diminuir a atividade gelatinolítica MMP-9 estimulados por PMA, sem alterar a expressão do TIMP-1.

Figura 4: Efeitos das drogas doadoras de NO sobre a expressão de TIMP-1 estimulada por PMA (10 nmol/L). Os tratamentos com diferentes concentrações de (A) detanonoato ou (B) SNAP não apresentaram efeitos sobre a expressão de TIMP-1 (determinada por ELISA). Os resultados são apresentados em média $\pm$ erro padrão ($n = 5-6$ /grupo). * $P < 0,05$ em comparação com o controle.

5.5 Os efeitos dos doadores de NO são independentes de mecanismos mediados por GMPc

Foi realizado o tratamento com ODQ, um inibidor da guanilato ciclase solúvel nas concentrações de 10 ou 32 $\mu\text{mol/L}$ (103, 107). Na Figura 5, observa-se que o tratamento com ODQ não alterou o efeito inibitório do SNAP sobre os aumentos da (A) atividade gelatinolítica ou (B) expressão de MMP-9 estimulados por PMA ($P > 0,05$). Além disso, o tratamento com diferentes concentrações de ODQ também não apresentou efeito sobre a concentração de TIMP-1 no meio de cultura condicionado (Figura 5C, $P > 0,05$).

Figura 5: Efeitos do ODQ na produção de MMP-9 e TIMP-1 estimulada por PMA (10 nmol/L). Os efeitos de ODQ (10 ou 32 μ mol/L) isolado, SNAP (200 ou 300 μ mol/L) isolado, ou a combinação de ambas as drogas sobre a atividade gelatinolítica de MMP-9 determinada por zimografia (A), ou sobre a expressão de MMP-9 (B) e TIMP-1 (C) determinadas por ELISA. Os resultados são apresentados em média $\pm$ erro padrão ($n = 4-5$ /grupo). * $P < 0,05$ em comparação com o controle. # $P < 0,05$ em comparação com PMA 10 nmol/L.

A fim de confirmar que o efeito inibitório das drogas doadoras de NO sobre os níveis de MMP-9 são independentes de mecanismos mediados por GMPc, foi realizado o tratamento com um análogo de GMPc permeável a membrana celular, o 8-bromo-cGMP, nas concentrações de 100 ou 1.000 μ mol/L (103, 107).

Observa-se na Figura 6A que os tratamentos com 8-bromo-cGMP 100 ou 1.000 $\mu\text{mol/L}$ não apresentaram efeitos sobre a expressão de MMP-9 estimulados por PMA ($P>0,05$). Além disso, o tratamento em conjunto com 1.000 $\mu\text{mol/L}$ de 8-bromo-cGMP mais 300 $\mu\text{mol/L}$ de SNAP não apresentou diferença na expressão de MMP-9 estimulados por PMA em comparação com tratamento realizado apenas como SNAP ($P>0,05$). Em adição, os tratamentos com diferentes concentrações de 8-bromo-cGMP não apresentaram efeitos sobre a os aumentos da expressão de TIMP-1 estimulados por PMA (Figura 6B, $P>0,05$).

Portanto, os resultados sugerem que os efeitos dos doadores de NO são independentes de mecanismos mediados por GMPc.

Figura 6: Efeitos do 8-bromo-cGMP na produção de MMP-9 e TIMP-1 estimulada por PMA (10 nmol/L). Os efeitos de 8-bromo-cGMP (100 ou 1.000 $\mu\text{mol/L}$) isolado, SNAP (300 $\mu\text{mol/L}$) isolado, ou a combinação de ambas as drogas sobre a expressão de (A) MMP-9 e (B) TIMP-1 determinadas por ELISA. Os resultados são apresentados em média $\pm$ erro padrão ($n = 5/\text{grupo}$). * $P<0,05$ em comparação com o controle. # $P<0,05$ em comparação com PMA 10 nmol/L.

5.6 Os efeitos dos doadores de NO sobre a expressão de MMP-9 e TIMP-1 são independentes da ativação de NFκB

A regulação transcricional da MMP-9 é dependente da ativação de NFκB (56, 57, 59), dentre vários outros fatores. Deste modo, foram realizados experimentos para determinar se os aumentos da produção de MMP-9 estimulados por PMA eram dependentes ativação de NFκB. HUVECs foram tratadas com BAY 11-7082, um inibidor irreversível da ativação de NFκB, nas concentrações de 1, 3 e 5 μmol/L (105, 108).

Na Figura 7A, observa-se que o tratamento com BAY 11-7082 atenuou os aumentos da atividade gelatinolítica de MMP-9 estimulados por PMA nas concentrações de 3 ou 5 μmol/L ($P<0,05$). Efeito semelhante foi observado na concentração de MMP-9, isto é, o tratamento com 3 ou 5 μmol/L do inibidor de NFκB diminuiu o aumento da expressão de MMP-9 estimulado por PMA (Figura 7B, $P<0,05$). Curiosamente, a concentração de 3 μmol/L de BAY 11-7082 intensificou o aumento a expressão de TIMP-1 estimulado por PMA (Figura 7C, $P<0,05$), mas a concentração de 5 μmol/L de BAY 11-7082 não produziu efeito ($P>0,05$).

Após determinar que os aumentos de MMP-9 estimulados por PMA são dependentes da ativação de NFκB em HUVECs, foi determinado os efeitos de SNAP 300 μmol/L sobre a ativação do NFκB.

Figura 7: Efeitos do bay 11-7082 na produção de MMP-9 e TIMP-1 estimulada por PMA (10 nmol/L). Podem ser observados os efeitos de bay 11-7082 sobre (A) atividade gelatinolítica de MMP-9 (determinada por zimografia) e a expressão de (B) MMP-9 e (C) TIMP-1 (determinadas por ELISA). Os resultados são apresentados em média $\pm$ erro padrão ($n = 3-5/\text{grupo}$). * $P < 0,05$ em comparação com o controle. # $P < 0,05$ em comparação com veículo (concentração zero da droga).

Na Figura 8, observam-se as concentrações de NF κ B p65 total e da forma fosforilada da subunidade p65 do NF κ B (fosfo-NF κ B p65), que foram determinados por ELISA (Figuras 8A e 8B, respectivamente) ou a intensidade das bandas de fosfo-NF κ B p65 em relação à intensidade das bandas de β -actina determinadas por imunoblotting (Figura 8C). Na Figura 8D, observa-se uma imagem representativa dos ensaios de imunoblotting de fosfo-NF κ B p65 e β -actina.

O tratamento com PMA 10 nmol/L durante 24 h não alterou a concentração de NF κ B total no lisado celular em comparação ao controle (Figura 8A, $P>0,05$). Em adição, o tratamento com SNAP 300 μ mol/L também não produziu efeito sobre a concentração de NF κ B total ($P>0,05$). Em relação à Figura 8B, pode-se observar que o tratamento com PMA aumentou a concentração de fosfo-NF κ B p65 em comparação ao controle ($P<0,05$). Além disso, o tratamento com SNAP 300 μ mol/L também não produziu efeito sobre a concentração de fosfo-NF κ B p65 ($P>0,05$). Resultados semelhantes foram observados no ensaio de imunoblotting (Figura 8C), isto é, tratamento com PMA aumentou os níveis de fosfo-NF κ B p65 em comparação ao controle ($P<0,05$), porém o SNAP não teve efeito sobre os níveis de fosfo-NF κ B p65 estimulados por PMA ($P>0,05$).

Desta forma, os resultados sugerem que os efeitos dos doadores de NO sobre a atividade gelatinolítica e/ou expressão de MMP-9 e TIMP-1 são independentes da ativação de NF κ B.

Figura 8: Efeitos do SNAP sobre o NF-κB p65 total e fosfo-NF-κB p65 estimulados por PMA (10 nmol/L). Os níveis de NF-κB p65 total e fosfo-NF-κB p65 foram determinados por ELISA (A e B, respectivamente) ou por imunoblotting (C). Bandas representativas do imunoblotting de fosfo-NF-κB p65 e β-actina podem ser observadas em (D). Os resultados são apresentados em média ± erro padrão (n = 3/grupo em A, n = 9/grupo em B, n = 6-8/grupo em C). * $P < 0,05$ em comparação com o controle.

5.7 Efeitos da inibição da síntese de NO por L-NAME

Para observar o efeito da redução da síntese de NO sobre as HUVECs, foi realizado o tratamento com diferentes concentrações de L-NAME, um inibidor inespecífico de NOS.

Na figura 9, pode-se observar que 10 nmol/L de PMA induziu o aumento da atividade gelatinolítica de MMP-9 em comparação ao controle ($P < 0,05$). Entretanto, as diferentes concentrações de L-NAME (109, 110) utilizadas não produziram efeito semelhante. Além disso, o tratamento simultâneo com 1.000 $\mu\text{mol/L}$ de L-NAME e 10 nmol/L de PMA não apresentou diferença significativa em comparação ao tratamento apenas com PMA ($P > 0,05$).

Portanto, os resultados sugerem que a inibição da síntese de NO não estimula o aumento da atividade gelatinolítica em HUVECs.

Figura 9: Efeitos do L-NAME na atividade gelatinolítica da MMP-9 determinada por zimografia. Diferentes concentrações de L-NAME e/ou PMA 10 nmol/L foram utilizadas para estimular a produção de MMP-9. Os resultados são apresentados em média $\pm$ erro padrão ($n = 7/\text{grupo}$). * $P < 0,05$ em comparação com o controle.

5.8 Efeitos da atorvastatina sobre a produção de MMP-9

Assim como as drogas doadoras de NO, o tratamento com atorvastatina também diminuiu os aumentos de MMP-9 estimulados por PMA em HUVECs (74); entretanto, os mecanismos pelos quais esse efeito ocorre não foram determinados. Sabendo-se que a atorvastatina pode aumentar a biodisponibilidade de NO e possivelmente do seu metabólito, o nitrito, foi investigado se o efeito da atorvastatina sobre a MMP-9 era dependente dos aumentos da formação de GMPc. Para tanto, foi realizado o tratamento de HUVECs com atorvastatina e/ou sildenafil, um inibidor da fosfodiesterase-5.

Na figura 10, pode-se observar que o tratamento atorvastatina 1 $\mu\text{mol/L}$ não produziu efeito sobre a atividade gelatinolítica de MMP-9 ($P>0,05$), já a concentração de 10 $\mu\text{mol/L}$ de atorvastatina diminuiu os aumentos de MMP-9 estimulados por PMA 10 nmol/L ($P<0,05$). Os tratamentos com sildenafil nas concentrações de 1 ou 10 $\mu\text{mol/L}$, ou o tratamento em conjunto de atorvastatina 1 $\mu\text{mol/L}$ mais sildenafil 1 $\mu\text{mol/L}$ não apresentaram efeitos sobre a atividade gelatinolítica de MMP-9 ($P>0,05$). Também foi observado que o tratamento em conjunto de atorvastatina 10 $\mu\text{mol/L}$ mais sildenafil 10 $\mu\text{mol/L}$ diminuiu os aumentos de MMP-9 estimulados por PMA 10 nmol/L ($P<0,05$). Este fenômeno deve-se, provavelmente, apenas pelo efeito da atorvastatina 10 $\mu\text{mol/L}$, uma vez que, o tratamento com sildenafil 10 $\mu\text{mol/L}$ não alterou a atividade gelatinolítica de MMP-9.

