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

JULIANA MONTENEGRO PARENTE

Proteólise de troponina I e distrofina pela metaloproteinase de matriz (MMP)-2 contribui para a transição de hipertrofia cardíaca concêntrica para excêntrica na hipertensão renovascular crônica

RIBEIRÃO PRETO
2021

JULIANA MONTENEGRO PARENTE

Proteólise de troponina I e distrofina pela metaloproteinase de matriz (MMP)-2 contribui para a transição de hipertrofia cardíaca concêntrica para excêntrica na hipertensão renovascular crônica

Versão Original

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profª Drª Michele Mazzaron de Castro

RIBEIRÃO PRETO

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Parente, Juliana Montenegro
Proteólise de troponina I e distrofina pela metaloproteinase de matriz (MMP)-2 contribui para a transição de hipertrofia cardíaca concêntrica para excêntrica na hipertensão renovascular crônica. Ribeirão Preto, 2021.
107 p. : il. ; color.

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

1. Hipertensão. 2. MMP-2. 3. Hipertrofia cardíaca. 4. Troponina I. 5. Distrofina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Parente JM. Proteólise de troponina I e distrofina pela metaloproteinase de matriz (MMP)-2 contribui para a transição de hipertrofia cardíaca concêntrica para excêntrica na hipertensão renovascular crônica [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2021.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof(a) Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof(a) Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof(a) Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedico este trabalho ao meu pai que, em vida, sonhou e viveu este sonho junto comigo e que, hoje, sonha e vive comigo dentro do meu coração.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu abrigo e refúgio nos melhores e piores momentos.

Aos meus pais, José Carlos e Denise, por todo o amor que dedicaram a mim a vida inteira. Obrigada por acreditarem em mim e nos meus sonhos mesmo quando nem eu mesma acreditei. É uma alegria imensa compartilhar esta conquista com vocês. Vocês são minha inspiração.

Aos meus irmãos, Jessica e Davi, por caminharem ao meu lado durante esta jornada linda que é a vida. O apoio, a compreensão e o amor de vocês foram fundamentais para que eu continuasse seguindo os meus sonhos. Esta conquista também é de vocês.

Aos amigos que fiz em Fortaleza e em Ribeirão Preto, por me incentivarem a mostrar o meu melhor sempre. Sou muito feliz por dividir a vida com cada um de vocês. Obrigada por serem abraço e casa todas as vezes que eu precisei.

Aos amigos que passaram e aos que hoje estão no laboratório, por dividirem comigo todas as alegrias e dificuldades que existem na produção científica. Foi uma honra aprender e conviver com todos vocês. Obrigada pela paciência e por todos os dias felizes que tivemos.

À minha orientadora, Profª Drª Michele Mazzaron de Castro, por ter me formado pesquisadora e por ter acreditado em mim desde o primeiro dia. Você me ensinou a ser uma pesquisadora crítica, uma cientista incansavelmente curiosa e uma futura professora com amor pelo ensino. Obrigada pela paciência, amizade e carinho.

À banca examinadora, pela leitura desta tese e por todas as importantes considerações feitas a este trabalho.

A todos os meus professores do ensino básico e médio, graduação e pós-graduação, por me ensinarem com tanto amor sobre as coisas do mundo e da vida. Admiro e respeito a trajetória de cada um de vocês. Obrigada por me mostrarem que a educação transforma as pessoas e que ensinar é um ato de resistência. Vocês me inspiraram a escolher a educação como profissão e, por isto, sou infinitamente grata.

A todos os funcionários e colegas do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, pelo apoio que me deram durante todos os anos de pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro concedido para a execução deste trabalho.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

“Somos assim. Sonhamos o voo, mas tememos as alturas. Para voar é preciso amar o vazio. Porque o voo só acontece se houver o vazio. O vazio é o espaço da liberdade, a ausência de certezas. Os homens querem voar, mas temem o vazio. Não podem viver sem certezas. Por isso trocam o voo por gaiolas. As gaiolas são o lugar onde as certezas moram.”

Rubem Alves

RESUMO

Parente JM. Proteólise de troponina I e distrofina pela metaloproteinase de matriz (MMP)-2 contribui para a transição de hipertrofia cardíaca concêntrica para excêntrica na hipertensão renovascular crônica [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2021.

Introdução e Hipótese: A MMP-2 é uma protease importante para a gênese e a manutenção da hipertrofia cardíaca durante a hipertensão arterial. Além do meio extracelular, a MMP-2 pode ser ativada em cardiomiócitos e degradar proteínas do sarcômero e/ou citoesqueleto, e assim contribuir para a disfunção cardíaca observada na fase crônica da hipertensão arterial. A hipótese deste trabalho é que a MMP-2 degrada troponina I e distrofina durante a hipertensão arterial crônica e isto culmina na transição cardíaca de hipertrofia concêntrica para excêntrica. Materiais e Métodos: Ratos *Wistar* foram submetidos à cirurgia dois rins-um clipe (2R-1C) ou Sham e mantidos por 16 semanas. Os animais foram tratados com veículo (água) ou doxiciclina (inibidor de MMPs,15mg/kg/dia) a partir da 10ª semana até o fim do protocolo experimental. Pletismografia de cauda e ecocardiograma foram feitos antes, durante e na 16ª semana de hipertensão renovascular. O ventrículo esquerdo foi coletado para as seguintes análises: zimografia em gel e *in situ*, western blot, imunofluorescência, coloração por hematoxilina e eosina e *Picrosirius Red*, microscopia confocal e espectrometria de massas. Experimentos com cultura de cardiomiócitos foram feitos para avaliar a ativação intracelular de MMP-2 por estresse oxidativo. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias ou teste *t* não-pareado. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (023/2015-1). Resultados e Discussão: Todos os ratos 2R-1C apresentaram aumento da pressão arterial sistólica quando comparados aos controles e a doxiciclina não a diminuiu. Cerca de 25% dos ratos 2R-1C apresentaram hipertrofia cardíaca excêntrica (grupo E-LVH). Os demais apresentaram hipertrofia cardíaca concêntrica (grupo C-LVH). A doxiciclina reduziu a porcentagem de transição de hipertrofia concêntrica para excêntrica. Ambos os grupos, C-LVH e E-LVH, apresentaram hipertrofia de cardiomiócitos e a doxiciclina a reverteu. E-LVH foi o único grupo que apresentou maior deposição de colágeno no ventrículo esquerdo. A atividade da MMP-2 aumentou no ventrículo esquerdo dos ratos C- e E-LVH quando comparados aos

controles e a doxiciclina a diminuiu. O estresse oxidativo parece ativar a MMP-2 por S-glutatiolação no interior dos cardiomiócitos. A MMP-2 e a troponina I se colocalizam no ventrículo esquerdo de ratos controle. Isso foi associado a um aumento na degradação de troponina I no grupo E-LVH quando comparado a C-LVH. Foram encontrados cerca de dez locais de clivagem para MMP-2 na distrofina de rato e, além de distrofina e MMP-2 se colocalizarem, uma redução na distrofina foi observada no grupo E-LVH quando comparado aos controles e o tratamento com doxiciclina parece prevenir essa perda. Conclusão: A hipertensão arterial promoveu aumento da atividade de MMP-2 no ventrículo esquerdo e isto foi relacionado à degradação de troponina I e distrofina, o que contribuiu para a transição de hipertrofia cardíaca concêntrica para excêntrica na hipertensão arterial crônica.

Palavras-chave: Hipertensão. MMP-2. Hipertrofia cardíaca. Troponina I. Distrofina.

ABSTRACT

Parente JM. Troponin I and dystrophin proteolysis by matrix metalloproteinase (MMP)-2 contributes to the transition from concentric to eccentric cardiac hypertrophy in chronic renovascular hypertension [thesis]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2021.

Introduction and Hypothesis: MMP-2 is an important protease for the genesis and maintenance of cardiac hypertrophy during arterial hypertension. In addition to its extracellular actions, MMP-2 is activated within cardiomyocytes and degrade sarcomere and/or cytoskeletal proteins, thus contributing to the cardiac dysfunction in the chronic phase of arterial hypertension. The hypothesis of this work is that MMP-2 degrades troponin I and dystrophin during chronic arterial hypertension and this contributes to the transition from concentric to eccentric cardiac hypertrophy. Materials and Methods: Male Wistar rats were two kidney-one clip (2K-1C) or Sham operated and were maintained for 16 weeks. Animals were treated with vehicle (water) or doxycycline (MMP inhibitor, 15 mg/kg/day) from the 10th week until the end of the experimental protocol. Tail-cuff plethysmography and echocardiogram were performed before, during and at 16 weeks of renovascular hypertension. The left ventricle was collected for the following analyzes: gel and *in situ* zymography, western blot, immunofluorescence, hematoxylin and eosin and *Picrosirius Red* staining, confocal microscopy and mass spectrometry. Experiments with cardiomyocytes were also performed to evaluate the intracellular activation of MMP-2 by oxidative stress. Results were analyzed by two-way ANOVA or unpaired *t* test. This work was approved by the Animal Research Ethics Committee (023/2015-1). Results and Discussion: All 2K-1C rats had an increase in the systolic blood pressure when compared to controls and doxycycline did not decrease it. About 25% of 2K-1C rats had eccentric cardiac hypertrophy (E-LVH group). The others had concentric cardiac hypertrophy (C-LVH group). Doxycycline reduced the percentage of transition from concentric to eccentric hypertrophy. Both C-LVH and E-LVH groups had cardiomyocyte hypertrophy and doxycycline reverted it. E-LVH was the only group that showed higher collagen deposition in the left ventricle. MMP-2 activity increased in the left ventricle of C- and E-LVH rats when compared to controls and doxycycline decreased it. Oxidative stress seems to activate MMP-2 by S-glutathiolation within the cardiomyocytes. MMP-2 and

troponin I are co-localized in the left ventricle of Sham rats. This was associated with an increase in troponin I degradation in the E-LVH group when compared to C-LVH. Furthermore, about ten cleavage sites for MMP-2 in rat dystrophin were found and, in addition to dystrophin and MMP-2 are co-localized into cardiomyocytes, a reduction in dystrophin levels was observed in the E-LVH group when compared to controls and doxycicline seems to prevent it. Conclusion: Renovascular hypertension causes an increase in MMP-2 activity in the left ventricle and this is related to troponin I and dystrophin proteolysis, which contributes to the transition from concentric to eccentric cardiac hypertrophy in chronic arterial hypertension.

Keywords: Hypertension. MMP-2. Cardiac hypertrophy. Troponin I. Dystrophin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de divisão dos grupos experimentais durante as diferentes fases do protocolo experimental..... 29
Figura 2 – Efeito da inibição de MMPs na pressão arterial sistólica, peso corporal e peso do coração dos animais em 16 semanas de hipertensão renovascular..... 41
Figura 3 – Efeito da inibição de MMPs na morfologia e função cardíaca em 16 semanas de hipertensão renovascular..... 44
Figura 4 - Efeito da inibição de MMPs na morfologia dos cardiomiócitos e na deposição de colágeno no ventrículo esquerdo em 16 semanas de hipertensão renovascular..... 46
Figura 5 – O tratamento com doxiciclina diminui o aumento da atividade gelatinolítica de MMP-2 em ratos hipertensos 2R-1C..... 48
Figura 6 – O tratamento com doxiciclina não altera a expressão proteica de MMP-2 em ratos 2R-1C..... 49
Figura 7 – O estresse oxidativo promovido por fenilefrina 10 µM pode causar S-glutatiolação da MMP-2 de 72 kDa em cardiomiócitos AC16..... 50
Figura 8 – O tratamento com doxiciclina modifica de forma diferente a expressão de TIMP-4 e TIMP-2 no ventrículo esquerdo de ratos hipertensos 2R-1C..... 51
Figura 9 – A transição de hipertrofia cardíaca concêntrica para excêntrica leva a proteólise de troponina I por uma provável ação de MMP-2 no ventrículo esquerdo de ratos 2R-1C..... 52
Figura 10 – A proteólise de troponina I em ratos hipertensos dos grupos C-LVH e E-LVH foi confirmada por espectrometria de massas..... 54
Figura 11 - A distrofina como alvo proteolítico da MMP-2 *in silico*..... 56
Figura 12 - A MMP-2 contribui para a proteólise de distrofina na transição de hipertrofia concêntrica para excêntrica na hipertensão renovascular crônica..... 58
Figura 13 – Redução de expressão de distrofina de 427 kDa por western blot no ventrículo esquerdo de ratos 2R-1C..... 59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

2 OBJETIVOS 24

2.1 Objetivo Geral 25

2.2 Objetivos Específicos 25

3 MATERIAIS E MÉTODOS.....26

3.1 Aprovação do Protocolo Experimental pelo Comitê De Ética em Pesquisa Animal 27

3.2 Animais 27

3.3 Modelo de Hipertensão Renovascular Dois Rins-Um Clipe (2R-1C).....27

3.4 Delineamento Experimental 28

3.5 Aferição da Pressão Arterial Sistólica por Pletismografia de Cauda 29

3.6 Avaliação da Estrutura e Função Cardíaca por Ecocardiografia.....30

3.7 Aquisição e Processamento das Amostras de Ventrículo Esquerdo.....30

3.8 Avaliação da Deposição de Colágeno e Morfologia dos Cardiomiócitos 31

3.9 Detecção da Atividade Gelatinolítica de MMP-2 por Zimografia em Gel e Zimografia *in situ* 31

3.10 Western Blot para Detectar a Expressão de MMP-2, MMP-9, Troponina I, Distrofina, TIMP-2 e TIMP-4 em Amostras de Ventrículo Esquerdo.....32

3.11 Imunofluorescência para Detectar a Expressão de Distrofina.....33

3.12 Microscopia Confocal para Colocalizar MMP-2 com Troponina I e Distrofina no Ventrículo Esquerdo 34

3.13 Análise de Espectrometria de Massas de Troponina I em Extratos de Ventrículo Esquerdo 35

3.14 Predição *in silico* de Locais de Clivagem de MMP-2 na Distrofina de Rato……36

3.15 Experimentos em Cultura de Cardiomiócitos AC16 36

3.15.1 Delineamento Experimental 36

3.15.2 Cultura de Células 37

3.15.3 Análise de Estresse Oxidativo por Sonda CM-H2DCFDA 38

3.15.4 Western Blot para MMP-2 38

3.15.5 Ensaio de Biotin Switch pra Avaliar a S-glutatiolação de MMP-2 39

3.16 Análise Estatística 39

4 RESULTADOS 40

5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS 60

6 CONCLUSÃO 66

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68

APÊNDICE 74

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é uma doença crônica caracterizada pelo aumento persistente da pressão arterial e é considerada um fator de risco importante para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como doenças coronariana e cerebrovascular, cardiomiopatias e falência cardíaca. A falência cardíaca é uma condição na qual o coração perde a capacidade de fornecer ao corpo um fluxo sanguíneo adequado e é uma doença que requer atenção. Em 2019, mais de 523 milhões de casos e cerca de 18 milhões de mortes foram globalmente atribuídos a doenças cardiovasculares. No mesmo ano, a prevalência de falência cardíaca, ajustada por idade em países da América do Norte, leste da Ásia, Oceania e leste da África Subsaariana, foi de mais de 800 casos por 100.000 indivíduos e a hipertensão arterial foi o principal fator de risco associado à essa condição em todos esses continentes (1). No Brasil, dados colhidos em 2017 mostraram que 27,3% das 1.312.663 mortes registradas no país foram causadas por doenças cardiovasculares. Destas, 45% foram provocadas por falência cardíaca associada à hipertensão arterial (2). A hipertrofia do ventrículo esquerdo é um preditor significativo para o surgimento de falência cardíaca associada à hipertensão arterial (3).

O coração pode ser definido como uma bomba cuja função é levar sangue oxigenado a todos os órgãos e tecidos. De forma resumida, o lado direito do coração (átrio e em seguida, ventrículo) recebe o sangue rico em gás carbônico vindo das veias cavas superior e inferior e o bombeia para os pulmões para que possa ser oxigenado. Feito isso, o sangue, agora rico em oxigênio, volta para o lado esquerdo do coração (átrio e em seguida, ventrículo) e é bombeado para a aorta para que possa seguir até arteríolas e capilares e assim suprir as necessidades metabólicas de órgãos e tecidos (4). Todo esse sistema, chamado de sistema cardiovascular, funciona de maneira eficiente com valores de pressão arterial fisiológicos (até 140 mmHg de pressão sistólica e 90 mmHg de pressão diastólica).

Quando a hipertensão arterial se estabelece, modificações estruturais acontecem para adaptar o sistema cardiovascular às medidas mais altas de pressão arterial. Segundo a lei de Laplace, o aumento da pressão arterial gera uma tensão nas paredes das câmaras cardíacas e das artérias. Isso desencadeia uma série de alterações moleculares que resultam em hipertrofia, sendo essa uma resposta que

visa reduzir a tensão na parede ventricular, atrial e arterial (3). O aumento da resistência vascular periférica decorrente do remodelamento arterial ocasionado pela hipertensão arterial, causa um estresse ainda maior no ventrículo esquerdo, que, além de ter uma maior tensão em suas paredes devido ao aumento da pressão arterial, ainda precisa empregar uma força maior para bombear o sangue. Todo esse estresse faz com que o ventrículo esquerdo hipertrofie e isto acontece para que o coração continue a manter sua função de bomba. Entretanto, se esse estresse não cessa e a pressão arterial continua elevada, o processo de hipertrofia se torna patológico e o coração aos poucos vai perdendo sua capacidade de bombear o sangue efetivamente. A hipertrofia do ventrículo esquerdo pode ser uma sinalização de que, caso a hipertensão arterial não seja controlada, ocorrerá falência cardíaca (3). Portanto, estudar os mecanismos que levam um coração hipertrofiado à falência é de extrema importância para reduzir a prevalência de mortes relacionadas à hipertensão arterial.

A hipertrofia do ventrículo esquerdo pode ocorrer em situações fisiológicas, como em atletas submetidos a esporte de alto rendimento, e também patológicas, como durante a hipertensão arterial, após uma lesão miocárdica ou em decorrência de doença coronariana (5). A *American Heart Association* estabeleceu uma classificação com base na massa do ventrículo esquerdo e no volume diastólico final que enquadra quatro tipos de remodelamento cardíaco: geometria normal (massa normal do ventrículo esquerdo e espessura relativa da parede (ERP) normal), remodelação concêntrica (massa ventricular normal e aumento da ERP), hipertrofia concêntrica (aumento da massa do ventrículo esquerdo e aumento da ERP) e hipertrofia excêntrica (aumento da massa do ventrículo esquerdo e ERP normal) (3, 6).

A hipertensão arterial aumenta a pós-carga cardíaca (tensão necessária ao miocárdio para vencer a resistência arterial (7)) ao promover o remodelamento vascular sistêmico. Isso está associado ao desenvolvimento de hipertrofia concêntrica, caracterizada por cardiomiócitos com sarcômeros organizados em paralelo, o que aumenta a espessura das paredes do ventrículo esquerdo com redução ou não do diâmetro da câmara ventricular (3). Por outro lado, a hipertrofia excêntrica está associada ao aumento da pré-carga (capacidade do ventrículo esquerdo de se alongar no final da diástole (7)) e é caracterizada por cardiomiócitos

com sarcômeros organizados em série, o que promove aumento do comprimento do miócito e leva à dilatação da câmara do ventrículo esquerdo (3).

O diagnóstico clínico de hipertrofia cardíaca compreende a detecção por meio da ecocardiografia ou ressonância magnética nuclear de características morfológicas, como diâmetro das câmaras cardíacas, massa do coração, geometria (espessura da parede ou formato do coração) e presença de fibrose e/ou infiltrado inflamatório. A função cardíaca também pode ser acessada para analisar se a hipertrofia levou à disfunção ou falência. Parâmetros como fração de ejeção e fração de encurtamento são comumente usados (8).

A progressão da hipertrofia cardíaca à falência é acompanhada principalmente de ativação neuro-hormonal, alterações no metabolismo energético cardíaco e no transporte de cálcio, apoptose de cardiomiócitos, estresse oxidativo, intensa fibrose, ativação de células inflamatórias e modificações de proteínas contráteis dos cardiomiócitos (8, 9). Aliada a essas mudanças está a ativação das metaloproteinases de matriz (MMPs), que são enzimas responsáveis pela remodelação tecidual por proteólise de matriz extracelular e de alvos intracelulares (10-13).

As MMPs são um grupo de aproximadamente 28 proteases cálcio e zinco dependentes envolvidas no processo de remodelamento tecidual fisiopatológico e que participam na diferenciação, crescimento e apoptose celular em diferentes tipos de tecido (11, 12). Entre as MMPs, a MMP-2 se destaca no desenvolvimento e progressão de doenças cardiovasculares por ser uma enzima constitutiva das artérias e do coração. Além disso, atua no remodelamento cardiovascular por degradar proteínas importantes da matriz extracelular como o colágeno (14) e também por degradar proteínas intracelulares tanto em células musculares lisas vasculares quanto em cardiomiócitos (15-18). No coração, a MMP-2 é expressa principalmente nos cardiomiócitos e fibroblastos (19, 20).

Todas as MMPs são inicialmente sintetizadas na forma de zimogênios, enzimaticamente inativos. As estruturas das MMPs são semelhantes e consistem em um peptídeo de sinalização na região N-terminal, que permite a secreção da enzima pelo retículo endoplasmático e o transporte para fora da célula. Adjacente ao peptídeo sinalizador, há um domínio pró-peptídico hidrofóbico, que protege a porção catalítica que possui um íon zinco. O sítio catalítico das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) é singular e difere das outras MMPs porque contém três domínios de fibronectina que permitem a clivagem do colágeno tipo IV, da laminina, da elastina e da fibronectina,

entre outras proteínas da matriz extracelular. A região C-terminal de hemopexina é conectada ao sítio catalítico por uma ligação flexível que permite o acoplamento de outras proteínas que podem regular a atividade das MMPs (21, 22).

A MMP-2 pode ser regulada por transcrição gênica; por ativação intracelular através de reações pós translacionais como a S-glutatiolação, fosforilação e/ou glicosilação (19); por ativação extracelular pela ação de proteases (23) e por interação com os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (21, 22). Foram identificados quatro TIMPs, sendo os TIMP-2 e -4 os principais responsáveis pela regulação da MMP-2 no sistema cardiovascular (11, 12). A ativação da MMP-2 requer a dissociação da ligação sulfidrila entre o resíduo de cisteína no domínio pró-peptídico e o íon zinco no sítio catalítico e isto pode ocorrer de maneira proteolítica pela ação de proteases ou não (23). A remoção proteolítica do domínio pró-peptídico resulta na forma extracelular ativa da MMP-2 de 64 kDa (21). A ativação não proteolítica da MMP-2 ocorre após o deslocamento do domínio pró-peptídico por modificações pós translacionais, gerando uma forma intracelular ativa da MMP-2 de 72 kDa (24).

A hipótese de que a MMP-2 pode ser ativada no meio intracelular veio da observação da existência de três tipos de MMP-2 que ficam retidas no citosol de cardiomiócitos: a MMP-2 $_{NTT-50}$ é uma isoforma de MMP-2 que não possui os primeiros 50 aminoácidos do domínio de sinalização N-terminal, a MMP-2 $_{NTT-77}$ é uma isoforma de MMP-2 truncada produzida após estresse oxidativo e a isoforma da MMP-2 canônica cujo domínio N-terminal é ineficiente em direcioná-la para fora da célula. Essa última corresponde à metade de toda MMP-2 que é retida no citosol de cardiomiócitos (25-28).

Entre as vias não proteolíticas de ativação de MMP-2, destaca-se a reação de S-glutatiolação. Esta modificação pós translacional ocorre quando o peroxinitrito, uma espécie reativa de oxigênio e nitrogênio, na presença de glutationa, reage com o resíduo de cisteína do domínio pró-peptídico e quebra sua interação com o íon zinco no sítio catalítico da MMP-2 (24). Essa reação gera uma mudança conformacional que desloca o domínio pró-peptídico da MMP-2 e expõe o seu sítio catalítico, o que resulta em uma forma ativa de MMP-2 de 72 kDa.

O aumento da atividade de MMP-2 no coração pode resultar na degradação de proteínas importantes para a contração e/ou estrutura cardíaca e assim contribuir para a transição da hipertrofia para a falência cardíaca (29). De fato, o aumento da atividade de MMP-2 em corações de ratos espontaneamente hipertensos foi associado à

hipertrofia com consequente falência cardíaca. A MMP-2 contribuiu para a disfunção cardíaca destes ratos hipertensos por degradar colágeno e elastina (14). Além disso, atividade aumentada de MMP-2 foi observada no coração de ratos com hipertensão renovascular e isto foi associado à hipertrofia do ventrículo esquerdo e à disfunção cardíaca (30). O tratamento com inibidores de MMPs reduziu a atividade de MMP-2 e melhorou a hipertrofia cardíaca nestes animais (30). Além disso, o aumento da atividade de MMPs foi relacionado à dilatação do ventrículo esquerdo e à transição para falência cardíaca em ratos obesos espontaneamente hipertensos com falência cardíaca, e o tratamento com um inibidor de MMPs atenuou esse processo (31).