Portanto, os resultados sugerem que a atorvastatina diminui os aumentos de MMP-9 estimulados por PMA por mecanismos independentes dos aumentos de GMPc.

Figura 10: Efeitos da atorvastatina e do sildenafil na produção de MMP-9 estimulada por PMA (10 nmol/L). Pode-se observar os efeitos da atorvastatina (1 ou 10 $\mu\text{mol/L}$) isolada, sildenafil (1 ou 10 $\mu\text{mol/L}$) isolado, ou a combinação de ambas as drogas sobre a atividade gelatinolítica de MMP-9 determinadas por zimografia. Os resultados são apresentados em média $\pm$ erro padrão ($n = 6/\text{grupo}$). * $P<0,05$ em comparação com o controle. # $P<0,05$ em comparação com PMA 10 nmol/L.

5.9 A atorvastatina aumenta a produção de nitrito

Foi investigado se o tratamento com atorvastatina poderia aumentar as concentrações de nitrito (metabólito da oxidação de NO) no meio de cultura condicionado de HUVECs.

Na Figura 11, observa-se que o tratamento com PMA 10 nmol/L não alterou as concentrações de nitrito ($P>0,05$). O tratamento atorvastatina 1 $\mu\text{mol/L}$ não produziu efeito sobre a concentração de nitrito ($P>0,05$), já a concentração de 10 $\mu\text{mol/L}$ de atorvastatina aumentou a concentração de nitrito em comparação com o PMA 10 nmol/L ($P<0,05$). Efeito semelhante foi observado para o tratamento em conjunto de atorvastatina 10 $\mu\text{mol/L}$ mais sildenafil 10 $\mu\text{mol/L}$ ($P<0,05$). Este fenômeno deve-se, provavelmente, apenas pelo efeito da atorvastatina 10 $\mu\text{mol/L}$, uma vez que, o tratamento com sildenafil 10 $\mu\text{mol/L}$ não alterou concentração de nitrito ($P>0,05$). O tratamento com sildenafil na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$, ou o tratamento em conjunto de atorvastatina 1 $\mu\text{mol/L}$ mais sildenafil 1 $\mu\text{mol/L}$ não tiveram efeitos sobre as concentrações de nitrito ($P>0,05$).

Portanto, os resultados sugerem que a atorvastatina aumenta a produção de nitrito em HUVECs.

Figura 11: Efeitos da atorvastatina e do sildenafil sobre as concentrações de nitrito. Podem ser observados os efeitos dos tratamentos com PMA (10 nmol/L) isolado e/ou em conjunto com a atorvastatina (1 ou 10 $\mu\text{mol/L}$) e/ou sildenafil (1 ou 10 $\mu\text{mol/L}$). Os resultados são apresentados em média $\pm$ erro padrão ($n = 6-8/\text{grupo}$). * $P<0,05$ em comparação com PMA 10 nmol/L.

5.10 Efeitos do nitrito sobre a produção de MMP-9

O tratamento com atorvastatina diminuiu a atividade gelatinolítica de MMP-9, e simultaneamente, aumentou as concentrações de nitrito. Devido a essa observação, foi investigado se o tratamento com nitrito de sódio poderia diminuir a atividade de MMP-9 estimulada por PMA, quando realizado com concentrações próximas aquelas encontradas no tratamento com atorvastatina.

O efeito do tratamento com diferentes concentrações de nitrito de sódio pode ser observado na Figura 12. A concentração de 0,2 e 2 $\mu\text{mol/L}$ diminuíram a atividade gelatinolítica de MMP-9 estimulada por PMA 10 nmol/L ($P < 0,05$ em ambas as comparações). As concentrações menores que 0,2 $\mu\text{mol/L}$ ou maiores que 2 $\mu\text{mol/L}$ não produziram efeitos sobre a atividade gelatinolítica de MMP-9 ($P > 0,05$).

Deste modo, os resultados demonstram nitrito diminui a atividade gelatinolítica de MMP-9 estimulados por PMA.

Figura 12: Efeitos do nitrito de sódio sobre a atividade gelatinolítica de MMP-9 estimulada por PMA (10 nmol/L). Os resultados são apresentados em média $\pm$ erro padrão ($n = 6-8/\text{grupo}$). * $P < 0,05$ em comparação com PMA 10 nmol/L .

5.11 Os efeitos do nitrito sobre a produção de MMP-9 são independentes da formação de NO

Para determinar se o efeito do tratamento com nitrito sobre a atividade gelatinolítica de MMP-9 era dependente da formação de NO, foram realizados experimentos utilizando 10 nmol/L de PMA, nitrito 2 μ mol/L e diferentes concentrações de um sequestrador de NO, a hemoglobina.

Na Figura 13A, observa-se que o tratamento com nitrito 2 μ mol/L diminuiu o aumento da atividade gelatinolítica de MMP-9 estimulado por PMA 10 nmol/L ($P<0,05$). Em adição, o tratamento em conjunto com PMA 10 nmol/L mais hemoglobina 0,2 μ mol/L não apresentou diferença em comparação ao tratamento isolado com 10 nmol/L de PMA ($P>0,05$). O tratamento simultâneo com 10 nmol/L de PMA, 2 μ mol/L de nitrito e 0,2 μ mol/L de hemoglobina diminuiu o aumento da atividade gelatinolítica de MMP-9 em comparação com PMA 10 nmol/L ($P<0,05$). O tratamento em conjunto com 10 nmol/L de PMA mais 2 μ mol/L de hemoglobina aumentou a atividade gelatinolítica em comparação com o tratamento com PMA 10 nmol/L (Figura 13B, $P<0,05$). Além disso, o tratamento simultâneo com 10 nmol/L de PMA, 2 μ mol/L de nitrito e 2 μ mol/L de hemoglobina diminuiu o aumento da atividade gelatinolítica de MMP-9 em comparação com PMA 10 nmol/L (Figura 13B, $P<0,05$). Observações semelhantes podem ser feita na Figura 13C, na qual o tratamento em conjunto de 10 nmol/L de PMA mais 20 μ mol/L de hemoglobina aumentou a atividade gelatinolítica em comparação com o tratamento com PMA 10 nmol/L ($P<0,05$) e o tratamento simultâneo com 10 nmol/L de PMA, 2 μ mol/L de nitrito e 20 μ mol/L de hemoglobina diminuiu o aumento da atividade gelatinolítica de MMP-9 em comparação com PMA 10 nmol/L ($P<0,05$).

Desta maneira, os resultados sugerem que nitrito diminui os aumentos de MMP-9 estimulados por PMA por mecanismos independentes da formação de NO.

Figura 13: Efeitos do nitrito de sódio e hemoglobina sobre a atividade gelatinolítica de MMP-9 estimulada por PMA (10 nmol/L). Pode-se observar os efeitos do tratamento com 2 $\mu\text{mol/L}$ de nitrito de sódio (NO_2^-) e/ou hemoglobina nas concentrações de (A) 0,2 $\mu\text{mol/L}$, (B) 2 $\mu\text{mol/L}$ ou (C) 20 $\mu\text{mol/L}$. Os resultados são apresentados em média $\pm$ erro padrão ($n = 6-8/\text{grupo}$). * $P < 0,05$ em comparação com PMA 10 nmol/L.

5.12 Os efeitos da atorvastatina e do nitrito sobre atividade de MMP-9 são independentes da ativação de NFκB

Foi realizado o ensaio de ELISA para quantificar a concentração de fosfo-NFκB p65 no lisado de celular tratadas com atorvastatina ou nitrito, a fim de se determinar a participação da via do NFκB nos efeitos da atorvastatina e do nitrito sobre atividade de MMP-9 estimulada por PMA. Estes tratamentos, diferentemente dos anteriores, foram realizados com duração de 30 minutos, pois foi demonstrado que a ativação de NFκB pode acontecer em períodos mais curtos (111).

Na Figura 14, observa-se que o tratamento com 10 nmol/L de PMA aumentou a concentração de fosfo-NFκB p65 em comparação ao controle ($P < 0,05$). Os tratamentos com 10 μmol/L de atorvastatina ou 2 μmol/L de nitrito não apresentaram diferença em comparação ao PMA 10 nmol/L ($P > 0,05$).

Portanto, os resultados sugerem que os efeitos da atorvastatina e do nitrito sobre a atividade gelatinolítica de MMP-9 são independentes da ativação de NFκB.

Figura 14: Efeitos da atorvastatina e do nitrito de sódio sobre a subunidade fosfo-NFκB p65 estimulados por PMA (10 nmol/L). Os resultados são apresentados em média ± erro padrão (n = 7-8/grupo). * $P < 0,05$ em comparação com o controle.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Este foi o primeiro estudo mostrando que drogas doadoras de NO e o nitrito diminuem atividade gelatinolítica e/ou expressão de MMP-9 em células endoteliais. Os resultados sugerem que esse efeitos sejam independentes de mecanismos envolvendo GMPc e NF κ B. Esses resultados podem ser muito relevantes para a terapia farmacológica das DCV pois sugerem que doadores de NO podem atenuar os aumentos de MMPs, que desempenham um papel muito importante nas DCV.

O aumento da atividade das MMPs foi demonstrado como um mecanismo crítico na fisiopatologia das DCV (49, 112, 113). Por exemplo, animais knockout para MMP-2 e MMP-9 apresentaram menor degradação de elastina na aorta (114), diminuição da fibrose, disfunção e hipertrofia cardíaca por sobrecarga de pressão (115). Em modelos de pós-infarto e de arritmia ventricular foi observado que os promotores gênicos da MMP-9 estavam ativados especificamente nas regiões do miocárdio lesionadas (116)(117). Também foi observado que o tratamento com doxiciclina, um inibidor não específico de MMPs, atenuou alterações morfofuncionais na hipertensão renovascular (118). Evidências clínicas também demonstram que o importante papel das MMPs associados a eventos cardiovasculares (119-121). Por exemplo, foi observado um aumento na expressão de MMP-9 em artérias coronárias e aórtica em pacientes diabéticos (122). Em adição, pacientes hipertensos possuem maiores níveis de MMP-9 no plasma em relação a indivíduos normotensos (123). Embora a MMP-9 tenha sido apontada como um importante alvo farmacológico nas DCV (124-126), não existe nenhum inibidor seletivo da MMP-9 disponível para uso clínico. Desta maneira, estratégias farmacológicas alternativas para diminuir a atividade excessiva de MMP-9 podem ser muito convenientes.