Foi demonstrado em estudos prévios que a MMP-2 pode ser a responsável pela degradação de proteínas importantes do sarcômero dos cardiomiócitos, como a titina (18), a α-actinina (32), a cadeia leve da miosina 1 (33) e a troponina I (17); e também de proteínas que integram o citoesqueleto, como a desmina (32) e a distrofina (34). Durante a hipertrofia concêntrica, os sarcômeros encontram-se organizados em paralelo, o que aumenta a largura dos cardiomiócitos. Tanto as proteínas do citoesqueleto quanto as dos sarcômeros estão mais expressas nos cardiomiócitos para compensar a tensão promovida pelo aumento da pressão arterial na parede ventricular. Porém, à medida que esta tensão persiste, a quantidade de microtúbulos no citoesqueleto aumenta e isso prejudica a função contrátil dos sarcômeros, levando o coração à hipertrofia excêntrica e, consequentemente, à falência cardíaca. Neste contexto, os cardiomiócitos novamente rearranjam sua estrutura de forma a aumentar o seu comprimento e reduzir sua largura, e, assim, permitir o alargamento da câmara ventricular. Observa-se uma perda de proteínas do citoesqueleto e dos sarcômeros, que são organizados em série. Todas essas modificações resultam em redução da função cardíaca e podem levar o coração à falência (35). Logo, a perda de proteínas contráteis e estruturais dos sarcômeros parece ser um mecanismo relevante que leva um coração com hipertrofia concêntrica progredir para hipertrofia excêntrica e falência. Neste estudo, demos ênfase na relação entre MMP-2 com troponina I e distrofina, uma vez que a perda destas proteínas parece estar envolvida na transição de hipertrofia concêntrica para falência cardíaca (36, 37).

A troponina I faz parte de um conjunto de troponinas (composto também pelas troponinas C e T) que se localiza no sarcômero dos cardiomiócitos e que juntas são responsáveis por regular a interação da actina com a miosina durante a contração do coração. Qualquer modificação no complexo troponina pode levar o coração à

disfunção (38). Foi visto que a troponina I é um alvo para a ação proteolítica da MMP-2 *in vitro* e que, após lesão por isquemia e reperfusão, cujo aumento de atividade de MMP-2 foi evidenciado, a troponina I estava menos expressa no coração dos ratos submetidos a este modelo de injúria miocárdica. O tratamento prévio desses animais com um inibidor de MMPs preveniu o aumento de atividade desta protease e, consequentemente, preservou os níveis de troponina I (17). Além disso, a super expressão de MMP-2 no coração de camundongos transgênicos contribuiu para a transição da hipertrofia concêntrica à excêntrica com disfunção cardíaca e isto foi associado à perda de troponina I (37). Entretanto, ainda não foi investigado se a perda de troponina I pode contribuir para a transição do coração para hipertrofia excêntrica e disfunção na hipertensão arterial e se esta perda está associada ao aumento da atividade de MMP-2.

A distrofina é uma proteína importante para a conexão e comunicação do meio extracelular com o intracelular. É uma proteína de alto peso molecular que conecta a membrana plasmática celular ao citoesqueleto de actina e/ou ao sarcômero, sendo responsável por conferir estabilidade estrutural ao cardiomiócito (39). Sua perda leva à redução da permeabilidade da membrana plasmática e desestabiliza os cardiomiócitos, levando o coração à falência (40). De fato, a perda de distrofina foi observada durante a transição entre a hipertrofia concêntrica para a falência cardíaca em um modelo de aumento de pós-carga cardíaca por estenose da aorta (36). Em adição, a perda de distrofina foi associada à atividade proteolítica aumentada da MMP-2 no coração de animais submetidos ao modelo de injúria do miocárdio por isquemia e reperfusão e o tratamento com o inibidor de MMPs foi capaz de atenuar este efeito (34). Entretanto, ainda não se sabe se as MMPs contribuem para a proteólise da distrofina na hipertensão arterial e se isto contribui para a mudança na estrutura cardíaca durante a progressão da hipertrofia concêntrica para a falência cardíaca.

A hipertrofia cardíaca é uma alteração morfofuncional significativa provocada pela hipertensão arterial e pode resultar em falência cardíaca caso não seja tratado. A transição de hipertrofia cardíaca concêntrica à excêntrica associada a falência é acompanhada de alterações estruturais e funcionais dos cardiomiócitos, talvez ocasionadas pela perda de proteínas intracelulares importantes como a troponina I e a distrofina. Foi demonstrado a presença de MMP-2 no interior dos cardiomiócitos e que esta protease pode ser ativada através de uma modificação pós-translacional

associada ao estresse oxidativo. Como a hipertensão arterial é uma patologia intimamente relacionada ao estresse oxidativo e que tanto a perda de troponina I quanto a distrofina foi associada ao aumento de atividade de MMP-2 em modelos de injúria do miocárdio por isquemia e reperfusão, ***a hipótese deste trabalho é que a MMP-2 degrada troponina I e distrofina durante a hipertensão arterial crônica e isto culmina na transição cardíaca de hipertrofia concêntrica para excêntrica.***

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar se a perda de troponina I e distrofina ocorre devido ao aumento da atividade de MMP-2 e se isto contribui para a transição cardíaca de hipertrofia concêntrica para excêntrica durante a hipertensão arterial crônica.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar se o coração transita de hipertrofia concêntrica para excêntrica durante a hipertensão arterial crônica em modelo animal de hipertensão renovascular dois rins-um clipe (2R-1C);
- Observar se esta transição é acompanhada do aumento de atividade de MMP-2;
- Analisar se o estresse oxidativo aumenta a atividade intracelular de MMP-2 por S-glutatiolação em cardiomiócitos;
- Verificar se o aumento da atividade de MMP-2 se relaciona à perda de troponina I e de distrofina;
- Avaliar se o tratamento com um inibidor de MMPs reduz a transição cardíaca de hipertrofia concêntrica para excêntrica e melhora a morfologia e a função do coração dos animais com hipertensão arterial crônica.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aprovação do Protocolo Experimental pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal

Todos os protocolos experimentais estão de acordo com as normas definidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (número de aprovação: 023/2015-1) e com as diretrizes para o cuidado e uso de animais de laboratório publicadas pelo *National Institutes of Health* (NIH) e o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2 Animais

Ratos da linhagem *Wistar* com sete semanas de idade e com peso entre 180 e 200 gramas foram obtidos no biotério do *campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, com ciclo claro/escuro de 12 horas, com 25ºC de temperatura ambiente e com livre acesso à água e à ração. Em média, três animais foram alojados em cada gaiola.

3.3 Modelo de Hipertensão Renovascular Dois Rins-Um clipe (2R-1C)

Os ratos foram anestesiados intraperitonealmente com cetamina (100 mg/kg, Syntec, Brasil) e xilazina (10 mg/kg, Syntec, Brasil) e a indução de hipertensão renovascular foi feita pela inserção de um clipe de prata com abertura de 0,2 mm na artéria renal esquerda do animal (30). Ratos Sham foram submetidos à mesma anestesia e laparotomia, mas sem a inserção do clipe de prata. Flunixina meglumina (1 mL/kg em solução salina 0,9%, Schering-Plough Santé Animale, França) e oxitetraciclina (0,5 mL/kg, Zoetis, Brasil) foram administrados por via subcutânea e intramuscular, respectivamente, para causar analgesia e prevenir infecção após a cirurgia. Este modelo de hipertensão foi escolhido pois causa um aumento de pós-carga cardíaca devido à remodelação arterial. Além disso, foi visto que dez semanas

de hipertensão 2R-1C também levaram a um aumento da atividade cardíaca de MMP-2 e à hipertrofia cardíaca concêntrica (30). Ratos *Wistar* foram utilizados em detrimento de fêmeas pois o estrogênio e a progesterona podem interferir no remodelamento cardíaco provocado pela hipertensão arterial (41). A pressão arterial sistólica foi registrada semanalmente por pletismografia de cauda durante dezesseis semanas e os ratos 2R-1C com pressão arterial sistólica maior ou igual a 180 mmHg na décima semana foram usados neste estudo.

3.4 Delineamento Experimental

Entre a décima à décima sexta semana, ratos Sham e 2R-1C foram tratados com doxiciclina na dose de 15 mg/kg/dia (inibidor de MMPs de amplo espectro sem ação antimicrobiana nesta dose, Pharma Nostra, Brasil) (42) ou veículo (água) por gavagem. A doxiciclina em dose subantimicrobiana é um inibidor de MMPs eficiente com o benefício de poder ser administrado por via oral (43). Foi definido que ratos 2R-1C que apresentaram fração de ejeção acima de 50%, aumento da espessura das paredes anterior e posterior do ventrículo esquerdo na diástole e nenhuma alteração no diâmetro da câmara ventricular esquerda na sístole (todos esses parâmetros em relação aos grupos controles normotensos) tiveram hipertrofia cardíaca do tipo concêntrica (C-LVH). A hipertrofia cardíaca do tipo excêntrica (E-LVH) foi definida em ratos 2R-1C que apresentaram fração de ejeção cardíaca menor ou igual a 50%, com redução da fração de encurtamento e aumento do diâmetro da câmara ventricular esquerda na sístole quando comparados aos grupos controles normotensos. O esquema de divisão dos grupos experimentais está representado na Figura 1. Os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos e tratados. O grupo E-LVH+Doxy não foi incluído nos gráficos e nas análises estatísticas porque este estudo teve como objetivo entender o efeito da inibição de MMPs durante a transição de hipertrofia cardíaca concêntrica para excêntrica e não o seu efeito na hipertrofia cardíaca excêntrica. Além disso, apenas 2 ratos 2R-1C tratados com doxiciclina desenvolveram hipertrofia cardíaca excêntrica, o que inviabiliza a análise deste grupo experimental.

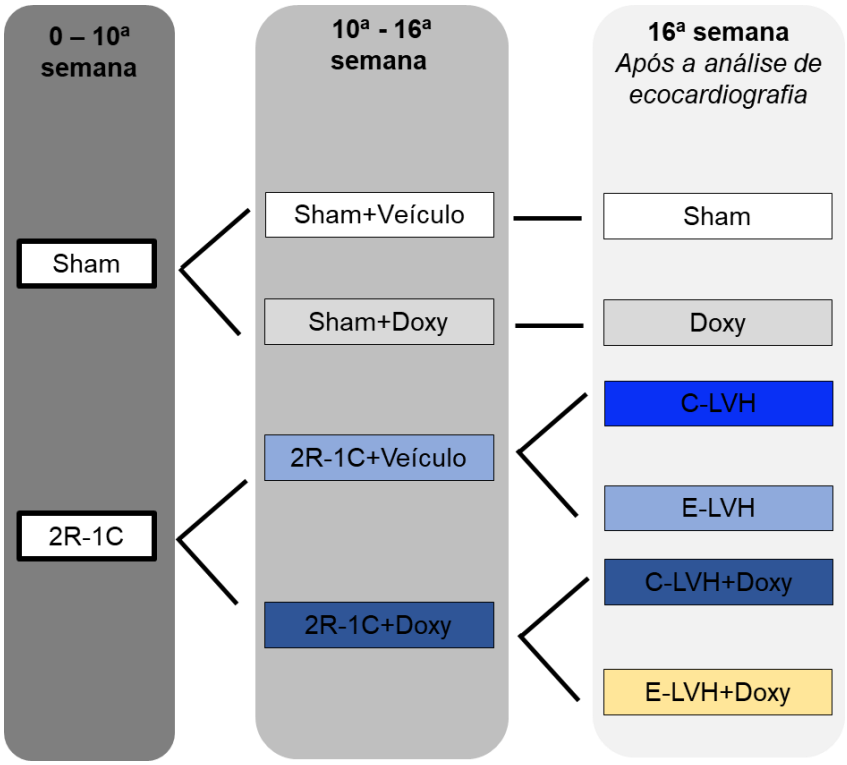


Figura 1 – **Esquema de divisão dos grupos experimentais durante as diferentes fases do protocolo experimental.** Os grupos experimentais estão representados da seguinte maneira: 0-10ª semana - ratos normotensos (Sham) e ratos hipertensos (2R-1C); 10ª-16ª semana - ratos Sham tratados com veículo (Sham+Veículo) ou doxiciclina (Sham+Doxy) e ratos 2R-1C tratados com veículo (2R-1C+Veículo) ou doxiciclina (2R-1C+Doxy); 16ª semana após a análise de ecocardiografia - ratos Sham tratados com veículo (Sham) ou doxiciclina (Doxy), ratos 2R-1C com hipertrofia cardíaca concêntrica tratados com veículo (C-LVH) ou doxiciclina (C-LVH+Doxy) e ratos 2R-1C com hipertrofia cardíaca excêntrica tratados com veículo (E-LVH) ou doxiciclina (E-LVH+Doxy). As cores definidas para os grupos experimentais da 16ª semana nesta figura são as mesmas representadas nas barras dos gráficos.

3.5 Aferição da Pressão Arterial Sistólica por Pletismografia de Cauda

Os animais foram contidos e mantidos em uma plataforma aquecida a 37ºC. Um transdutor foi acoplado à cauda e conectado a um sistema de aquisição de dados de pressão arterial (CODA V.1.1 2007, Kent Scientific, EUA). Após um período de aclimatação de aproximadamente 30 minutos, pelo menos três medidas consecutivas da pressão arterial sistólica foram utilizadas para calcular uma média. A pressão arterial sistólica foi medida antes da cirurgia 2R-1C/Sham e semanalmente até a décima sexta semana experimental. Os animais foram previamente habituados aos

contensores para reduzir a resposta de estresse durante o procedimento de aferição da pressão arterial.