Os resultados obtidos sugerem fortemente que as duas drogas doadoras de NO diminuem os aumentos de MMP-9 estimulados por PMA, entretanto, sem afetar as concentrações de TIMP-1. Esses resultados são consistentes com o efeito inibitório dos doadores de NO na atividade de MMP-9, pois o TIMP-1 é um importante inibidor endógeno da MMP-9, sendo assim, os doadores de NO diminuem a razão MMP-9/TIMP-1, que irá refletir-se na atividade de MMP-9 (127, 128). Estes achados vão ao encontro de outros estudos que demonstraram que doadores de NO diminuem a expressão de MMP-9 (51, 53, 129). Em conjunto, os resultados sugerem que doadores de NO podem atenuar um mecanismo importante

na patogênese de muitas DCV como demonstrado em estudos anteriores (52, 92, 130, 131). Apesar de existirem alguns trabalhos demonstrando que doadores de NO aumentam a atividade gelatinolítica ou expressão de MMP-9 (132).

O NO ativa a guanilato ciclase solúvel, aumento assim, as concentrações de GMPc. Esse mecanismo foi apontado como responsável foi diminuição da expressão de MMP-2 em células musculares lisas vasculares de aorta de ratos (133). Entretanto, os dados obtidos mostram que o tratamento com ODQ não apresentou efeito quando associado ao SNAP sobre a atividade e expressão de MMP-9, sugerindo que o SNAP atenua os aumentos da atividade e expressão de MMP-9 estimulados por PMA de maneira independente da formação de GMPc. Corroborando os resultados, o análogo de GMPc, 8-bromo-cGMP, não apresentou efeito sobre os aumentos da atividade e expressão de MMP-9 estimulados por PMA. Em conjuntos, esses resultados sugerem que o GMPc não desempenha um papel regulatório na expressão de MMP-9 em células endoteliais, embora possa alterar a expressão gênica de outros genes nestas células (134).

Enquanto a ativação de NFκB resulta no aumento da expressão de MMPs (57, 135), o tratamento com inibidores de NFκB podem apresentar um efeito protetor contra alterações nas quais as MMPs estão envolvidas, especialmente nas DCV (58, 136). Portanto, os aumentos de fosfo-NFκB p65 e de MMP-9 induzidos por PMA observados no presente estudo estão de acordo com a literatura. Além disso, o inibidor da ativação de NFκB bay 11-7082 diminuiu a atividade gelatinolítica e concentração de MMP-9 estimulada por PMA, sugerindo fortemente a participação da ativação do NFκB nos efeitos induzidos por PMA. Entretanto, o tratamento com SNAP não diminuiu os aumentos de fosfo-NFκB p65, sugerindo que o SNAP atenuou os aumentos da atividade e expressão de MMP-9 por mecanismos independentes de NFκB.

Apesar de o PMA ser um ativador da proteína quinase C (PKC) (73, 102), não existe evidências de que o NO possa direta ou indiretamente afetar a atividade de PKC. A expressão gênica da MMP-9 pode ser regulada por um sítio de ligação do NFκB (137), dois sítios de ligação de AP-1 e um sítio de ligação para Sp1 na região promotora do gene da MMP-9, e todos esses sítios estão relacionados com os efeitos exercidos pelo PMA (56). Desta maneira, pode-se sugerir que o AP-1 e Sp1 tenham uma participação mais importante que o NFκB nos efeitos do NO em diminuir a expressão de MMP-9 no modelo experimental utilizado.

Os efeitos do NO na expressão de MMP-9 podem ser devido a fatores pós-transcricionais, isto é, o NO pode intensificar o decaimento do RNAm de MMP-9 por inibir a expressão do fator estabilizador de RNAm HuR, assim como foi observado em células mesangiais (138, 139). Entretanto, esse mecanismo precisa ser investigado em células endoteliais.

Os resultados mostram que os aumentos da concentração de NO, pelo tratamento com doadores de NO, diminuíram a expressão de MMP-9, desta maneira, foi testada a hipótese de que a diminuição da concentração de NO poderia intensificar a expressão de NO. Nos dados obtidos, observa-se claramente que a inibição da eNOS por L-NAME não apresentou qualquer efeito na atividade gelatinolítica de MMP-9, mesmo sob o estímulo com PMA.

Eberhardt *et al.* (51) demonstrou que o inibidor não seletivo da NOS N-monomethyl L-arginine (L-NMMA) intensificou os aumentos produzidos por IL-1 β . Entretanto, apenas o tratamento com L-NMMA não apresentou efeitos no aumento na expressão de MMP-9. Aumentos da atividade gelatinolítica de MMP-9 também foram demonstrados em HUVECs co-cultivadas com células tumorais de pulmão quando tratadas com aminoguanidine, um inibidor seletivo da NOS induzida (iNOS). Entretanto, este efeito não foi observado em HUVECs cultivadas isoladamente e tratadas com aminoguanidine (53). Os aumentos dos níveis de MMP-9 devido à inibição da NOS também foram descritos em astrócitos estimulados com lipopolissacarídeos (140) e células musculares lisas vasculares estimuladas com IL-1 β (141, 142). Em conjunto, esses achados sugerem que a linhagem celular e a natureza do estímulo para expressão de MMP-9 são fatores determinantes no efeito de drogas inibidoras de NOS sobre a expressão de MMP-9.

Foi observado que a atorvastatina pode aumentar a expressão da eNOS por meio do aumento da estabilidade de seu RNAm (143, 144). Como consequência do aumento da expressão de eNOS, foi demonstrado que a atorvastatina aumenta a produção de NO em células endoteliais (145). Além disso, as estatinas podem aumentar a biodisponibilidade do NO pela fosforilação da eNOS, por meio da ação da Akt, uma serina/treonina quinase (146); ou também por meio da diminuição nos níveis de caveolina (147). Em conjunto, esses dados sugerem que a atorvastatina pode aumentar as concentrações de NO, e consequentemente, as concentrações de nitrito, um metabólito da oxidação do NO. Em adição, as estatinas também diminuem a expressão de MMPs nos tecidos cardiovasculares (70, 73, 74, 78).

Desta maneira, este estudo investigou se os efeitos da atorvastatina sobre a atividade gelatinolítica de MMP-9 eram dependentes da formação de NO.

Os resultados demonstram que a atorvastatina diminuiu a atividade gelatinolítica de MMP-9 estimulada por PMA, e a ausência de efeito do tratamento com sildenafil, sugere que o efeito da atorvastatina sobre a MMP-9 não é dependente dos aumentos das concentrações de GMPc, que acontecem durante o aumento da produção de NO. Também foi observado que a atorvastatina aumentou as concentrações de nitrito no meio de cultura condicionado. De interesse especial, o tratamento com nitrito de sódio diminuiu a atividade gelatinolítica de MMP-9 estimulada por PMA. Sendo assim, sugere-se que a atorvastatina diminuiu a atividade gelatinolítica de MMP-9 por aumentar as concentrações de nitrito. Os resultados do tratamento com nitrito mais hemoglobina corroboram a hipótese de que os efeitos do nitrito (e da atorvastatina) são independentes da formação de NO.

Atualmente, a atorvastatina já tem sido utilizada em ensaios clínicos como coadjuvante no tratamento farmacológico de eventos cardiovasculares, como infarto do miocárdio e falência cardíaca isquêmica, e seus efeitos em inibir a expressão de MMP-9 têm sido observados (148-150). Desta forma, é de grande interesse elucidar os mecanismos pelos quais a atorvastatina exerce seus efeitos sobre a expressão de MMP-9. Neste estudo, os tratamentos com atorvastatina não diminuiu a ativação de NFκB, determinada pela concentração de fosfo-NFκB p65; e esta observação corrobora a hipótese, pois o tratamento com nitrito também não diminuiu a ativação de NFκB. Li *et al.* (151) observou que o tratamento com atorvastatina atenuou a ativação de NFκB em células musculares lisas de artéria pulmonar, e Giordano *et al.* (152) observou que a atorvastatina diminuiu a ativação de NFκB em células musculares lisas de aorta, mas esse efeito não foi observado em HUVECs. Em conjuntos, esses achados sugerem que os mecanismos pelos quais a atorvastatina e o nitrito diminuem a expressão de MMP-9 sejam independentes da ativação de NFκB em células endoteliais. Portanto, mais estudos são necessários para elucidar esses mecanismos regulatórios.

Neste estudo, foi observada uma diminuição da expressão de MMP-9 pela ação de doadores de NO, atorvastatina e nitrito em células endoteliais. Uma importante limitação desse trabalho é que não foram estudados os efeitos *in vivo* sobre a expressão de MMP-9 dessas drogas. Além disso, o PMA é um potente indutor de MMP-9 (73, 102) e isso pode não refletir condições *in vivo*.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Em conclusão, foram demonstrados que os efeitos inibitórios de drogas ativadoras da via NO-GMPc sobre a produção estimulada de MMP-9 em células endoteliais são independentes de mecanismos mediados por GMPc e NF κ B, e a inibição da NOS não altera a atividade de MMP-9. Estes resultados podem ser de grande importância para uma estratégia farmacológica alternativa na abordagem da disfunção e remodelação associadas às doenças cardiovasculares.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Smith SC, Jr., Jackson R, Pearson TA, Fuster V, Yusuf S, Faergeman O, et al. Principles for national and regional guidelines on cardiovascular disease prevention: a scientific statement from the World Heart and Stroke Forum. *Circulation*. 2004 Jun 29;109(25):3112-21.
2. Ishitani LH, Franco Gda C, Perpetuo IH, Franca E. [Socioeconomic inequalities and premature mortality due to cardiovascular diseases in Brazil]. *Rev Saude Publica*. 2006 Aug;40(4):684-91.
3. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000 Nov 10;87(10):840-4.
4. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000 Mar 17;86(5):494-501.
5. Lassegue B, Griendling KK. Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens*. 2004 Sep;17(9):852-60.
6. 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 May 1;46(9):1298-307.
7. Datla SR, Griendling KK. Reactive oxygen species, NADPH oxidases, and hypertension. *Hypertension*. 2010 Sep;56(3):325-30.
8. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 2008 Feb;31 Suppl 2:S170-80.
9. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res*. 2006 Jul 15;71(2):247-58.
10. Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*. 2001 Sep;38(3 Pt 2):581-7.
11. Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2008 Jan 15;75(2):346-59.

12. Graham HK, Horn M, Trafford AW. Extracellular matrix profiles in the progression to heart failure. European Young Physiologists Symposium Keynote Lecture-Bratislava 2007. *Acta Physiol (Oxf)*. 2008 Sep;194(1):3-21.
13. Iyer RP, Patterson NL, Fields GB, Lindsey ML. The history of matrix metalloproteinases: milestones, myths, and misperceptions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 Oct 15;303(8):H919-30.
14. Back M, Ketelhuth DF, Agewall S. Matrix metalloproteinases in atherothrombosis. *Prog Cardiovasc Dis*. 2010 Mar-Apr;52(5):410-28.
15. Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med*. 2008 Oct;29(5):290-308.
16. Chow CK, Jolly S, Rao-Melacini P, Fox KA, Anand SS, Yusuf S. Association of diet, exercise, and smoking modification with risk of early cardiovascular events after acute coronary syndromes. *Circulation*. 2010 Feb 16;121(6):750-8.
17. Kwan JA, Schulze CJ, Wang W, Leon H, Sariahmetoglu M, Sung M, et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. *FASEB J*. 2004 Apr;18(6):690-2.
18. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Mar;8(3):221-33.
19. Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem*. 1995 Mar 17;270(11):5872-6.
20. Sawicki G, Salas E, Murat J, Miszta-Lane H, Radomski MW. Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. *Nature*. 1997 Apr 10;386(6625):616-9.
21. Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res*. 1999 Nov 12;85(10):906-11.
22. Ito A, Yamada M, Sato T, Sanekata K, Sato H, Seiki M, et al. Calmodulin antagonists increase the expression of membrane-type-1 matrix metalloproteinase in human uterine cervical fibroblasts. *Eur J Biochem*. 1998 Jan 15;251(1-2):353-8.