3.6 Avaliação da Estrutura e Função Cardíaca por Ecocardiografia

A morfologia e os parâmetros funcionais cardíacos foram analisados antes da cirurgia 2R-1C/Sham, dez e dezesseis semanas após a cirurgia por ecocardiografia *Doppler* (Vevo 2100 System, Visual Sonics, Canadá) com uma sonda de 21 MHz. Os ratos foram anestesiados com isoflurano vaporizado (3,5% para indução e depois 1-2% durante a análise) e colocados em uma placa aquecida (37-40ºC) com as patas conectadas a eletrodos e posicionadas em decúbito dorsal para detecção da frequência cardíaca e aquisição de imagem em modo M bidimensional. A espessura das paredes posterior e anterior do ventrículo esquerdo, o diâmetro interno da câmara ventricular esquerda, as frações de ejeção e de encurtamento e o débito e a frequência cardíaca foram medidos durante a sístole e a diástole off-line, a partir de imagens paraesternais no eixo longo, usando a estação de trabalho *Vevo 2100*.

3.7 Aquisição e Processamento das Amostras de Ventrículo Esquerdo

Os ratos foram anestesiados intraperitonealmente com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e eutanasiados por incisão abdominal e torácica. O coração foi removido e perfundido através da aorta com solução de Krebs (em mM: 118 NaCl; 4,7 KCl; 1,2 KH_2PO_4; 1,6 $MgSO_4.7H_2O$; 24,9 $NaHCO_3$; 11,1 glicose e 2,5 $CaCl_2.2H_2O$). Uma solução de KCl 1M foi usada para parar o coração em diástole. O ventrículo esquerdo foi isolado e congelado em nitrogênio líquido e mantido a -70ºC para análises bioquímicas. Um pedaço de ventrículo esquerdo também foi inserido em *Tissue-Tek OCT* (Sakura Finetek, EUA) para a realização de imunofluorescência e zimografia *in situ*. O restante do coração foi fixado em formaldeído 10% tamponado com 25,6 mM de fosfato de sódio monobásico e 45,8 mM de fosfato de sódio dibásico (pH 7) por 48 horas para análise histológica.

3.8 Avaliação da Deposição de Colágeno e Morfologia dos Cardiomiócitos

Os corações fixados previamente em solução de formaldeído 10% tamponado foram desidratados em etanol 70% e incluídos em parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram corados com *Picrosirius Red* e hematoxilina e eosina para determinar a deposição de colágeno e a morfologia dos cardiomiócitos, respectivamente. As imagens da parede posterior do ventrículo esquerdo foram capturadas em um aumento de 200x usando o campo claro do microscópio (Leica Camera, Alemanha e Carl Zeiss Microscopy, Alemanha). A quantificação da deposição de colágeno foi realizada pelo cálculo da média aritmética da porcentagem de limiar (*threshold*) vermelho calculado pelo *software Image J* (NIH, EUA) de cinco imagens de cada amostra. A morfologia dos cardiomiócitos foi analisada pelo cálculo da média aritmética da área transversal de pelo menos 50 cardiomiócitos de cada amostra utilizando o *Image J*.

3.9 Detecção da Atividade Gelatinolítica de MMP-2 por Zimografia em Gel e Zimografia in situ

As amostras de ventrículo esquerdo congeladas a -70ºC foram suavemente trituradas em um homogeneizador de vidro resfriado. Um tampão de extração de proteínas contendo um coquetel de inibidores de protease (#S8820, Sigma-Aldrich, EUA), 1 mM de ortovanadato de sódio (#S6508, Sigma-Aldrich, EUA) e 10 mM fluoreto de sódio (#201154, Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão RIPA (#R0278, Sigma-Aldrich, EUA) foi usado para homogeneizar as amostras. Após 12 horas a 4ºC, os homogenatos foram centrifugados a 15.300 x *g* por 20 minutos a 4ºC e o sobrenadante foi utilizado para as análises de western blot e zimografia em gel. O reagente de *Bradford* (#B6916, Sigma-Aldrich, EUA) foi usado para quantificar a concentração proteica dos extratos.

Para avaliar a atividade de MMP-2, os extratos de ventrículo esquerdo (60 µg de proteínas para cada amostra) foram misturados em tampão não redutor (0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 30% de glicerol, 10% de dodecil sulfato de sódio e 0,179 mM de azul de bromofenol), carregados em um gel de 8% de poliacrilamida copolimerizado com gelatina e submetidos à eletroforese. Os géis foram imersos duas vezes em uma

solução de 2,5% v / v de Triton X-100 por 30 minutos cada a temperatura ambiente e, em seguida, foram incubados com um tampão ativador de MMPs (150 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$.$2H_2O$, 50 mM Tris, pH 7,6) por 16 horas a 37°C em estufa. Os géis foram então corados com uma solução de 0,05% de *Coommassie Blue G-250* diluída em 25% de metanol e 10% de ácido acético e depois descorados com uma solução de 30% de metanol e 10% de ácido acético. A marcação para MMP-2 foi detectada como uma banda clara que contrastava com o fundo corado em azul na altura de 72 kDa. Estas bandas foram quantificadas por *Image J* e normalizadas pelo soro fetal bovino aplicado no início do gel (controle positivo para MMP-2 e MMP-9).

Para analisar a atividade gelatinolítica *in situ* de MMPs, os cortes de 5 µm de espessura de ventrículo esquerdo previamente incluído em *Tissue-Tek OCT* (Sakura Finetek, EUA) foram hidratados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) por 10 minutos. As seções foram incubadas com gelatina acoplada à um fluoróforo (*Dq Gelatin*, 1 mg/mL, #D12054, ThermoFisher, EUA) diluída na proporção de 1:10 em um tampão ativador de MMPs (150 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$.$2H_2O$, 50 mM Tris, pH 7,6) e foram mantidas em uma câmara escura e úmida por 1 hora a 37ºC. Os cortes de ventrículo esquerdo foram então fixados com paraformaldeído a 4% durante 20 minutos, lavados com PBS e rapidamente expostos ao DAPI, um marcador nuclear. As imagens foram capturadas em aumento de 400x com um microscópio de fluorescência (Leica TCS SPE, Alemanha). A fluorescência verde que representa a atividade gelatinolítica de MMP-2 e -9 foi quantificada por *Image J*. A média aritmética da intensidade de três diferentes áreas fluorescentes foi calculada para cada amostra. Os controles negativos foram feitos incubando as seções apenas com PBS (nenhuma fluorescência foi observada). As imagens representativas foram obtidas incubando os cortes de ventrículo esquerdo com o marcador de membrana *Wheat Germ Agglutinin* (WGA) *Texas Red-X Conjugated* (diluição 1:500, #W21405, Invitrogen, EUA) por 1 hora. O marcador de membrana WGA foi usado para delimitar a membrana dos cardiomiócitos e facilitar a observação da atividade gelatinolítica intracelular.

3.10 Western Blot para Detectar a Expressão de MMP-2, MMP-9, Troponina I, Distrofina, TIMP-2 e TIMP-4 em Amostras de Ventrículo Esquerdo

Extratos de ventrículo esquerdo (60 µg de proteína para cada amostra) foram misturados a um tampão redutor (0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 30% de glicerol, 0,6 M DTT, 10% de dodecil sulfato de sódio e 0,179 mM de azul de bromofenol), aquecidos por 5 minutos a 95ºC e carregados em géis de 12% de poliacrilamida. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, Alemanha) usando um aparelho de transferência úmida (#TE22 Mini Tank Transfer Unit, GE Healthcare, Germany) a 100 V por 1 hora e 15 minutos. As membranas foram bloqueadas por 2 horas com uma solução de 5% de leite diluído em solução salina tamponada com Tris e Tween 20 (TBS-T) e incubadas por 16 horas a 4ºC com os seguintes anticorpos primários: *mouse* anti-MMP-2 (1:5.000, #MAB3308, Millipore, EUA), *mouse* anti-troponina I (1:10.000, #MA-1040, IPOCdx, Canadá), *mouse* anti-TIMP-2 (1:5.000, #MAB13446, Millipore, EUA), *rabbit* anti-TIMP-4 (1:5.000, #ab58425, Abcam, EUA), *rabbit* anti-MMP-9 (1:5.000, #ab137867, Abcam, EUA) e *rabbit* anti-proteína ribossomal S6 (1:5.000, #2217, Cell Signaling, EUA).

Para a distrofina, os extratos de ventrículo esquerdo (80 µg de proteína para cada amostra) foram misturados ao mesmo tampão redutor acima citado, aquecidos por 5 minutos a 95ºC e carregados em géis de 6% de poliacrilamida. A eletroforese foi realizada a 10 V por 27 horas. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, Alemanha) usando um aparelho de transferência úmida (#TE22 Mini Tank Transfer Unit, GE Healthcare, Germany) a 100 V por 2 horas. As membranas foram bloqueadas por 16 horas com solução de 5% de leite diluído em TBS-T e incubadas por 2 horas a 4ºC com anticorpo *rabbit* anti-distrofina (1:2.000, #sc-15376, Santa Cruz Biotechnology, EUA).

Em seguida, todas as membranas foram incubadas com seus respectivos anticorpos secundários (1:10.000, #12-349 ou #12-348, Millipore, EUA) por 1 hora a temperatura ambiente. As bandas foram visualizadas por quimioluminescência (#32106, ThermoFisher Scientific, EUA) com o fotodocumentador *Amersham Imager 600* (GE Healthcare, Alemanha). As intensidades de quimioluminescência de cada banda, incluindo os produtos de degradação da troponina I, foram quantificadas usando *Image J*.

3.11 Imunofluorescência para Detectar a Expressão de Distrofina

Cortes de 5 µm de espessura de ventrículo esquerdo previamente incluído em *Tissue-Tek OCT* (Sakura Finetek, EUA) foram fixados com acetona fria por 5 minutos, lavadas com PBS 0,1 M e Triton X-100 0,03% v/v, pH 7,3. Após 1 hora de bloqueio com solução de 10% de *donkey serum* (#S-30, Millipore, EUA), as secções foram incubadas em uma câmara umidificada com anticorpo *rabbit* anti-distrofina (1:50; # sc-15376, Santa Cruz Biotechnology, EUA) por 1 hora a temperatura ambiente. Os cortes foram lavados com PBS 0,1 M e Triton X-100 0,03% v/v, pH 7,3 e incubados por 1 hora com o anticorpo secundário anti-*rabbit* Alexa 488 (1:100, #A21206, Life Technologies, EUA) e com o marcador de membrana WGA (1:500, # W21405, Invitrogen, EUA), seguido pelo marcador de núcleo DAPI. As imagens foram capturadas em aumento de 400x por um microscópio de fluorescência (Leica TCS SPE, Alemanha). A distrofina foi identificada no ventrículo esquerdo como uma fluorescência verde e foi quantificada por *Image J*. Como controles negativos, as secções de ventrículo esquerdo foram incubadas com PBS ou com anticorpos secundários (nenhuma fluorescência foi observada).

3.12 Microscopia Confocal para Colocalizar MMP-2 com Troponina I e Distrofina no Ventrículo Esquerdo

Cortes de 5 µm de espessura de ventrículo esquerdo previamente incluído em *Tissue-Tek OCT* (Sakura Finetek, EUA) foram fixados com paraformaldeído 4% v/v durante 15 minutos e incubados com um tampão de bloqueio (1% m/v de soro de albumina bovina, 0,3 M de glicina e 0,1% v/v PBS-Tween) durante 1 hora. Os seguintes anticorpos primários foram então usados juntos por 16 horas a 4°C: *mouse* anti-MMP-2 (1:200, #MAB3308, Millipore, EUA) e *rabbit* anti-troponina I (1: 150, #ab47003, Abcam, EUA) ou *mouse* anti-MMP-2 (1:200, #MAB3308, Millipore, EUA) e *rabbit* anti-distrofina (1:50; #sc-15376, Santa Cruz Biotechnology, USA). Os anticorpos secundários foram incubados juntos por 1 hora em temperatura ambiente: *rabbit* anti-FITC (1:250; #FI-1000, Vector Laboratories, EUA) e *mouse* anti-Cy3 (1:250; # AP192C, Millipore, EUA). *Fluoroshield* com DAPI (# F6057, Sigma-Aldrich, EUA) foi usado para corar os núcleos dos cardiomiócitos por 12 horas a 4°C. As secções foram seladas com verniz incolor livre de formaldeído e mantidas a 4ºC até a completa secagem. O controle negativo foi realizado incubando as secções com os anticorpos

secundários anti-FITC e anti-Cy3 e com o *Fluoroshield* com DAPI. Apenas a fluorescência do DAPI foi observada no controle negativo.

As imagens foram adquiridas em aumento de 630x usando microscopia confocal (Leica TSC SPE, Alemanha). O software *Leica Application Suite Advanced Fluorescence Lite 2.3.0* (Leica Microsystems, Alemanha) foi usado para capturar imagens simples e mescladas no modo TCS SPE xyz, com frequência de 400Hz e formato 1024x1024 (argônio 488 nm, diodo 405 nm e HeNe 532 nm). A co-localização da troponina I e MMP-2 ou da distrofina e MMP-2 foi analisada pelo coeficiente de Mander (Coloc 2, *software* FIJI, NIH, EUA). Cada área da imagem foi usada para obter o coeficiente de divisão de Mander para o canal (M1 e M2). Os coeficientes mostram a porcentagem de fluorescência vermelha que compartilha a mesma localização com a fluorescência verde.