23. Cauwe B, Opdenakker G. Intracellular substrate cleavage: a novel dimension in the biochemistry, biology and pathology of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2010 Oct;45(5):351-423.
24. Gao CQ, Sawicki G, Suarez-Pinzon WL, Csont T, Wozniak M, Ferdinandy P, et al. Matrix metalloproteinase-2 mediates cytokine-induced myocardial contractile dysfunction. *Cardiovasc Res*. 2003 Feb;57(2):426-33.
25. 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 Nov 16;122(20):2039-47.
26. Schulz R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:211-42.
27. Overall CM. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol*. 2002 Sep;22(1):51-86.
28. McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood*. 2002 Aug 15;100(4):1160-7.
29. Mohammed FF, Smookler DS, Khokha R. Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003 Nov;62 Suppl 2:ii43-7.
30. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003 May 2;92(8):827-39.
31. Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol*. 2007 Oct;26(8):587-96.
32. Chow AK, Cena J, Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol*. 2007 Sep;152(2):189-205.
33. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999 Jul 30;274(31):21491-4.

-
34. Coussens LM, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol.* 1996 Nov;3(11):895-904.
35. Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal.* 2008;1(27):re6.
36. Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Wanted--the collagenase responsible for the destruction of the collagen network in human cartilage! *Br J Rheumatol.* 1996 Sep;35(9):818-20.
37. Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol.* 2000 Dec;19(7):623-9.
38. Azzam HS, Arand G, Lippman ME, Thompson EW. Association of MMP-2 activation potential with metastatic progression in human breast cancer cell lines independent of MMP-2 production. *J Natl Cancer Inst.* 1993 Nov 3;85(21):1758-64.
39. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol.* 1993 May;64(5 Suppl):474-84.
40. Sluijter JP, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Vascular remodeling and protease inhibition--bench to bedside. *Cardiovasc Res.* 2006 Feb 15;69(3):595-603.
41. Lehoux S, Lemarie CA, Esposito B, Lijnen HR, Tedgui A. Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. *Circulation.* 2004 Mar 2;109(8):1041-7.
42. Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res.* 2006 Feb 15;69(3):614-24.
43. 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 Apr;29(3):194-201.
44. Ceron CS, Castro MM, Rizzi E, Montenegro MF, Fontana V, Salgado MC, et al. Spironolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and expression in a model of renovascular hypertension. *Br J Pharmacol.* 2010 May;160(1):77-87.

45. 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 May;108(5):318-25.
46. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 1994 Dec;94(6):2493-503.
47. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*. 2003 Apr 1;107(12):1579-85.
48. Montenegro MF, Neto-Neves EM, Dias-Junior CA, Ceron CS, Castro MM, Gomes VA, et al. Quercetin restores plasma nitrite and nitroso species levels in renovascular hypertension. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2010 Oct;382(4):293-301.
49. Fontana V, Silva PS, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension. *Clin Chim Acta*. 2012 Apr 11;413(7-8):656-62.
50. Demacq C, Metzger IF, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Inverse relationship between markers of nitric oxide formation and plasma matrix metalloproteinase-9 levels in healthy volunteers. *Clin Chim Acta*. 2008 Aug;394(1-2):72-6.
51. Eberhardt W, Beeg T, Beck KF, Walpen S, Gauer S, Bohles H, et al. Nitric oxide modulates expression of matrix metalloproteinase-9 in rat mesangial cells. *Kidney Int*. 2000 Jan;57(1):59-69.
52. Sinha I, Hannawa KK, Ailawadi G, Woodrum DT, Ford JW, Henke PK, et al. The nitric oxide donor DETA-NONOate decreases matrix metalloproteinase-9 expression and activity in rat aortic smooth muscle and abdominal aortic explants. *Ann Vasc Surg*. 2006 Jan;20(1):92-8.
53. Phillips PG, Birnby LM, Narendran A, Milonovich WL. Nitric oxide modulates capillary formation at the endothelial cell-tumor cell interface. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001 Jul;281(1):L278-90.
54. Phillips PG, Birnby LM. Nitric oxide modulates caveolin-1 and matrix metalloproteinase-9 expression and distribution at the endothelial cell/tumor cell interface. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 May;286(5):L1055-65.

-
55. Eberhardt W, Huwiler A, Beck KF, Walpen S, Pfeilschifter J. Amplification of IL-1 beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF-kappa B and activating protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways. *J Immunol.* 2000 Nov 15;165(10):5788-97.
56. Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;40(6-7):1362-78.
57. Van der Heiden K, Cuhlmann S, Luong le A, Zakkar M, Evans PC. Role of nuclear factor kappaB in cardiovascular health and disease. *Clin Sci (Lond).* 2010 May;118(10):593-605.
58. Cau S, Guimaraes D, Rizzi E, Ceron C, Souza L, Tirapelli C, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate downregulates vascular matrix metalloproteinases and ameliorates vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertension. *Br J Pharmacol.* 2011 Mar 22.
59. Pfeilschifter J, Eberhardt W, Beck KF. Regulation of gene expression by nitric oxide. *Pflugers Arch.* 2001 Jul;442(4):479-86.
60. Peng HB, Rajavashisth TB, Libby P, Liao JK. Nitric oxide inhibits macrophage-colony stimulating factor gene transcription in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1995 Jul 14;270(28):17050-5.
61. Matthews JR, Botting CH, Panico M, Morris HR, Hay RT. Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res.* 1996 Jun 15;24(12):2236-42.
62. delaTorre A, Schroeder RA, Punzalan C, Kuo PC. Endotoxin-mediated S-nitrosylation of p50 alters NF-kappa B-dependent gene transcription in ANA-1 murine macrophages. *J Immunol.* 1999 Apr 1;162(7):4101-8.
63. Reynaert NL, Ckless K, Korn SH, Vos N, Guala AS, Wouters EF, et al. Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun 15;101(24):8945-50.
64. Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature.* 1984 Apr 19-25;308(5961):693-8.
65. Salamanca DA, Khalil RA. Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. *Biochem Pharmacol.* 2005 Nov 25;70(11):1537-47.

66. Gerald P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res*. 2010 Apr 30;106(8):1319-31.
67. Houde M, de Bruyne G, Bracke M, Ingelman-Sundberg M, Skoglund G, Masure S, et al. Differential regulation of gelatinase B and tissue-type plasminogen activator expression in human Bowes melanoma cells. *Int J Cancer*. 1993 Feb 1;53(3):395-400.
68. Masure S, Billiau A, Van Damme J, Opdenakker G. Human hepatoma cells produce an 85 kDa gelatinase regulated by phorbol 12-myristate 13-acetate. *Biochim Biophys Acta*. 1990 Sep 24;1054(3):317-25.
69. Mackay AR, Ballin M, Pelina MD, Farina AR, Nason AM, Hartzler JL, et al. Effect of phorbol ester and cytokines on matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in tumor and normal cell lines. *Invasion Metastasis*. 1992;12(3-4):168-84.
70. Belloc S, Via D, Canavesi M, Pfister P, Fumagalli R, Paoletti R, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998 Nov;18(11):1671-8.
71. Genersch E, Hayess K, Neuenfeld Y, Haller H. Sustained ERK phosphorylation is necessary but not sufficient for MMP-9 regulation in endothelial cells: involvement of Ras-dependent and -independent pathways. *J Cell Sci*. 2000 Dec;113 Pt 23:4319-30.
72. Park JM, Kim A, Oh JH, Chung AS. Methylseleninic acid inhibits PMA-stimulated pro-MMP-2 activation mediated by MT1-MMP expression and further tumor invasion through suppression of NF-kappaB activation. *Carcinogenesis*. 2007 Apr;28(4):837-47.
73. Massaro M, Zampolli A, Scoditti E, Carluccio MA, Storelli C, Distant A, et al. Statins inhibit cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human endothelial cells: anti-angiogenic actions possibly contributing to plaque stability. *Cardiovasc Res*. 2010 May 1;86(2):311-20.
74. Izidoro-Toledo TC, Guimaraes DA, Belo VA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Effects of statins on matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in human endothelial cells. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 2011 Jun;383(6):547-54.
75. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:89-118.

-
76. Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation*. 2004 Jun 15;109(23 Suppl 1):III39-43.
77. Endres M, Laufs U. Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. *Stroke*. 2004 Nov;35(11 Suppl 1):2708-11.
78. Ikeda U, Shimpo M, Ohki R, Inaba H, Takahashi M, Yamamoto K, et al. Fluvastatin inhibits matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cells. *Hypertension*. 2000 Sep;36(3):325-9.
79. Kamio K, Liu XD, Sugiura H, Togo S, Kawasaki S, Wang X, et al. Statins inhibit matrix metalloproteinase release from human lung fibroblasts. *Eur Respir J*. 2010 Mar;35(3):637-46.
80. Souza-Costa DC, Figueiredo-Lopes L, Alves-Filho JC, Semprini MC, Gerlach RF, Cunha FQ, et al. Protective effects of atorvastatin in rat models of acute pulmonary embolism: involvement of matrix metalloproteinase-9. *Crit Care Med*. 2007 Jan;35(1):239-45.
81. 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(1):578-85.
82. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Feb;7(2):156-67.
83. Lundberg JO, Gladwin MT, Ahluwalia A, Benjamin N, Bryan NS, Butler A, et al. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. *Nat Chem Biol*. 2009 Dec;5(12):865-9.
84. Gladwin MT, Schechter AN, Kim-Shapiro DB, Patel RP, Hogg N, Shiva S, et al. The emerging biology of the nitrite anion. *Nat Chem Biol*. 2005 Nov;1(6):308-14.
85. Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med*. 2003 Dec;9(12):1498-505.
86. Webb A, Bond R, McLean P, Uppal R, Benjamin N, Ahluwalia A. Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 14;101(37):13683-8.