3.13 Análise de Espectrometria de Massas de Troponina I em Extratos de Ventrículo Esquerdo

As bandas de troponina I íntegra de 30 kDa e do produto de degradação de aproximadamente 20 kDa foram extraídas do gel de 12% de poliacrilamida após a eletroforese, reduzidas, alquiladas, digeridas com 10 ng/µL de tripsina pancreática suína (Promega, EUA) e analisadas por *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI) com analisador *time of flight* (TOF) (ultrafleXtreme, Bruker Corporation, USA) com o *software flexControl 4.0* (Bruker Corporation, USA) para aquisição de dados. O *ultrafleXtreme* foi calibrado com uma mistura de peptídeos (Peptide Calibration Standard II, ~ 700-3500 Da, #8222570, Bruker Corporation, EUA). Os parâmetros usados para obter os dados foram 1.500 disparos de laser por espectro, frequência de laser de 1000 Hz e o instrumento operando em modo refletor positivo, dentro de uma faixa de 700 a 5000 Da. Como matriz, uma solução saturada de matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico foi preparada em acetonitrila (ACN) e 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) na proporção de 1:1 (v/v). A análise dos dados foi realizada através dos *softwares Flex Analysis 3.4* (Bruker Corporation, EUA), *BioTools 3.2* (Bruker Corporation, EUA) e *Sequence Editor 3.2* (Bruker Corporation, EUA). Os peptídeos digeridos também foram submetidos à fragmentação MS/MS com o mesmo instrumento e *software* para aquisição de dados. O *ultrafleXtreme* foi operado no modo

MS/MS e os espectros MS/MS foram interpretados com o mesmo *software* usado para a análise de dados. Os seguintes resultados foram considerados nas análises: a tolerância de erro de MS/MS foi definida em 1,5 Da; a carbamidometil cisteína foi modificada; a oxidação de metionina e fosforilação de treonina foram modificações variáveis; e três clivagens por peptídeo foram perdidas.

3.14 Predição *in silico* de Locais de Clivagem de MMP-2 na Distrofina de Rato

A sequência de aminoácidos da distrofina de rato (UniProtKB- P11530) foi recuperada da base de dados *Uniprot* (https://uniprot.org) e submetida a análise por *CleavPredict* (http://cleavpredict.sanfordburnham.org/) (44) para prever os possíveis locais de clivagem de MMP-2 na estrutura da distrofina de rato. Esse processo gerou uma lista de locais de clivagem e uma lista de possíveis tamanhos de fragmentos da proteína gerados após a clivagem com base no algoritmo da matriz de posição de peso (*position weight matrix*, PWM). O *CleavPredict* também considera as estruturas secundárias e as regiões desordenadas de proteínas para fazer suas previsões. Atualmente, não há uma estrutura 3D dos domínios de repetição do tipo espectrina da distrofina de rato disponível no banco de dados *Protein* (www.rcsb.org) (45). A estrutura 3D do domínio espectrina 1 da distrofina de rato foi moldada por modelagem de homologia usando *Swiss-MODEL* (46) com o modelo de espectrina 1 da distrofina humana (UniProtKB-P11532) que mostrou 86,8% de homologia com o domínio espectrina 1 da distrofina de rato. A estrutura refinada, feita com o *software KobaMIN* (47), foi finalmente avaliada e verificada pelo *Structural Analysis and Verification Server (SAVES)* (48). O *software Pymol v 2.1.1* foi usado para visualizar e gerar uma estrutura 3D do domínio espectrina 1 da distrofina de rato. Múltiplos alinhamentos de sequência entre a distrofina de rato e humana foram realizados usando *Clustal Omega* (49) e *ESPript 3.0* (http://espript.ibcp.fr) (50).

3.15 Experimentos em Cultura de Cardiomiócitos AC16

3.15.1 Delineamento Experimental

Para avaliar a ativação de MMP-2 por S-glutatiolação via estresse oxidativo, cardiomiócitos da linhagem imortalizada AC16 foram incubados com: veículo, duas diferentes concentrações de angiotensina II (0,1 e 1 µM) e duas diferentes concentrações de fenilefrina (10 e 50 µM). Após definir o estímulo padrão como fenilefrina 10 µM, foi verificado se o tratamento com os antioxidantes tempol ou glutaredoxina poderia reduzir a ativação de MMP-2 por S-glutatiolação. Os cardiomiócitos foram então incubados com fenilefrina 10 µM e tempol 10 µM ou foram transfectados com a enzima glutaredoxina antes do estímulo com fenilefrina 10 µM.

3.15.2 Cultura de Células

Cardiomiócitos da linhagem AC16 foram descongelados e incubados em estufa oxigenada a 37ºC com meio de cultura DMEM com 15 mM de HEPES e 15mM de bicarbonato de sódio (#D6434, Sigma Aldrich, EUA) e suplementado com 1% de antibióticos (penicilina e streptomicina, #15240-062, Gibco, EUA), 12,5% de soro fetal bovino (#S11150, Atlanta Biologicals, EUA) e 1x L-glutamina (#35050-061, Gibco, EUA). Após a cultura atingir 50% de confluência, os cardiomiócitos tiveram o meio de cultura trocado por um meio sem suplementação de soro fetal bovino e foram mantidos nessa nova condição em estufa oxigenada a 37ºC por 5 horas. Em seguida, adicionou-se às placas de cultura: veículo (PBS), angiotensina II (0,1 ou 1 µM, # A9525, Sigma Aldrich, EUA), fenilefrina (10 ou 50 µM, #P6126, Sigma Aldrich, EUA) e/ou tempol (10 µM, #176141, Sigma Aldrich, EUA) e os estímulos ficaram por 24 horas. Para o estudo com a glutaredoxina, os cardiomiócitos foram transfectados com glutaredoxina e em seguida foram estimulados com fenilefrina 10 µM por 24 horas.

Depois dos estímulos, o meio de cultura doi descartado e os cardiomiócitos foram retirados da placa de cultura e lisados com tampão de extração de proteínas contendo um coquetel de inibidores de protease (#11836170001, Sigma-Aldrich, EUA), 1 mM de ortovanadato de sódio (#S6508, Sigma-Aldrich, EUA) e 10 mM fluoreto de sódio (#201154, Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão RIPA (#R0278, Sigma-Aldrich, EUA). Este extrato foi utilizado para a análise da expressão de MMP-2 por western blot.

3.15.3 Análise de Estresse Oxidativo por Sonda CM-H2DCFDA

O CM-H2DCFDA é um derivado de clorometil do H2DCFDA, útil como um indicador para espécies reativas de oxigênio nas células. O CM-H2DCFDA difunde-se passivamente nas células, onde seus grupos acetato são clivados por esterases intracelulares e seu grupo clorometil reativo a tiol reage com glutationa intracelular e outros tióis. A oxidação subsequente gera um produto fluorescente que fica preso dentro da célula, ou seja, quanto mais intensidade de fluorescência, maior a presença de espécies reativas de oxigênio.

Os cardiomiócitos AC16 foram plaqueados em placa de 96 poços conforme descrito previamente. Em um tubo *eppendorf*, 8,7 µL de sonda CM-H2DCFDA previamente diluída em DMSO (#C6827, Life Technologies, EUA) foi adicionada a 1,5 mL de meio de cultura DMEM sem suplementação de soro fetal bovino de modo que a sua concentração ficou em 1,73 mM. Em seguida, o meio de cultura dos cardiomiócitos foi trocado por este com a sonda e as células ficaram incubadas em estufa oxigenada a 37ºC por 30 minutos. O meio de cultura foi novamente trocado por um fresco, sem a sonda, e os estímulos de angiotensina II (0,1 e 1 µM) e fenilefrina (10 e 50 µM) foram adicionados à placa de cultura e deixados por 24 horas. Depois disso, as placas foram levadas para a análise em um espectrofotômetro acoplado a um fluorímetro para que a intensidade de fluorescência pudesse ser capturada e quantificada.

3.15.4 Western Blot para MMP-2

Os extratos de cardiomiócitos AC16 (20 µg de proteínas para cada amostra) foram misturados à um tampão redutor (#NP0007, Novex by Life Technologies, EUA) e submetidos à eletroforese a 100V por 2 horas em géis de gradiente de poliacrilamida (#NP0335BOX, Invitrogen, EUA). As proteínas foram tranferidas para uma membrana de PVDF (#88520, Thermo Scientific, EUA) e bloqueadas com leite a 5% diluído em TBS-T por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, os anticorpos *rabbit* anti-MMP-2 (1:2.000, #ab181286, Abcam, EUA) ou *rabbit* anti-GAPDH (*loading control*,1:1.000, #2218, Cell Signaling, EUA) diluídos em leite 5% foram adicionados às membranas e deixados por 12 horas. O anticorpo secundário anti-*rabbit* (1:10.000, #R1006, Kindle

Biosciences, EUA) diluído em leite 5% foi adicionado às membranas e deixado por 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram então incubadas com kit de quimioluminescência (#R1002, Kindle Biosciences, EUA) e analisadas com o auxílio de um fotodocumentador. As intensidades de quimioluminescência de cada banda foram quantificadas usando *Image J*.

3.15.5 Ensaio de Biotin Switch pra Avaliar a S-glutatiolação de MMP-2

O ensaio de *Biotin Switch* é usado para avaliar se uma determinada proteína sofreu algum tipo de modificação, como glutatiolação ou nitrosilação, por exemplo. O ensaio foi feito seguindo as etapas: 1- alquilação dos grupos tióis livres da proteína de interesse; 2 - remoção do agente alquilante; 3 - redução dos grupos tióis oxidados; 4 - adição de um agente alquilante acoplado à biotina que alquila os tióis previamente reduzidos; 5 – adição de streptavidina, que se liga à biotina e forma um complexo detectável por western blot e 6 – visualização da proteína modificada por western blot.

As amostras de cardiomiócitos AC16 estimulados com fenilefrina (10 µM), veículo (PBS) e/ou tempol (10 µM) foram submetidos ao ensaio de *Biotin Switch* seguido de western blot com marcação para MMP-2 para avaliar a presença de S-glutatiolação. Além disso, amostras de cardiomiócitos AC16 transfectadas ou não com glutaredoxina foram incubadas com fenilefrina (10 µM) ou veículo (PBS) e também foram analisadas por *Biotin Switch* seguido de western blot com marcação para MMP-2 para também avaliar a presença de S-glutatiolação.

3.16 Análise Estatística

Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias ou teste *t* não-pareado com *GraphPad Prism 6.01* (GraphPad Software, EUA). O teste *t* não-pareado foi usado unicamente para comparar os grupos C-LVH e E-LVH uma vez que C-LVH é considerado um controle para o grupo E-LVH. O teste *t* não-pareado também foi usado na análise do experimento de estresse oxidativo com cardiomiócitos. Valores estatisticamente significantes foram considerados como $p<0,05$. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM).

Resultados

4 RESULTADOS

Todos os animais 2R-1C tiveram o registro de pressão arterial sistólica aumentado em comparação aos animais dos grupos controle Sham e Doxy em 16 semanas de hipertensão renovascular (p<0,05, Figura 2A). Este aumento de pressão arterial sistólica iniciou após uma semana da cirurgia 2R-1C e se manteve até o fim do protocolo experimental. Em 16 semanas de hipertensão renovascular, nenhuma diferença estatística na pressão arterial sistólica entre os grupos C-LVH, E-LVH ou C-LVH+Doxy foi observada (p>0,05, Figura 2B). Embora o peso corporal de todos os animais hipertensos tenha sido menor quando comparado aos grupos normotensos ao final do protocolo experimental (p<0,05, Figura 2C), a razão entre o peso do coração e o peso corporal destes animais aumentou (p<0,05 vs. Sham e Doxy, Figura 2D), indicando que os corações de todos os animais 2R-1C estavam hipertrofiados em 16 semanas de hipertensão renovascular.