-
87. Tripatara P, Patel NS, Webb A, Rathod K, Lecomte FM, Mazzon E, et al. Nitrite-derived nitric oxide protects the rat kidney against ischemia/reperfusion injury in vivo: role for xanthine oxidoreductase. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Feb;18(2):570-80.
88. Li H, Samouilov A, Liu X, Zweier JL. Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation. *J Biol Chem*. 2004 Apr 23;279(17):16939-46.
89. Alzawahra WF, Talukder MA, Liu X, Samouilov A, Zweier JL. Heme proteins mediate the conversion of nitrite to nitric oxide in the vascular wall. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Aug;295(2):H499-508.
90. Montenegro MF, Pinheiro LC, Amaral JH, Marcal DM, Palei AC, Costa-Filho AJ, et al. Antihypertensive and antioxidant effects of a single daily dose of sodium nitrite in a model of renovascular hypertension. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2012 May;385(5):509-17.
91. Montenegro MF, Amaral JH, Pinheiro LC, Sakamoto EK, Ferreira GC, Reis RI, et al. Sodium nitrite downregulates vascular NADPH oxidase and exerts antihypertensive effects in hypertension. *Free radical biology & medicine*. 2011.
92. Dias-Junior CA, Cau SB, Oliveira AM, Castro MM, Montenegro MF, Gerlach RF, et al. Nitrite or sildenafil, but not BAY 41-2272, blunt acute pulmonary embolism-induced increases in circulating matrix metalloproteinase-9 and oxidative stress. *Thromb Res*. 2009 Jul;124(3):349-55.
93. Nitric Oxide Protocols: Humana Press; 1998.
94. Fung HL. Biochemical mechanism of nitroglycerin action and tolerance: is this old mystery solved? *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:67-85.
95. Munzel T, Daiber A, Mulsch A. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circ Res*. 2005 Sep 30;97(7):618-28.
96. Bala K, Ambwani K, Gohil NK. Effect of different mitogens and serum concentration on HUVEC morphology and characteristics: Implication on use of higher passage cells. *Tissue Cell*. 2011 Apr 19.
97. Liu HT, Li WM, Xu G, Li XY, Bai XF, Wei P, et al. Chitosan oligosaccharides attenuate hydrogen peroxide-induced stress injury in human umbilical vein endothelial cells. *Pharmacol Res*. 2009 Mar;59(3):167-75.

-
98. Gerlach RF, Demacq C, Jung K, Tanus-Santos JE. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clin Biochem*. 2007 Jan;40(1-2):119-23.
99. Gerlach RF, Uzuelli JA, Souza-Tarla CD, Tanus-Santos JE. Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Anal Biochem*. 2005 Sep 1;344(1):147-9.
100. 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 May;38(5):410-4.
101. Abbas AK, Lichtman AH. *Basic Immunology: Functions e Disorders of the Immune System*. Secound ed. Philadelphia: Elsevier Inc.; 2004.
102. Hah N, Lee ST. An absolute role of the PKC-dependent NF-kappaB activation for induction of MMP-9 in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 May 30;305(2):428-33.
103. Braam B, de Roos R, Dijk A, Boer P, Post JA, Kemmeren PP, et al. Nitric oxide donor induces temporal and dose-dependent reduction of gene expression in human endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Nov;287(5):H1977-86.
104. Schankin CJ, Kruse LS, Reinisch VM, Jungmann S, Kristensen JC, Grau S, et al. Nitric oxide-induced changes in endothelial expression of phosphodiesterases 2, 3, and 5. *Headache*. 2010 Mar;50(3):431-41.
105. Waldow T, Witt W, Weber E, Matschke K. Nitric oxide donor-induced persistent inhibition of cell adhesion protein expression and NFkappaB activation in endothelial cells. *Nitric Oxide*. 2006 Sep;15(2):103-13.
106. Munoz G, San Martin R, Farias M, Cea L, Vecchiola A, Casanello P, et al. Insulin restores glucose inhibition of adenosine transport by increasing the expression and activity of the equilibrative nucleoside transporter 2 in human umbilical vein endothelium. *J Cell Physiol*. 2006 Dec;209(3):826-35.
107. Sparkman L, Boggaram V. Nitric oxide increases IL-8 gene transcription and mRNA stability to enhance IL-8 gene expression in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Oct;287(4):L764-73.

108. Lee H, Lin CI, Liao JJ, Lee YW, Yang HY, Lee CY, et al. Lysophospholipids increase ICAM-1 expression in HUVEC through a Gi- and NF-kappaB-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 Dec;287(6):C1657-66.
109. Vinci MC, Bellik L, Filippi S, Ledda F, Parenti A. Trophic effects induced by alpha1D-adrenoceptors on endothelial cells are potentiated by hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Oct;293(4):H2140-7.
110. Li J, White J, Guo L, Zhao X, Wang J, Smart EJ, et al. Salt inactivates endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. *J Nutr*. 2009 Mar;139(3):447-51.
111. Chang MS, Chen BC, Yu MT, Sheu JR, Chen TF, Lin CH. Phorbol 12-myristate 13-acetate upregulates cyclooxygenase-2 expression in human pulmonary epithelial cells via Ras, Raf-1, ERK, and NF-kappaB, but not p38 MAPK, pathways. *Cell Signal*. 2005 Mar;17(3):299-310.
112. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*. 2002 Feb 22;90(3):251-62.
113. Marson BP, Poli de Figueiredo CE, Tanus-Santos JE. Imbalanced matrix metalloproteinases in cardiovascular complications of end-stage kidney disease: a potential pharmacological target. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012 May;110(5):409-15.
114. Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong W, Baxter BT, Starcher BC, Vyavahare NR. Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases. *Circulation*. 2004 Nov 30;110(22):3480-7.
115. Heymans S, Lupu F, Terclavers S, Vanwetswinkel B, Herbert JM, Baker A, et al. Loss or inhibition of uPA or MMP-9 attenuates LV remodeling and dysfunction after acute pressure overload in mice. *Am J Pathol*. 2005 Jan;166(1):15-25.
116. Mukherjee R, Colbath GP, Justus CD, Bruce JA, Allen CM, Hewett KW, et al. Spatiotemporal induction of matrix metalloproteinase-9 transcription after discrete myocardial injury. *FASEB J*. 2010 Oct;24(10):3819-28.
117. Mukherjee R, Snipes JM, Saunders SM, Zavadzkas JA, Spinale FG. Discordant activation of gene promoters for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of the metalloproteinases following myocardial infarction. *J Surg Res*. 2012 Jan;172(1):59-67.
118. 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 Jun;198(2):320-31.

119. Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, Jeffries GA, Anderson TJ, Verma S. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. *Circulation*. 2003 Oct 28;108(17):2041-8.
120. Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Dec;28(12):2108-14.
121. 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*. 2009 Apr;29(3):194-201.
122. Ishibashi T, Kawaguchi M, Sugimoto K, Uekita H, Sakamoto N, Yokoyama K, et al. Advanced glycation end product-mediated matrix metallo-proteinase-9 and apoptosis via renin-angiotensin system in type 2 diabetes. *J Atheroscler Thromb*. 2010 Jun 30;17(6):578-89.
123. Marchesi C, Dentali F, Nicolini E, Maresca AM, Tayebjee MH, Franz M, et al. Plasma levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension: a systematic review and meta-analysis. *J Hypertens*. 2012 Jan;30(1):3-16.
124. Fontana V, Silva PS, Belo VA, Antonio RC, Ceron CS, Biagi C, et al. Consistent alterations of circulating matrix metalloproteinases levels in untreated hypertensives and in spontaneously hypertensive rats: a relevant pharmacological target. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012 Aug;109(2):130-7.
125. Newby AC. Matrix metalloproteinase inhibition therapy for vascular diseases. *Vascul Pharmacol*. 2012 May-Jun;56(5-6):232-44.
126. Castro MM, Tanus-Santos JE. Inhibition of matrix metalloproteinases (MMPs) as a potential strategy to ameliorate hypertension-induced cardiovascular alterations. *Curr Drug Targets*. 2013 Mar;14(3):335-43.
127. Belo VA, Souza-Costa DC, Lana CM, Caputo FL, Marcaccini AM, Gerlach RF, et al. Assessment of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-8, MMP-9, and their inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in obese children and adolescents. *Clin Biochem*. 2009 Jul;42(10-11):984-90.
128. Palei AC, Sandrim VC, Cavalli RC, Tanus-Santos JE. Comparative assessment of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9, and their inhibitors, tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in preeclampsia and gestational hypertension. *Clin Biochem*. 2008 Jul;41(10-11):875-80.

129. Gurjar MV, DeLeon J, Sharma RV, Bhalla RC. Mechanism of inhibition of matrix metalloproteinase-9 induction by NO in vascular smooth muscle cells. *J Appl Physiol*. 2001 Sep;91(3):1380-6.
130. Souza-Costa DC, Zerbini T, Palei AC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. L-arginine attenuates acute pulmonary embolism-induced increases in lung matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9. *Chest*. 2005 Nov;128(5):3705-10.
131. Neto-Neves EM, Dias-Junior CA, Uzuelli JA, Pereira RP, Spiller F, Czaikoski PG, et al. Sildenafil improves the beneficial hemodynamic effects exerted by atorvastatin during acute pulmonary thromboembolism. *Eur J Pharmacol*. 2011 Nov 30;670(2-3):554-60.
132. O'Sullivan S, Medina C, Ledwidge M, Radomski MW, Gilmer JF. Nitric oxide-matrix metalloproteinase-9 interactions: Biological and pharmacological significance: NO and MMP-9 interactions. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Dec 12.
133. Dey NB, Lincoln TM. Possible involvement of Cyclic-GMP-dependent protein kinase on matrix metalloproteinase-2 expression in rat aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem*. 2012 Sep;368(1-2):27-35.
134. Pilz RB, Casteel DE. Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ Res*. 2003 Nov 28;93(11):1034-46.
135. He C. Molecular mechanism of transcriptional activation of human gelatinase B by proximal promoter. *Cancer Lett*. 1996 Sep 10;106(2):185-91.
136. Castier Y, Ramkhalawon B, Riou S, Tedgui A, Lehoux S. Role of NF-kappaB in flow-induced vascular remodeling. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Jul;11(7):1641-9.
137. de Winther MP, Kanters E, Kraal G, Hofker MH. Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 May;25(5):904-14.
138. Eberhardt W, Akool el S, Rebhan J, Frank S, Beck KF, Franzen R, et al. Inhibition of cytokine-induced matrix metalloproteinase 9 expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists is indirect and due to a NO-mediated reduction of mRNA stability. *J Biol Chem*. 2002 Sep 6;277(36):33518-28.
139. Akool el S, Kleinert H, Hamada FM, Abdelwahab MH, Forstermann U, Pfeilschifter J, et al. Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol Cell Biol*. 2003 Jul;23(14):4901-16.

140. Shin CY, Lee WJ, Choi JW, Choi MS, Ryu JR, Oh SJ, et al. Down-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression by nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated rat primary astrocytes. *Nitric Oxide*. 2007 Jun;16(4):425-32.
141. Upchurch GR, Jr., Ford JW, Weiss SJ, Knipp BS, Peterson DA, Thompson RW, et al. Nitric oxide inhibition increases matrix metalloproteinase-9 expression by rat aortic smooth muscle cells in vitro. *J Vasc Surg*. 2001 Jul;34(1):76-83.
142. Knipp BS, Ailawadi G, Ford JW, Peterson DA, Eagleton MJ, Roelofs KJ, et al. Increased MMP-9 expression and activity by aortic smooth muscle cells after nitric oxide synthase inhibition is associated with increased nuclear factor-kappaB and activator protein-1 activity. *J Surg Res*. 2004 Jan;116(1):70-80.
143. Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Bohm M, Dirnagl U, et al. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke*. 2000 Oct;31(10):2442-9.
144. Laufs U, Wassmann S, Hilgers S, Ribaudo N, Bohm M, Nickenig G. Rapid effects on vascular function after initiation and withdrawal of atorvastatin in healthy, normocholesterolemic men. *Am J Cardiol*. 2001 Dec 1;88(11):1306-7.
145. Lefer AM, Scalia R, Lefer DJ. Vascular effects of HMG CoA-reductase inhibitors (statins) unrelated to cholesterol lowering: new concepts for cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2001 Feb 1;49(2):281-7.
146. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med*. 2000 Sep;6(9):1004-10.
147. Feron O, Dessy C, Desager JP, Balligand JL. Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation*. 2001 Jan 2;103(1):113-8.
148. Wu YW, Kao HL, Huang CL, Chen MF, Lin LY, Wang YC, et al. The effects of 3-month atorvastatin therapy on arterial inflammation, calcification, abdominal adipose tissue and circulating biomarkers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2012 Mar;39(3):399-407.
149. Tousoulis D, Oikonomou E, Siasos G, Chrysoshoou C, Zaromitidou M, Kioufis S, et al. Dose-dependent effects of short term atorvastatin treatment on arterial wall properties and on indices of left ventricular remodeling in ischemic heart failure. *Atherosclerosis*. 2013 Apr;227(2):367-72.

150. Liu HL, Yang Y, Yang SL, Luo JP, Li H, Jing LM, et al. Administration of a loading dose of atorvastatin before percutaneous coronary intervention prevents inflammation and reduces myocardial injury in STEMI patients: a randomized clinical study. *Clin Ther*. 2013 Mar;35(3):261-72.
151. Li J, Li JJ, He JG, Nan JL, Guo YL, Xiong CM. Atorvastatin decreases C-reactive protein-induced inflammatory response in pulmonary artery smooth muscle cells by inhibiting nuclear factor-kappaB pathway. *Cardiovasc Ther*. 2010 Spring;28(1):8-14.
152. Giordano A, Romano S, Nappo G, Messina S, Polimeno M, Corcione N, et al. Atorvastatin sensitises vascular smooth muscle cells, but not endothelial cells, to TNF-alpha-induced cell death. *Curr Pharm Des*. 2012;18(38):6331-8.

ANEXO

ANEXO

Mol Cell Biochem (2013) 378:127–135
 DOI 10.1007/s11010-013-1602-1

Nitric oxide attenuates matrix metalloproteinase-9 production by endothelial cells independent of cGMP- or NFκB-mediated mechanisms

Cesar A. Meschiari · Tatiane Izidoro-Toledo ·
 Raquel F. Gerlach · Jose E. Tanus-Santos

Received: 14 September 2012 / Accepted: 23 February 2013 / Published online: 3 March 2013
 © Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Cardiovascular diseases involve critical mechanisms including impaired nitric oxide (NO) levels and abnormal matrix metalloproteinase (MMP) activity. While NO downregulates MMP expression in some cell types, no previous study has examined whether NO downregulates MMP levels in endothelial cells. We hypothesized that NO donors could attenuate MMP-9 production by human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as a result of less NFκB activation or cyclic GMP (cGMP)-mediated mechanisms. We studied the effects of DetaNONOate (10–400 μM) or SNAP (50–400 μM) on phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 10 nM)-induced increases in MMP-9 activity (by gel zymography) or concentrations (by ELISA) as well as on a tissue inhibitor of MMPs (TIMP)-1 concentrations (by ELISA) in the conditioned medium of HUVECs incubated for 24 h with these drugs. We also examined whether the irreversible inhibitor of soluble guanylyl cyclase ODQ modified the effects of SNAP or whether 8-bromo-cGMP (a cell-permeable analog of cGMP) influenced PMA-induced effects on MMP-9 expression. Total and phospho-NFκB p65 concentrations were measured in HUVEC lysates to assess NFκB activation. Both NO donors

attenuated PMA-induced increases in MMP-9 activity and concentrations without significantly affecting TIMP-1 concentrations. This effect was not modified by ODQ, and 8-bromo-cGMP did not affect MMP-9 concentrations. While PMA increased phospho-NFκB p65 concentrations, SNAP had no influence on this effect. In conclusion, this study shows that NO donors may attenuate imbalanced MMP expression and activity in endothelial cells independent of cGMP- or NFκB-mediated mechanisms. Our results may offer an important pharmacological strategy to approach cardiovascular diseases.

Keywords Endothelial cells · Nitric oxide · Nuclear factor Kappa B · Matrix metalloproteinase-9

Introduction

Many cardiovascular diseases clearly involve critical mechanisms including impaired nitric oxide (NO) activity [1] and oxidative stress, which promote functional alterations of the cardiovascular system, and cardiovascular remodeling secondary to abnormal matrix metalloproteinase (MMP) activity [2–4]. Interestingly, recent clinical findings indicate that endogenous NO formation correlates negatively with the circulating MMP-9 levels [5, 6], thus suggesting that an inverse relationship exists between NO and MMP-9 levels. These clinical findings are supported by studies showing that NO downregulates MMP expression in different cell types [7–10]. However, no previous study has examined whether NO downregulates MMP levels in endothelial cells.

NO interferes with nuclear factor Kappa B (NFκB) activity [11], and this transcriptional factor is an important regulator of MMPs expression, especially MMP-9 [12–14].

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11010-013-1602-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. A. Meschiari · T. Izidoro-Toledo · J. E. Tanus-Santos (✉)
 Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900,
 Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil
 e-mail: tanus@fmrp.usp.br

R. F. Gerlach
 Department of Morphology, Stomatology and Physiology,
 Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo,
 Ribeirão Preto, SP, Brazil

However, it is not known whether NO donor drugs may blunt pathogenic mechanisms that promote MMP-9 expression in endothelial cells. In the present study, we hypothesized that NO donors could attenuate MMP-9 production by endothelial cells. We have examined whether this possible effect involves lower NF κ B activation or cyclic GMP (cGMP) mechanisms. We have also examined the effects of NO donors on the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) concentrations because TIMP-1 is an important endogenous MMP-9 inhibitor [15].

Materials and methods

Drugs and reagents

(Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]-diazene-1-ium-1,2-diolate (DetaNONOate), S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP), Bay 11-7082, and 1H-[1, 2, 4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one (ODQ) were purchased from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). Bovine serum albumin (BSA), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 8-bromo-cGMP, dimethylsulfoxide (DMSO), and MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) culture

A commercially available HUVEC line was purchased from ATCC (CRL-2873, Manassas, VA, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) without phenol red containing 6 mM L-glutamine and 4,500 mg/L D-glucose (Cultilab, Sao Paulo, Brazil), supplemented with 15 % fetal bovine serum (FBS, Cultilab, Sao Paulo, Brazil), was used to culture the cells [16]. They were maintained at 37 °C in a 5 % CO₂-humidified atmosphere incubator. The cells were confluent on the day of treatment. All experiments were performed between passages 2 and 5 after unfreezing.

Cell viability determination

Cellular toxicity associated with drug treatments was assessed by MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide) assay [17]. Approximately 8,000 cells/well were plated in 96-well microplates and grown in 100 μ L DMEM + FBS for 24 h. Thereafter, the medium was replaced with serum-free DMEM containing 0.1 % BSA (starvation medium) and the cells were incubated for 24 h. A large range of drug concentrations was analyzed for cell viability after

incubation in starvation medium for 24 h. Then, the medium was discarded and 200 μ L of DMEM containing 0.1 % BSA plus 10 μ L MTT solution (1 mg/mL) was added to each well. The microplates were incubated at 37 °C for 4 h and centrifuged at 4,000 $\times$ g for 5 min. The supernatant was removed, the precipitated formazan was dissolved in 100 μ L DMSO, and the optical density of the samples was measured at 492 nm (μ Quant, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). The cellular viability was evaluated in triplicate and the wells without any drug or vehicle (untreated cells) were used as the control.

HUVECs' treatment with NO donors and other drugs

Approximately 48,000 cells/well were plated in 24-well plates with 500 μ L DMEM + FBS for 24 h followed by 24 h in starvation medium. HUVECs were treated in starvation medium with the vehicle (Control, untreated cells) or with 10 nM PMA (a known MMP-9 inducer) or 10 nM PMA combined with one of the following drugs: DetaNONOate, a long half-life NO donor; SNAP, a short half-life NO donor; Bay 11-7082 (an irreversible inhibitor of NF κ B activation); ODQ (an irreversible inhibitor of soluble guanylyl cyclase); and 8-bromo-cGMP (a cell-permeable analog of cGMP). All treatments were carried out for 24 h as described above for the MTT assay. Conditioned medium and cell lysates were collected and stored at -80 °C until used in biochemical assays.

Assessment of MMP-9 levels in the conditioned medium by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gelatin zymography

Gelatin zymography was performed as previously described [18–20]. Briefly, 15 μ L of conditioned medium samples were diluted in sample buffer (4 % SDS, 125 mM Tris-HCl; pH 6.8, 20 % glycerol, and 0.001 % bromophenol blue) and subjected to electrophoresis on a 7 % SDS-PAGE copolymerized with gelatin (0.15 %) as the substrate. After electrophoresis, the gels were washed twice with 2 % Triton X-100 solution for 30 min and incubated for 16 h on Tris CaCl₂ pH 7.4 buffer at 37 °C. Then, the gels were stained with 0.05 % Coomassie Brilliant Blue G-250 and destained with 25 % methanol and 7 % acetic acid solution. Gelatinolytic activities were detected as unstained bands against the background of the Coomassie blue-stained gelatin. Images were captured using the MF-ChemiBIS 1.6 system (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel), and the bands' intensity was measured with the software Totallab TL100 v2006c. Fetal bovine serum was used in each gel as a molecular weight standard for gelatinases [21] and as an internal standard to correct for intergel variability.

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) to measure MMP-9, TIMP-1, and NFκB concentrations

MMP-9, TIMP-1, and NFκB concentrations were determined with commercially available ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. MMP-9 and TIMP-1 concentrations were assayed in conditioned medium, and phospho-NFκB p65 (Ser536) and total NFκB p65 were assayed in cell lysate.

Immunoblotting detection of phospho-NFκB p65 (Ser536)

To further confirm our results with ELISA, we used immunoblotting. The cell lysate was subjected to 12 % SDS-PAGE under reducing conditions and then transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). After blocking in 1 % BSA, membranes were incubated overnight at 4 °C with monoclonal antibody for phospho-NFκB p65 (Ser536) (1:500 dilution, mAb #3036, Cell Signaling). After a brief wash, membranes were incubated at room temperature for 1 h with secondary horseradish peroxidase conjugated antibody and were developed with the ECL kit (Millipore). Then, the membranes were striped and were incubated with monoclonal anti-b-actin antibody (Millipore) for 45 min at room temperature. Band intensities were captured with the ChemiDoc system (Biorad) and quantified using the ImageJ software (NIH).

Statistical analysis

The results are expressed as mean ± SEM. Between groups, comparisons were assessed by one-way analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Tukey test when the data were normally distributed or by the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's test in the case of not

normally distributed data. A probability value <0.05 was considered significant.