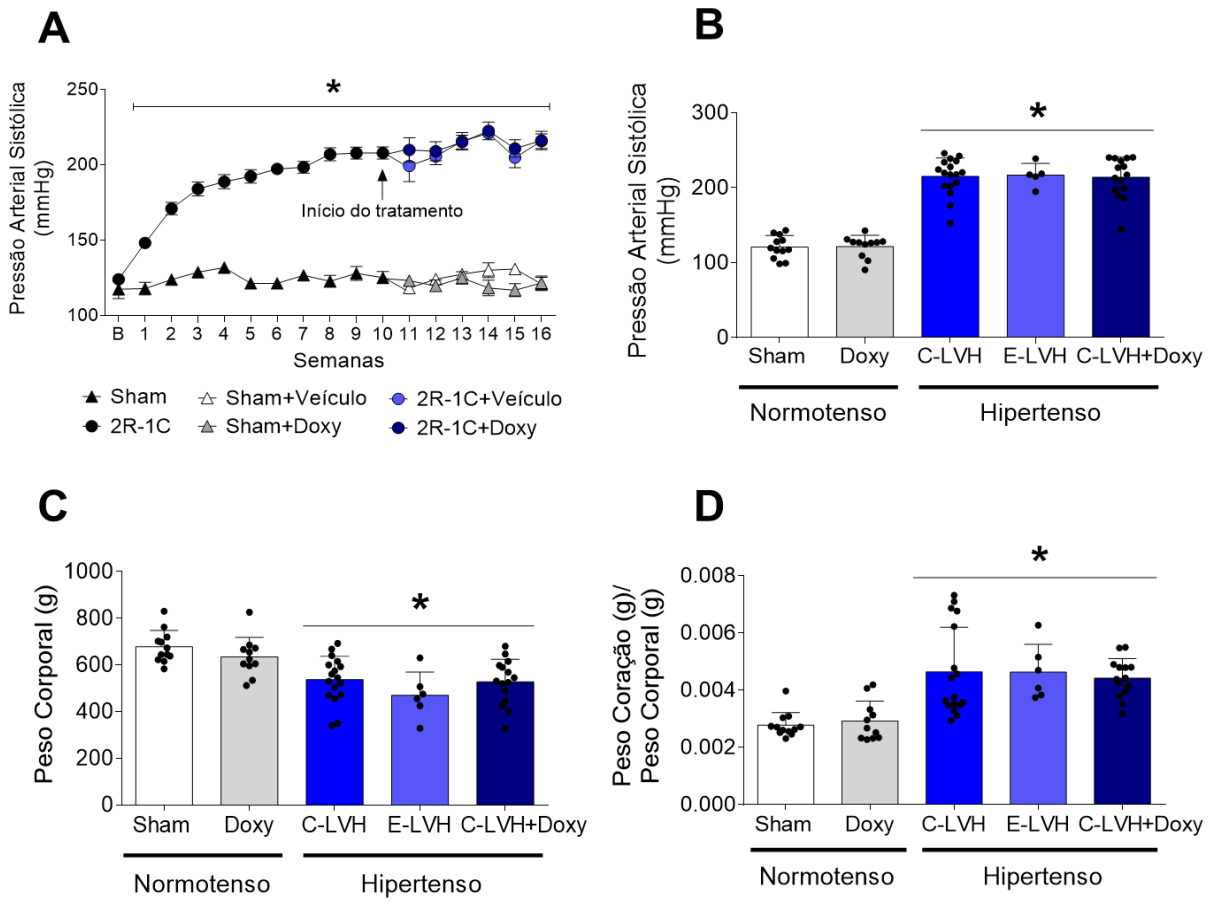


Figura 2 – Efeito da inibição de MMPs na pressão arterial sistólica, peso corporal e peso do coração dos animais em 16 semanas de hipertensão renovascular. Representação

gráfica dos registros de pressão arterial sistólica durante (A) e ao final (B) do protocolo experimental, peso corporal dos animais (C) e razão entre o peso do coração e o peso corporal (D). *p<0,05 vs. grupos controle Sham e Doxy. n=6-46. Os dados são mostrados como média ± EPM.

Antes de iniciar o tratamento com doxiciclina na décima semana de hipertensão renovascular, foi feita a análise morfofuncional do coração dos animais 2R-1C e Sham por ecocardiografia. A maioria dos animais 2R-1C apresentavam hipertrofia cardíaca do tipo concêntrica, caracterizada pelo aumento da espessura das paredes posterior e anterior do ventrículo esquerdo na diástole e pela não alteração do diâmetro da câmara ventricular esquerda durante a sístole, quando comparados aos grupos controle (p<0,05, Figura 3). Além disso, a maior parte desses animais também não teve alteração significativa na função cardíaca, uma vez que tanto a fração de ejeção quanto a de encurtamento se mantiveram semelhantes aos grupos controle (p>0,05, Figura 3). Em seguida, todos os animais foram divididos nos seguintes grupos: animais normotensos tratados com veículo (Sham), animais normotensos tratados com doxiciclina na dose de 15 mg/kg/dia (Doxy), animais hipertensos tratados com veículo (2R-1C+veículo) e animais hipertensos tratados com doxiciclina na dose de 15 mg/kg/dia (2R-1C+doxy) (Figura 1). O tratamento com veículo e doxiciclina seguiu por seis semanas até a eutanásia dos animais ao fim das 16 semanas de protocolo experimental.

Ao fim do experimento, todos os animais foram novamente submetidos à análise morfofuncional do coração por ecocardiografia e os animais hipertensos foram realocados em novos grupos experimentais de acordo com o tipo de hipertrofia cardíaca que desenvolveram. Os animais hipertensos com hipertrofia cardíaca do tipo concêntrica tratados com veículo foram chamados de grupo C-LVH e os tratados com doxiciclina foram assinalados como grupo C-LVH+Doxy. Já os animais hipertensos com hipertrofia cardíaca do tipo excêntrica tratados com veículo foram classificados como grupo E-LVH e os tratados com doxiciclina foram chamados de grupo E-LVH+Doxy, como pode ser visto na Figura 1. A hipertrofia excêntrica foi caracterizada pela redução da espessura das paredes anterior e posterior na sístole, pelo alargamento da câmara ventricular esquerda na sístole e pela perda de função cardíaca por redução das frações de ejeção e de encurtamento e do débito cardíaco.

Cerca de 25% (6 de 23) dos animais hipertensos tratados com veículo desenvolveram hipertrofia cardíaca excêntrica até 16 semanas de hipertensão renovascular. Já entre os animais hipertensos que foram tratados com doxiciclina, aproximadamente 11% (2 de 18) desenvolveram hipertrofia cardíaca excêntrica (grupo E-LVH+Doxy, não representado). Mesmo não reduzindo a pressão arterial sistólica destes animais (Figuras 2A e 2B), o tratamento com doxiciclina diminuiu a quantidade de animais que transitaram para este tipo de hipertrofia, o que fortalece a hipótese de que a inibição da atividade de MMPs pode ser um aliado importante ao tratamento anti-hipertensivo para evitar a perda de função cardíaca em pacientes com hipertensão arterial.

De fato, o grupo C-LVH apresentou aumento da espessura das paredes anterior e posterior do ventrículo esquerdo e não alteração no diâmetro da câmara ventricular esquerda, tanto na sístole quanto na diástole, quando comparado aos grupos controle Sham e Doxy ($p<0,05$, Figuras 3A, 3B, 3C e 3D e Tabela 1). Além disso, o grupo C-LVH manteve uma função cardíaca regular, caracterizada por frações de ejeção e encurtamento semelhantes aos grupos Sham e Doxy ($p>0,05$, Figuras 3E e 3F) mas com uma discreta redução no débito cardíaco ($p<0,05$, Tabela 1). O tratamento com doxiciclina não reverteu nenhum destes parâmetros morfofuncionais ($p>0,05$, Figura 3), exceto o débito cardíaco ($p<0,05$ vs. C-LVH, Tabela 1). Por sua vez, o grupo E-LVH registrou redução da espessura das paredes anterior e posterior do ventrículo esquerdo na sístole ($p<0,05$ vs. C-LVH, Tabela 1), aumento do diâmetro da câmara ventricular esquerda na sístole ($p<0,05$ vs. todos os grupos, Figuras 3A e 3D) e redução das frações de ejeção e de encurtamento ($p<0,05$ vs. todos os grupos, Figuras 3E e 3F) e do débito cardíaco ($p<0,05$ vs. todos os grupos, Tabela 1). Nenhuma alteração na frequência cardíaca foi observada entre todos os grupos ($p>0,05$, Tabela 1).

A análise morfológica do coração por coloração hematoxilina e eosina feita após a eutanásia dos animais confirmou os achados da ecocardiografia, como pode ser visto na primeira sequência de fotos da Figura 4A. O estudo da morfologia dos cardiomiócitos mostrou um perfil característico para cada tipo de hipertrofia cardíaca. Os cardiomiócitos do grupo C-LVH têm uma área maior quando comparado aos controles ($p<0,05$ vs. Sham e Doxy, Figuras 4A e 4B), o que pode caracterizar a organização em série dos sarcômeros.

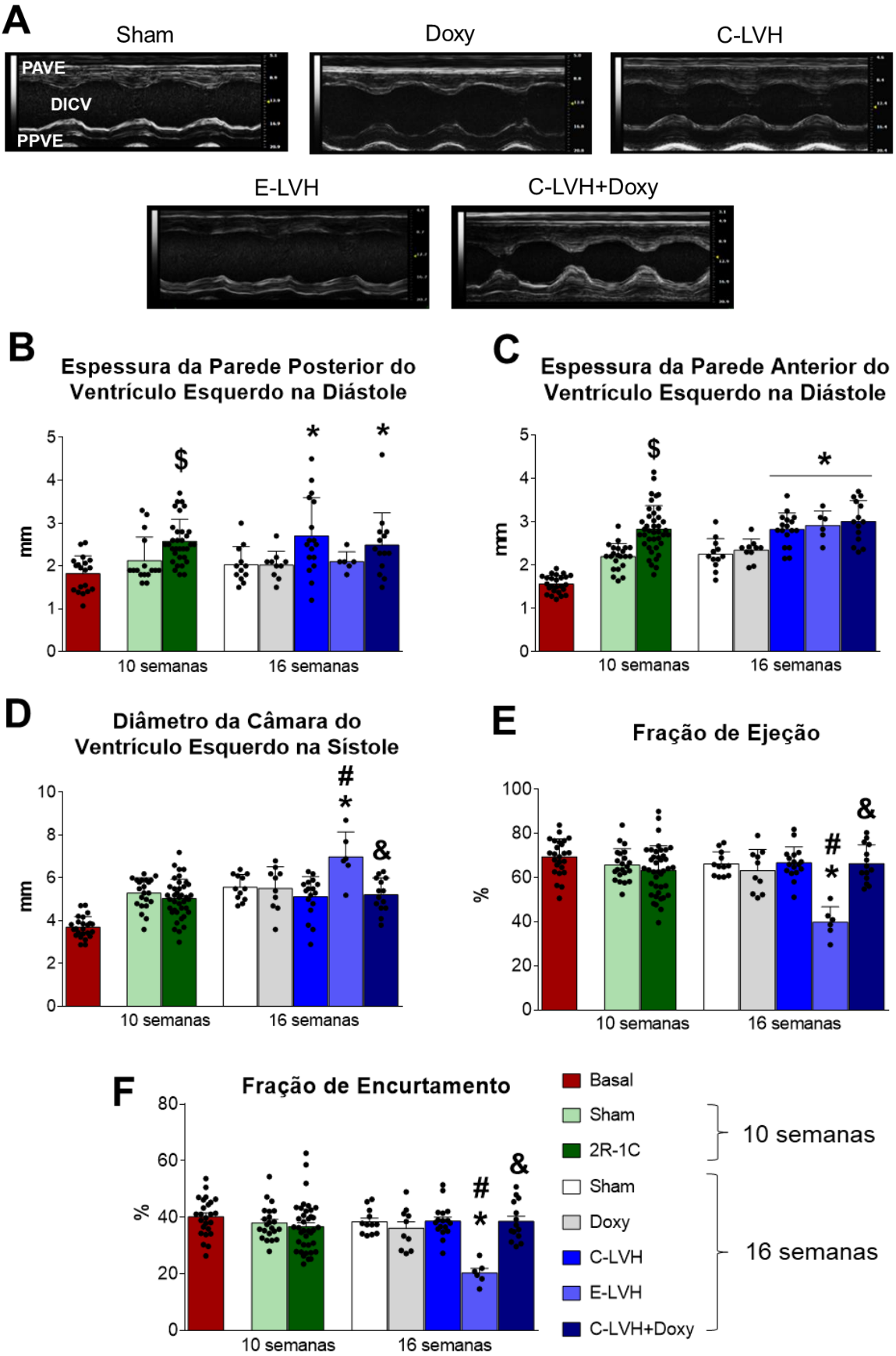


Figura 3 – **Efeito da inibição de MMPs na morfologia e função cardíaca em 16 semanas de hipertensão renovascular.** (A) Imagens representativas dos registros de ecocardiografia em modo M do ventrículo esquerdo - PPVE: Parede posterior do ventrículo esquerdo; DICV:

Diâmetro interno do ventrículo esquerdo; PAVE: Parede anterior do ventrículo esquerdo. Os gráficos mostram a quantificação da espessura das paredes posterior (B) e anterior (C) do ventrículo esquerdo na diástole, o diâmetro da câmara interna do ventrículo esquerdo na sístole (D), a fração de ejeção (E) e a fração de encurtamento (F) no início do protocolo experimental (barras em vermelho, basal), após 10 semanas de hipertensão renovascular (barras em verde, 10 semanas) e no final do protocolo experimental (barras em branco, cinza e azul, 16 semanas). $ p<0,05 vs. Sham em 10 semanas por teste *t* não-pareado; *p<0,05 vs. Sham e Doxy em 16 semanas por ANOVA de duas vias; # p<0,05 vs. C-LVH por teste *t* não-pareado e & p<0,05 vs. E-LVH em 16 semanas por ANOVA de duas vias. n=6-40. Os dados são mostrados como média ± EPM.