Results

PMA stimulates MMP-9 expression by HUVECs

This study aimed at examining the effects of NO donors on MMP-9 expression by HUVECs. Therefore, HUVECs were stimulated with PMA, which is a well-known inducer of MMP-9 expression [22, 23]. Figure 1a shows a representative gel of the zymography of the conditioned medium and Fig. 1b shows that PMA increases MMP-9 expression in a concentration-dependent manner. However, a 10^{-6} M concentration or above was associated with lower increases in MMP-9 expression (Fig. 1b). High PMA concentrations were associated with cell toxicity (Supplemental Fig. 1A). On the basis of these results, the 10 nM was chosen to carry out further experiments to study the effects of NO donors on PMA-induced MMP-9 expression. MMP-2 expression was not induced by the different PMA concentrations, and therefore MMP-2 was not studied further.

NO donors inhibit PMA-induced effects on MMP-9 and TIMP-1 expression by HUVECs

Treatment of HUVECs with DetaNONOate at 50–400-μM concentrations [9, 24, 25] or with SNAP at 50–400-μM concentrations [26, 27] or the vehicle for 24 h produced no toxicity (Supplemental Fig. 1B, C). Interestingly, Fig. 2a shows that DetaNONOate at 200 μM or higher concentrations attenuated PMA-induced MMP-9 expression by HUVECs (Fig. 2a; $P < 0.05$). This effect was very similar when MMP-9 was assessed by gel zymography or by

Fig. 1 PMA stimulates MMP-9 expression by HUVECs. The cells were treated with increasing concentrations of PMA. **a** Representative SDS-PAGE zymogram showing bands corresponding to MMP-9 and to MMP-2 in conditioned medium samples. Fetal bovine serum (FBS) was used as a standard to normalize the results. **b** Values for MMP-9 gelatinolytic activity. MMP-2 was almost undetectable. Data are expressed as mean ± SEM ($n = 3$ /group). $P < 0.05$ versus control (untreated cells)

ELISA (Fig. 2a, b; $P < 0.05$). Parallel to these results, DetaNONOate had no effects on PMA-induced increases in TIMP-1 concentrations (Fig. 1c; $P > 0.05$).

To further confirm these findings, we tested the effects of another NO donor, SNAP, which has a shorter half-life than DetaNONOate. SNAP exerted effects on MMP-9 and TIMP-1 expression which paralleled those exerted by DetaNONOate. Indeed, SNAP at 200- and 300- μM [26, 27] concentrations attenuated PMA-induced increases in both MMP-9 gelatinolytic activity and MMP-9 concentrations (Fig. 2d, e, respectively; both $P < 0.05$), without exerting significant effects on PMA-induced increases in TIMP-1 concentrations (Fig. 2f; $P > 0.05$).

The effects of NO donors on MMP-9 and TIMP-1 expression are independent of cGMP

Experiments were carried out to examine whether the effects of SNAP involve cGMP-mediated mechanisms. Our results showed that the soluble guanylyl cyclase inhibitor ODQ at 10- or 32- μM concentration [24, 28] did not affect the inhibitory effects exerted by SNAP on MMP-9 activity or MMP-9 concentrations (Fig. 3a, b, respectively; $P > 0.05$). Moreover, ODQ had no effects on TIMP-1 concentrations (Fig. 3c; $P > 0.05$).

To further confirm that NO donors downregulate MMP-9 levels independent of cGMP-mediated mechanisms, the

Fig. 2 Effects of NO donors on MMP-9 and TIMP-1 production stimulated by PMA (10 nM). **a**, **b**, and **c**, respectively, show the effects of different concentrations of DetaNONOate on MMP-9 gelatinolytic activity (determined by zymography) and on MMP-9 and TIMP-1 concentrations determined by ELISA. **d**, **e**, and **f**, respectively, show the effects of different concentrations of SNAP on

MMP-9 gelatinolytic activity (determined by zymography) and on MMP-9 and TIMP-1 concentrations determined by ELISA. Data are expressed as mean $\pm$ SEM ($n = 5$ –9/group). * $P < 0.05$ versus control (untreated cells). # $P < 0.05$ versus respective zero NO donor concentration (vehicle)

Fig. 3 Effects of ODQ (specific inhibitor of the soluble guanylate cyclase) on MMP-9 and TIMP-1 production stimulated by PMA (10 nM). The effects of ODQ (10 and 32 μM) alone, SNAP (200 and 300 μM) alone, or a combination of both drugs on MMP-9 gelatinolytic activity determined by zymography (a) and on MMP-9 (b) and TIMP-1 (c) concentrations determined by ELISA are shown. Data are expressed as mean ± SEM (*n* = 4–5/group). * *P* < 0.05 versus control (untreated cells). # *P* < 0.05 versus PMA (10 nM) treated cells

effects of the cell-permeable analog of cGMP, 8-bromo-cGMP, were studied. 8-bromo-cGMP at 100- or 1,000-μM concentration [24, 28] did not affect PMA-induced increases in MMP-9 and TIMP-1 concentrations (Fig. 4a, b, respectively; *P* > 0.05).

The effects of NO donors on MMP-9 and TIMP-1 expression are independent of the NFκB pathway

MMP-9 is importantly regulated at the transcriptional level, particularly by NFκB [12–14]. Therefore, experiments were carried out to show that PMA-induced increases in MMP-9 expression involve NFκB activation. The irreversible inhibitor of NFκB activation Bay 11-7082 at 3.2- or 5.0-μM concentration [26, 29] attenuated PMA-induced increases in MMP-9 activity and expression (Fig. 5a, b, respectively; *P* < 0.05). While Bay 11-7082 at 3.2-μM concentration promoted PMA-induced increases in TIMP-1

Fig. 4 Effects of 8-bromo-cGMP on MMP-9 and TIMP-1 production stimulated by PMA (10 nM). The effects of 8-bromo-cGMP (100 or 1,000 μM) alone, SNAP (300 μM) alone, or both drugs on MMP-9 (a) and TIMP-1 (b) concentrations were determined by ELISA. Data are expressed as mean ± SEM (*n* = 5/group). * *P* < 0.05 versus control (untreated cells). # *P* < 0.05 versus PMA (10 nM) treated cells

concentrations, the 5.0-μM concentration had no effects (Fig. 5c).

Given that PMA induces MMP-9 expression by activating NFκB, the effects of SNAP at 300-μM concentration on NFκB activation were studied. While PMA increased phospho-NFκB p65 concentrations (Fig. 6b–d; *P* < 0.05), thus indicating NFκB activation, SNAP had no effects on PMA-induced increases in phospho-NFκB p65 concentrations (Fig. 6b–d; *P* > 0.05).

Discussion

This is the first study to show that NO donors downregulate MMP-9 expression in endothelial cells. Our results suggest that this effect is independent of mechanisms involving cGMP or NFκB. Our finding may be very relevant for the pharmacological therapy of cardiovascular diseases because they suggest that NO donors may blunt MMP upregulation and therefore attenuate important mechanisms in cardiovascular diseases.

Increased MMP activity has been shown as a critical pathogenic mechanism in cardiovascular diseases [30–32]. Indeed, there is now clinical and experimental evidence that imbalanced MMP-9 activity promotes functional and structural alterations associated with clinically relevant cardiovascular events [4, 33, 34]. While MMP-9 has been

Fig. 5 Effects of Bay 11-7082 (an NFκB inhibitor) on MMP-9 and TIMP-1 production stimulated by PMA (10 nM). The effects of Bay 11-7082 (1, 3.2, and 5 μM) on MMP-9 gelatinolytic activity (a) determined by zymography or on MMP-9 (b) and TIMP-1 (c) concentrations determined by ELISA are shown. Data are expressed as mean ± SEM ($n = 3$ –5/group). * $P < 0.05$ versus control (untreated cells). # $P < 0.05$ versus PMA (10 nM) treated cells

suggested as an important pharmacological target in cardiovascular diseases [35, 36], there is no clinically available selective MMP-9 inhibitor. Therefore, other pharmacological strategies that could downregulate excessive MMP-9 activity may be very convenient.

Our results clearly show that two NO donors attenuated PMA-induced increases in MMP-9 expression without

Fig. 6 Effects of SNAP on total NFκB p65 (a) and on phospho-NFκB p65 (b and c) concentrations stimulated by PMA (10 nM) are shown. Total NFκB p65 and phospho-NFκB p65 concentrations were determined by ELISA (a and b) or by immunoblotting (c). Representative immunoblotting showing bands corresponding to phospho-NFκB p65 and to β-actin in cell lysate is shown (d). Data are expressed as mean ± SEM ($n = 3$ /group in a, $n = 9$ /group in b, and $n = 6$ –8/group in c). * $P < 0.05$ versus control (untreated cells)

affecting TIMP-1 concentrations. These findings are consistent with a lowering effect of NO donors on net MMP-9 activity because TIMP-1 is an important endogenous MMP-9 inhibitor, and therefore NO donors downregulated MMP-9/TIMP-1 ratios, which reflect net MMP-9 activity [37, 38]. Our findings align with previous studies showing that NO donors decrease MMP-9 expression [7, 39, 40]. Together, these findings indicate that the drugs that release NO or increase NO formation may attenuate an important mechanism in the pathogenesis of many cardiovascular diseases as previously shown in disease models [9, 41–43].

NO activates soluble guanylyl cyclase and increases cGMP concentrations. This effect was shown to decrease MMP production by rat aortic cells [10]. However, our results show that ODQ had no influence on the effects associated with SNAP in the present study, thus suggesting that the SNAP attenuates the increases in MMP-9 expression independent of cGMP. In line with this suggestion, the cGMP analog 8-bromo-cGMP had no effects on the PMA-induced increases in MMP-9 expression. These results indicate that cGMP is probably not a relevant regulator of MMP expression by endothelial cells, although it may well affect the expression of other genes in these cells [44].

NFκB activation enhances MMP expression [12, 45], and NFκB inhibitors may protect against alterations involving MMPs, especially in cardiovascular diseases [46, 47]. Our results showing that PMA increases phospho-NFκB p65 and MMP-9 concentrations confirm these previous findings. Moreover, the inhibitor of NFκB activation Bay 11-7082 attenuated PMA-induced increases in MMP-9 activity and concentrations, thus confirming that the NFκB activation is involved in PMA-induced effects. However, SNAP was not able to inhibit the increases in phospho-NFκB p65, thus suggesting that SNAP attenuated the increases in MMP-9 activity and concentrations by mechanisms that are independent of NFκB.

While PMA activates protein kinase C (PKC) [22, 23], there is no evidence supporting the idea that NO directly or indirectly affects PKC activity. On the other hand, MMP-9 gene expression can be regulated by one NFκB site [48], two activator protein-1 (AP-1) sites, and one Sp1 site in the MMP-9 promoter, and all sites are involved in the effects exerted by PMA [13]. Therefore, AP-1 and Sp1 may have a more important role than NFκB in the effects exerted by NO, which decreased MMP-9 expression in our experimental model. Moreover, NO can also decrease MMP-9 mRNA stability in HUVECs as well as in previously described mesangial cells [49, 50]. Obviously, these hypotheses need to be further investigated.

In the present study, we found evidence for NO-dependent attenuation of MMP-9 expression in endothelial cells. One important limitation of this study is that we have not studied the in vivo effects of different doses of NO donors on MMP-9

expression, and our findings may not be applicable to in vivo conditions. Moreover, PMA is a powerful inducer of MMP-9 [22, 23] and this may not reflect in vivo conditions.

In conclusion, this study shows that NO donors may attenuate imbalanced MMP expression and activity in endothelial cells. Our results may offer an important pharmacological strategy to approach cardiovascular dysfunction and remodeling associated with cardiovascular diseases.

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

References

- Moncada S, Higgs EA (2006) The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 147(Suppl 1):S193–S201
- Castro MM, Kandasamy AD, Youssef N, Schulz R (2011) Matrix metalloproteinase inhibitor properties of tetracyclines: therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Pharmacol Res* 64(6):551–560
- Castro MM, Rizzi E, Ceron CS, Guimaraes DA, Rodrigues GJ, Bendhack LM, Gerlach RF, Tanus-Santos JE (2012) Doxycycline ameliorates 2K-1C hypertension-induced vascular dysfunction in rats by attenuating oxidative stress and improving nitric oxide bioavailability. *Nitric Oxide* 26(3):162–168
- Castro MM, Rizzi E, Prado CM, Rossi MA, Tanus-Santos JE, Gerlach RF (2009) Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling. *Matrix Biol* 29(3):194–201
- Demacq C, Metzger IF, Gerlach RF, Tanus-Santos JE (2008) Inverse relationship between markers of nitric oxide formation and plasma matrix metalloproteinase-9 levels in healthy volunteers. *Clin Chim Acta* 394(1–2):72–76
- Metzger IF, Sandrim VC, Tanus-Santos JE (2012) Endogenous nitric oxide formation correlates negatively with circulating matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 levels in black subjects. *Mol Cell Biochem* 360(1–2):393–399
- Eberhardt W, Beeg T, Beck KF, Walpen S, Gauer S, Bohles H, Pfeilschifter J (2000) Nitric oxide modulates expression of matrix metalloproteinase-9 in rat mesangial cells. *Kidney Int* 57(1):59–69
- Eberhardt W, Huwiler A, Beck KF, Walpen S, Pfeilschifter J (2000) Amplification of IL-1 beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF-kappa B and activating protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways. *J Immunol* 165(10):5788–5797
- Sinha I, Hannawa KK, Ailawadi G, Woodrum DT, Ford JW, Henke PK, Stanley JC, Eagleton MJ, Upchurch GR Jr (2006) The nitric oxide donor DETA-NONOate decreases matrix metalloproteinase-9 expression and activity in rat aortic smooth muscle and abdominal aortic explants. *Ann Vasc Surg* 20(1):92–98
- Dey NB, Lincoln TM (2012) Possible involvement of Cyclic-GMP-dependent protein kinase on matrix metalloproteinase-2 expression in rat aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem* 368(1–2):27–35
- Matthews JR, Botting CH, Panico M, Morris HR, Hay RT (1996) Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res* 24(12):2236–2242

12. Van der Heiden K, Cuhlmann S, le Luong A, Zakkar M, Evans PC (2010) Role of nuclear factor kappaB in cardiovascular health and disease. *Clin Sci (Lond)* 118(10):593–605
13. Clark IM, Swingle TE, Sampieri CL, Edwards DR (2007) The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* 40(6–7):1362–1378
14. Pfeilschifter J, Eberhardt W, Beck KF (2001) Regulation of gene expression by nitric oxide. *Pflügers Arch* 442(4):479–486
15. Goldberg GL, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL (1992) Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem* 267(7):4583–4591
16. Izidoro-Toledo TC, Guimaraes DA, Belo VA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE (2011) Effects of statins on matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in human endothelial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 383(6):547–554
17. Liu HT, Li WM, Xu G, Li XY, Bai XF, Wei P, Yu C, Du YG (2009) Chitosan oligosaccharides attenuate hydrogen peroxide-induced stress injury in human umbilical vein endothelial cells. *Pharmacol Res* 59(3):167–175
18. Gerlach RF, Demacq C, Jung K, Tanus-Santos JE (2007) Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clin Biochem* 40(1–2):119–123
19. Gerlach RF, Uzuelli JA, Souza-Tarla CD, Tanus-Santos JE (2005) Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Anal Biochem* 344(1):147–149
20. Souza-Tarla CD, Uzuelli JA, Machado AA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE (2005) Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Clin Biochem* 38(5):410–414
21. Marcaccini AM, Meschiari CA, Zuairi LR, de Sousa TS, Taba M Jr, Teófilo JM, Jacob-Ferreira AL, Tanus-Santos JE, Novaes AB Jr, Gerlach RF (2010) Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 37(2):180–190
22. Hah N, Lee ST (2003) An absolute role of the PKC-dependent NF-kappaB activation for induction of MMP-9 in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 305(2):428–433
23. Massaro M, Zampolli A, Scoditti E, Carluccio MA, Storelli C, D'Amico A, De Caterina R (2010) Statins inhibit cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human endothelial cells: anti-angiogenic actions possibly contributing to plaque stability. *Cardiovasc Res* 86(2):311–320
24. Braam B, de Roos R, Dijk A, Boer P, Post JA, Kemmeren PP, Holstege FC, Bluysen HA, Koomans HA (2004) Nitric oxide donor induces temporal and dose-dependent reduction of gene expression in human endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287(5):H1977–H1986
25. Schankin CJ, Kruse LS, Reinisch VM, Jungmann S, Kristensen JC, Grau S, Ferrari U, Sinicina I, Goldbrunner R, Straube A, Kruse C (2010) Nitric oxide-induced changes in endothelial expression of phosphodiesterases 2, 3, and 5. *Headache* 50(3):431–441
26. Waldow T, Witt W, Weber E, Matschke K (2006) Nitric oxide donor-induced persistent inhibition of cell adhesion protein expression and NFkappaB activation in endothelial cells. *Nitric Oxide* 15(2):103–113
27. Munoz G, San Martin R, Farias M, Cea L, Vecchiola A, Casanella P, Sobrevia L (2006) Insulin restores glucose inhibition of adenosine transport by increasing the expression and activity of the equilibrative nucleoside transporter 2 in human umbilical vein endothelium. *J Cell Physiol* 209(3):826–835
28. Sparkman L, Boggaram V (2004) Nitric oxide increases IL-8 gene transcription and mRNA stability to enhance IL-8 gene expression in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287(4):L764–L773
29. Lee H, Lin CI, Liao JJ, Lee YW, Yang HY, Lee CY, Hsu HY, Wu HL (2004) Lysophospholipids increase ICAM-1 expression in HUVEC through a Gi- and NF-kappaB-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(6):C1657–C1666
30. Galis ZS, Khatri JJ (2002) Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 90(3):251–262
31. Marson BP, Poli de Figueiredo CE, Tanus-Santos JE (2012) Imbalanced matrix metalloproteinases in cardiovascular complications of end-stage kidney disease: a potential pharmacological target. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 110(5):409–415
32. Fontana V, Silva PS, Gerlach RF, Tanus-Santos JE (2012) Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension. *Clin Chim Acta* 413(7–8):656–662
33. Szmítko PE, Wang CH, Weisel RD, Jeffries GA, Anderson TJ, Verma S (2003) Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. *Circulation* 108(17):2041–2048
34. Newby AC (2008) Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(12):2108–2114
35. Newby AC (2012) Matrix metalloproteinase inhibition therapy for vascular diseases. *Vascul Pharmacol* 56(5–6):232–244
36. Fontana V, Silva PS, Belo VA, Antonio RC, Ceron CS, Biagi C, Gerlach RF, Tanus-Santos JE (2011) Consistent alterations of circulating matrix metalloproteinases levels in untreated hypertensives and in spontaneously hypertensive rats: a relevant pharmacological target. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 109(2):130–137
37. Belo VA, Souza-Costa DC, Lana CM, Caputo FL, Marcaccini AM, Gerlach RF, Bastos MG, Tanus-Santos JE (2009) Assessment of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-8, MMP-9, and their inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in obese children and adolescents. *Clin Biochem* 42(10–11):984–990
38. Palei AC, Sandrim VC, Cavalli RC, Tanus-Santos JE (2008) Comparative assessment of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9, and their inhibitors, tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in preeclampsia and gestational hypertension. *Clin Biochem* 41(10–11):875–880
39. Phillips PG, Birnby LM, Narendran A, Milonovich WL (2001) Nitric oxide modulates capillary formation at the endothelial cell-tumor cell interface. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281(1):L278–L290
40. Gurjar MV, DeLeon J, Sharma RV, Bhalla RC (2001) Mechanism of inhibition of matrix metalloproteinase-9 induction by NO in vascular smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 91(3):1380–1386
41. Souza-Costa DC, Zerbini T, Palei AC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE (2005) L-arginine attenuates acute pulmonary embolism-induced increases in lung matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9. *Chest* 128(5):3705–3710
42. Neto-Neves EM, Dias-Junior CA, Uzuelli JA, Pereira RP, Spiller F, Czaikoski PG, Tanus-Santos JE (2011) Sildenafil improves the beneficial hemodynamic effects exerted by atorvastatin during acute pulmonary thromboembolism. *Eur J Pharmacol* 670(2–3):554–560
43. Dias-Junior CA, Cau SB, Oliveira AM, Castro MM, Montenegro MF, Gerlach RF, Tanus-Santos JE (2009) Nitrite or sildenafil, but not BAY 41-2272, blunt acute pulmonary embolism-induced increases in circulating matrix metalloproteinase-9 and oxidative stress. *Thromb Res* 124(3):349–355

44. Pilz RB, Casteel DE (2003) Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ Res* 93(11):1034–1046
45. He C (1996) Molecular mechanism of transcriptional activation of human gelatinase B by proximal promoter. *Cancer Lett* 106(2):185–191
46. Castier Y, Ramkhalawon B, Riou S, Tedgui A, Lehoux S (2009) Role of NF-kappaB in flow-induced vascular remodeling. *Antioxid Redox Signal* 11(7):1641–1649
47. Cau S, Guimaraes D, Rizzi E, Ceron C, Souza L, Tirapelli C, Gerlach R, Tanus-Santos J (2011) Pyrrolidine dithiocarbamate downregulates vascular matrix metalloproteinases and ameliorates vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertension. *Br J Pharmacol* 164(2):372–381
48. de Winther MP, Kanters E, Kraal G, Hofker MH (2005) Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(5):904–914
49. Eberhardt W, el Akool S, Rebhan J, Frank S, Beck KF, Franzen R, Hamada FM, Pfeilschifter J (2002) Inhibition of cytokine-induced matrix metalloproteinase 9 expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists is indirect and due to a NO-mediated reduction of mRNA stability. *J Biol Chem* 277(36):33518–33528
50. el Akool S, Kleinert H, Hamada FM, Abdelwahab MH, Forstermann U, Pfeilschifter J, Eberhardt W (2003) Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol Cell Biol* 23(14):4901–4916