Tabela 1 - Parâmetros morfofuncionais cardíacos obtidos por ecocardiografia em dezesseis semanas de hipertensão renovascular.

	Sham	Doxy	C-LVH	E-LVH	C-LVH+Doxy
Espessura da Parede Anterior do Ventrículo Esquerdo na Sístole (mm)	3.5 ± 0.1	3.5 ± 0.2	4.2 ± 0.1*	3.5 ± 0.2†	4.6 ± 0.2*
Diâmetro da Câmara Ventricular Esquerda na Diástole (mm)	9.0 ± 0.2	8.5 ± 0.2	8.3 ± 0.3	8.7 ± 0.4	8.5 ± 0.2
Espessura da Parede Posterior do Ventrículo Esquerdo na Sístole (mm)	3.1 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.7 ± 0.2*	2.6 ± 0.1†	3.4 ± 0.2*
Débito Cardíaco (mL/min)	93.2 ± 4.0	76.2 ± 3.7	72.4 ± 4.3*	48.2 ± 2.5*†	77.6 ± 3.2†
Frequência Cardíaca (bpm)	313 ± 6	307 ± 9	290 ± 7	298 ± 13	302 ± 7

*p<0,05 vs. Sham e Doxy; †p<0,05 vs. C-LVH; n=6-17.

Já os cardiomiócitos do grupo E-LVH têm uma área menor quando comparados ao grupo C-LVH (p<0,05), mas ainda são considerados hipertrofiados em comparação aos grupos Sham e Doxy (p<0,05, Figuras 4A e 4B). Este resultado talvez se deva à organização em paralelo dos sarcômeros, característica da hipertrofia cardíaca excêntrica. Embora não tenha reduzido ou melhorado a hipertrofia cardíaca concêntrica, o tratamento com doxiciclina reverteu a hipertrofia dos cardiomiócitos observada no grupo C-LVH (p<0,05, Figuras 4A e 4B). Este achado talvez seja um prenúncio de que, se a inibição de MMPs tivesse seguido por mais semanas ou fosse

aliada à uma terapia anti-hipertensiva, teria sido possível observar uma melhora na hipertrofia cardíaca nos animais hipertensos tratados com doxiciclina. A análise da porcentagem de deposição de colágeno por coloração *Picrosirius Red* mostrou que há mais colágeno no ventrículo esquerdo dos ratos hipertensos do grupo E-LVH ($p<0,05$ vs. Sham e Doxy, Figuras 4A e 4C), o que talvez esteja associada à função cardíaca reduzida nestes animais. Parece haver o aumento da deposição de colágeno no grupo C-LVH e o tratamento com doxiciclina parece reduzir essa deposição, contudo, tanto o aumento quanto a redução não foram estatisticamente significativos ($p>0,05$, Figuras 4A e 4C).

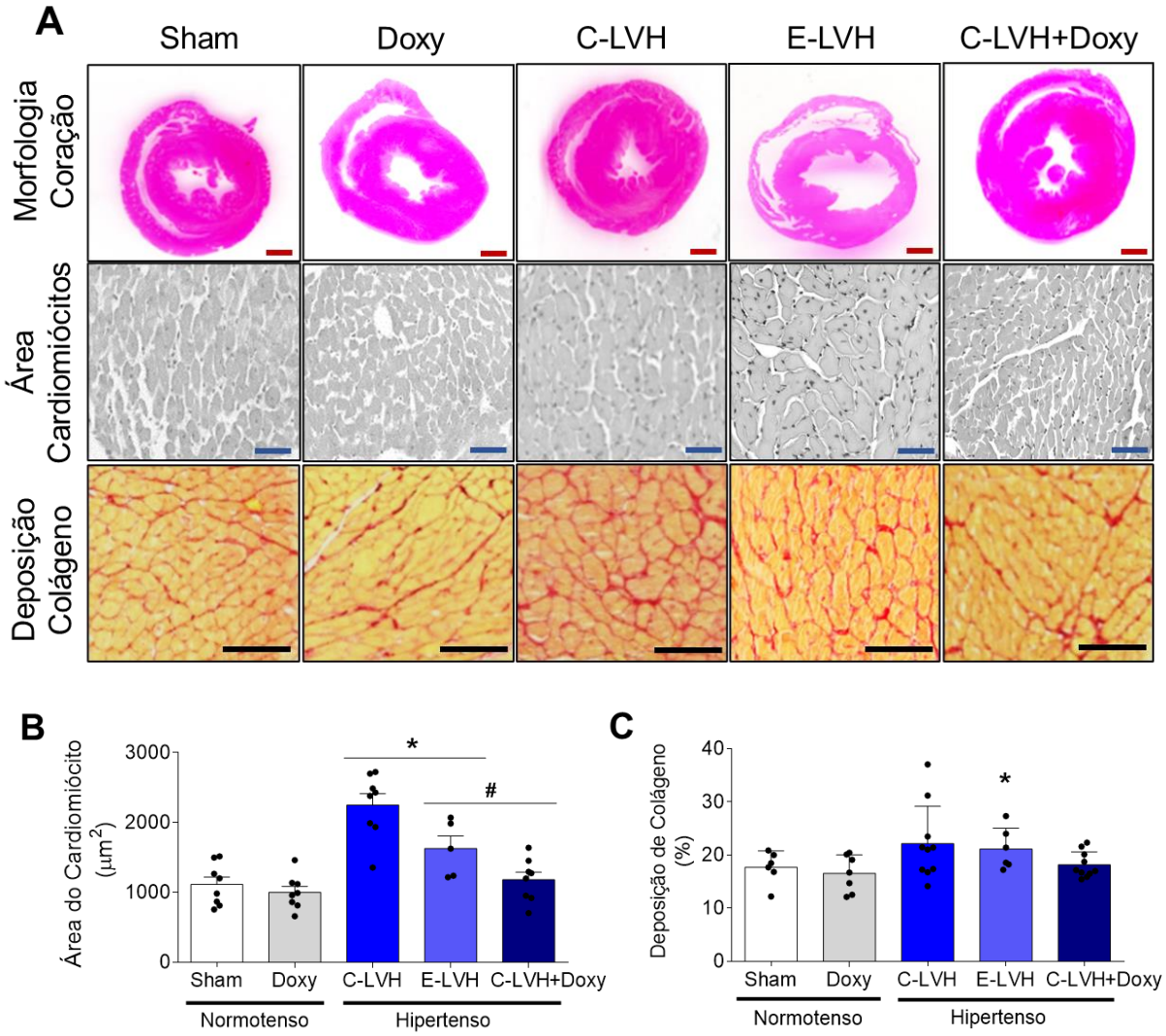


Figura 4 - Efeito da inibição de MMPs na morfologia dos cardiomiócitos e na deposição de colágeno no ventrículo esquerdo em 16 semanas de hipertensão renovascular. (A) Imagens representativas de seções transversais do coração (linha superior), da área de secção transversal de cardiomiócitos (coloração de hematoxilina de eosina, linha do meio) e de deposição de colágeno (coloração vermelha de *Picrosirius Red*, linha inferior). Os gráficos correspondentes mostram a quantificação da área transversal dos cardiomiócitos (B) e a

porcentagem de deposição de colágeno no ventrículo esquerdo (C). *p<0,05 vs. Sham e Doxy por ANOVA de duas vias e #p<0,05 vs. C-LVH por teste *t* não-pareado (E-LVH) e por ANOVA de duas vias (C-LVH+Doxy). n=6-10. Barras de escala pretas correspondem a 20 µm, azuis a 50 µm e vermelhas indicam que as fotos foram capturadas por scanner e correspondem ao seu tamanho natural. Os dados são mostrados como média ± EPM.

Já é sabido que a MMP-2 contribui para o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca concêntrica em animais com hipertensão renovascular (30). De fato, um aumento na atividade de MMP-2 foi visto por zimografia em gel e *in situ* no ventrículo esquerdo dos animais hipertensos pertencentes aos grupos C-LVH e E-LVH (p<0,05 vs. Sham e Doxy, Figuras 5A e 5B). A zimografia em gel mostrou, nos ratos hipertensos, um aumento na atividade de MMP-2 de 72 kDa, isoforma que pode ser ativada no meio intracelular (Figura 5A). Interessantemente, uma maior atividade gelatinolítica foi vista no interior dos cardiomiócitos dos grupos C-LVH e E-LVH, como pode ser observado na sequência inferior de fotos do painel representativo da Figura 5B. O tratamento com doxiciclina reduziu a atividade de MMPs por zimografia *in situ* (p<0,05 vs. C-LVH, Figura 5B). Isso não foi observado na zimografia em gel por uma limitação técnica: a doxiciclina pode soltar-se do domínio catalítico da MMP-2 durante a eletroforese e, por isso, amostras que foram tratadas com doxiciclina podem não exibir redução na atividade de MMP-2. Não foi visto sinal de atividade de MMP-9 por zimografia em gel (Figura 5A) ou expressão de MMP-9 por western blot no ventrículo esquerdo dos animais de todos os grupos (Figura 6A). Embora um aumento de atividade de MMP-2 tenha sido visto tanto por zimografia em gel quanto *in situ* no ventrículo esquerdo de animais hipertensos, a expressão de MMP-2 detectada por western blot não foi alterada em nenhum grupo experimental (Figura 6B).

Com o intuito de avaliar se o estresse oxidativo pode ativar a MMP-2 em cardiomiócitos por reação de S-glutatiolação, cardiomiócitos AC16 foram incubados com angiotensina II ou fenilefrina em diferentes concentrações. Utilizou-se a sonda fluorescente CM-H2DCFDA como forma de avaliar o estresse oxidativo nestas células. Quanto maior a intensidade de fluorescência, maior o estresse oxidativo. Como pode ser visto na Figura 7A, a incubação de cardiomiócitos AC16 com angiotensina II (0,1 e 1µM) e com fenilefrina (10 µM) promoveu estresse oxidativo (p<0,05 vs. controle). Partindo deste achado, foi investigado se há aumento na expressão de MMP-2 de 72 kDa no interior dos cardiomiócitos na presença de angiotensina II ou fenilefrina. Foi observado maior expressão de MMP-2 de 72 kDa

intracelular por western blot em cardiomiócitos AC16 estimulados com fenilefrina , e não angiotensina II, quando comparado ao controle (Figura 7B). A partir deste experimento, foi padronizado o estímulo com fenilefrina 10 µM.

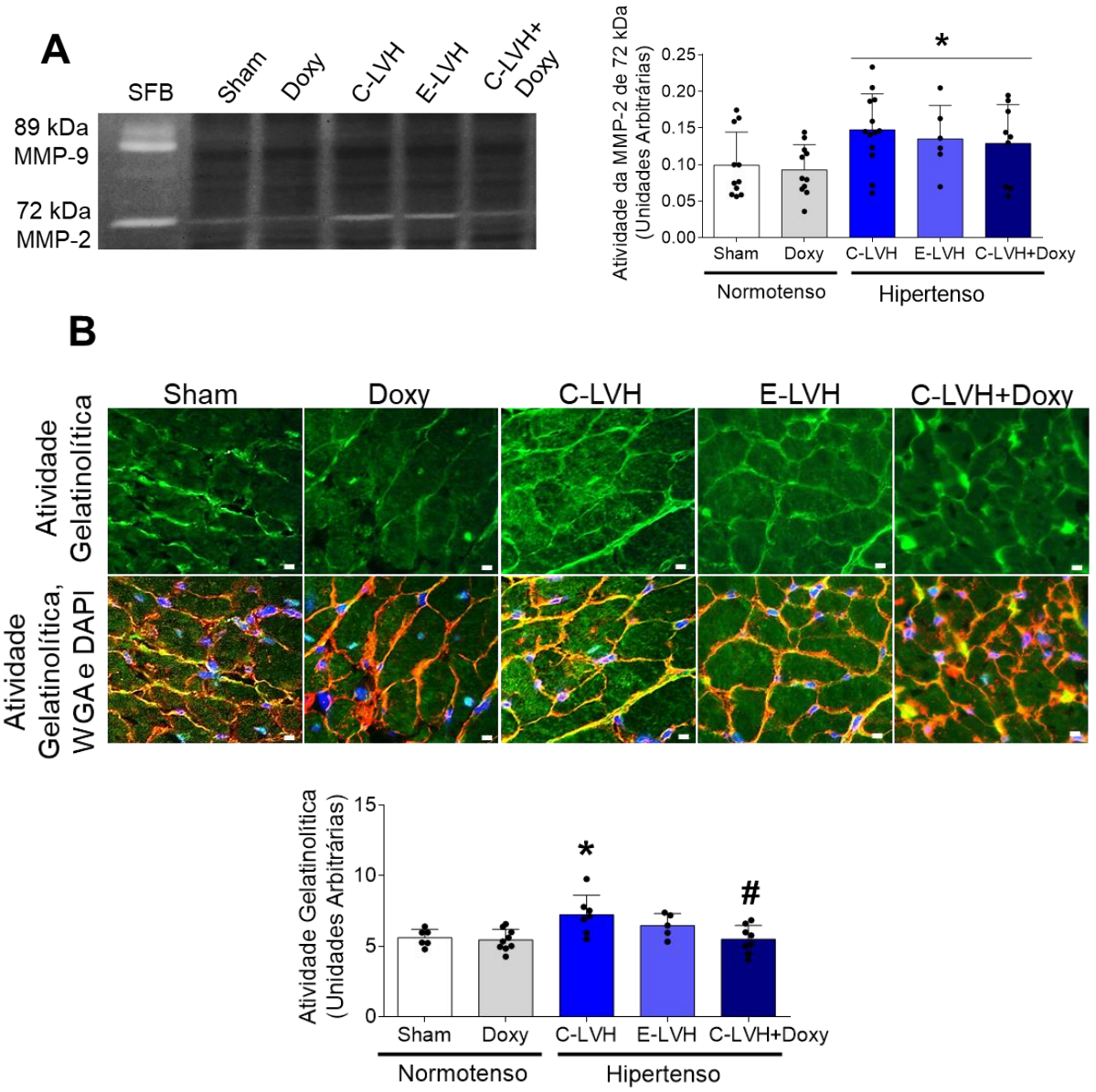


Figura 5 – O tratamento com doxiciclina diminui o aumento da atividade gelatinolítica de MMP-2 em ratos hipertensos 2R-1C. (A) Gel representativo da zimografia em gel (à esquerda) e o gráfico com os valores quantificados (à direita) da atividade de MMP-2 de 72 kDa no ventrículo esquerdo. (B) Imagens representativas da atividade gelatinolítica (em verde, por zimografia *in situ*) e imagens mescladas da atividade gelatinolítica, do marcador de membrana celular (WGA, em vermelho) e dos núcleos (DAPI, em azul) no ventrículo esquerdo. O gráfico (abaixo) mostra a quantificação da fluorescência verde emitida pela proteólise da *Dq gelatin*. *p<0,05 vs. Sham e Doxy por ANOVA de duas vias. #p<0,05 vs. C-LVH por ANOVA de duas vias. n= 5-13. SFB = soro fetal bovino (controle positivo). As barras brancas correspondem a 20 µm. O WGA foi usado para demarcar a membrana dos cardiomiócitos, o que ajuda a observar a atividade gelatinolítica intracelular (verde). Os dados são mostrados como média ± EPM.

A glutatiolação de proteínas pode ser analisada pelo método *Biotin Switch* seguido por western blot. Após a execução da técnica, observou-se que, aparentemente, há uma maior expressão de MMP-2 de 72 kDa S-glutatiolada no interior de cardiomiócitos AC16 tratados com fenilefrina 10 µM quando comparados aos controles sem antioxidante (tempol). Contudo, o tratamento com tempol não foi suficiente para reverter este efeito (Figura 7C). Decidiu-se então utilizar a glutarredoxina como agente antioxidante, uma vez que essa enzima consegue reverter especificamente as reações de glutatiolação. Após outra análise de *Biotin Switch* seguida por western blot, viu-se que, aparentemente, a glutarredoxina diminuiu a expressão de MMP-2 de 72kDa glutatiolada no interior dos cardiomiócitos AC16 após o estímulo com fenilefrina 10 µM (Figura 7D). Entretanto, todos esses achados são resultado de análises preliminares e devem ser investigados mais detalhadamente.

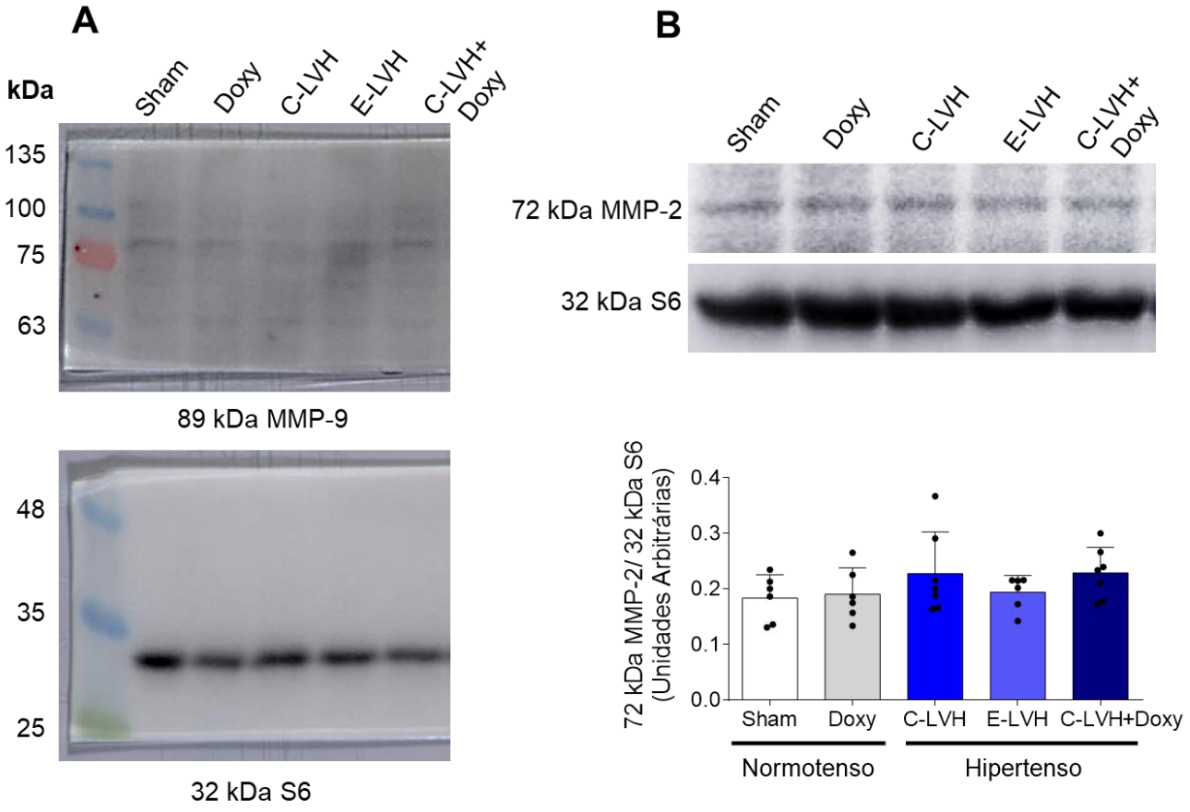


Figura 6 – O tratamento com doxiciclina não altera a expressão proteica de MMP-2 em ratos 2R-1C. (A) Imagem representativa de uma membrana de western blot incubada com anticorpo anti-MMP-9 (onde nenhuma marcação foi observada no peso molecular de 92 ou 89 kDa) e o *loading control* anti-S6. (B) Imagem representativa de uma membrana de western blot incubada com anticorpo anti-MMP-2 e o *loading control* anti-S6 e o gráfico com os valores quantificados da expressão de MMP-2 de 72 kDa no ventrículo esquerdo em 16 semanas de hipertensão renovascular. n=6-7.Os dados são mostrados como média ± EPM.

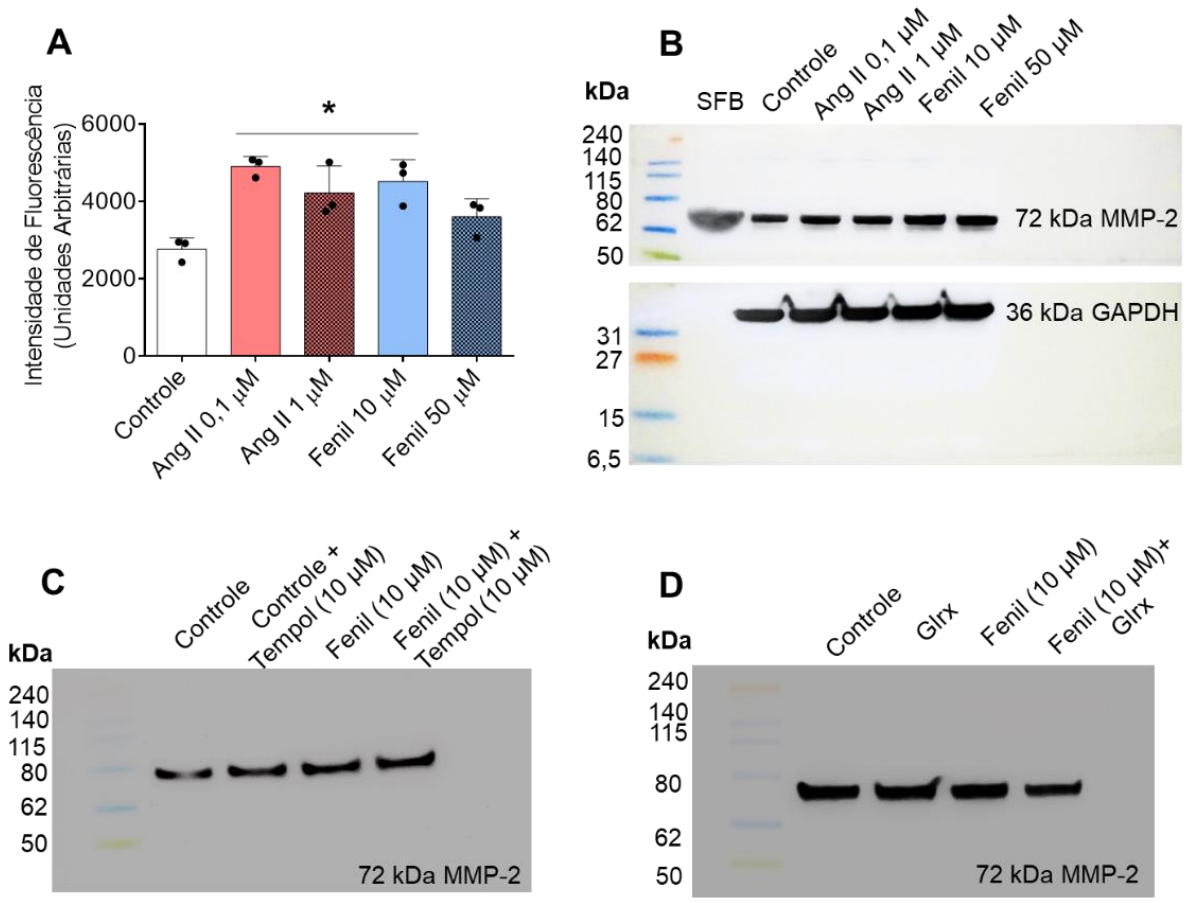


Figura 7 – O estresse oxidativo promovido por fenilefrina 10 µM pode causar S-glutatiolação da MMP-2 de 72 kDa em cardiomiócitos AC16. (A) Gráfico com os valores quantificados de intensidade de fluorescência após incubação das amostras de cardiomiócitos com a sonda CM-H2DCFDA. (B) Imagem representativa de uma membrana de western blot incubada com anticorpo anti-MMP-2 de 72 kDa e com o *loading control* anti-GAPDH em cardiomiócitos após incubação com diferentes concentrações de angiotensina II (Ang II), fenilefrina (Fenil) ou veículo (controle). (C) Imagem representativa de uma membrana de western blot marcada com anticorpo anti-MMP-2 após o ensaio de *Biotin Switch* feito com cardiomiócitos incubados com fenilefrina (10 µM) e/ou tempol (10 µM). (D) Imagem representativa de uma membrana de western blot marcada com anticorpo anti-MMP-2 após o ensaio de *Biotin Switch* feito com cardiomiócitos incubados com fenilefrina (10 µM) e/ou transfectados com glutaredoxina (Glrx). *p<0,05 vs. Controle por teste *t* não pareado. n=3 Os dados são mostrados como média ± EPM.

O TIMP-4 é um inibidor tecidual endógeno de MMP-2 nos cardiomiócitos (51). A expressão de TIMP-4 aumentou no ventrículo esquerdo de todos os animais hipertensos (p<0,05 vs. Sham e Doxy, Figura 8A), talvez como uma forma de compensar a atividade acentuada de MMP-2. Embora o tratamento com doxiciclina tenha diminuído a atividade gelatinolítica *in situ* da MMP-2 no ventrículo esquerdo, ele não alterou a expressão de TIMP-4 no grupo C-LVH+Doxy (p>0,05, Figura 8A). Por outro lado, os níveis de TIMP-2 aumentaram apenas no ventrículo esquerdo de

animais do grupo C-LVH (p<0,05 vs. Sham e Doxy, Figura 8B) e o tratamento com doxiciclina os diminuiu (p<0,05 vs. C-LVH, Figura 8B). A expressão de TIMP-2 não alterou no ventrículo esquerdo dos animais do grupo E-LVH quando comparado aos grupos Sham e Doxy (p>0,05, Figura 8B).

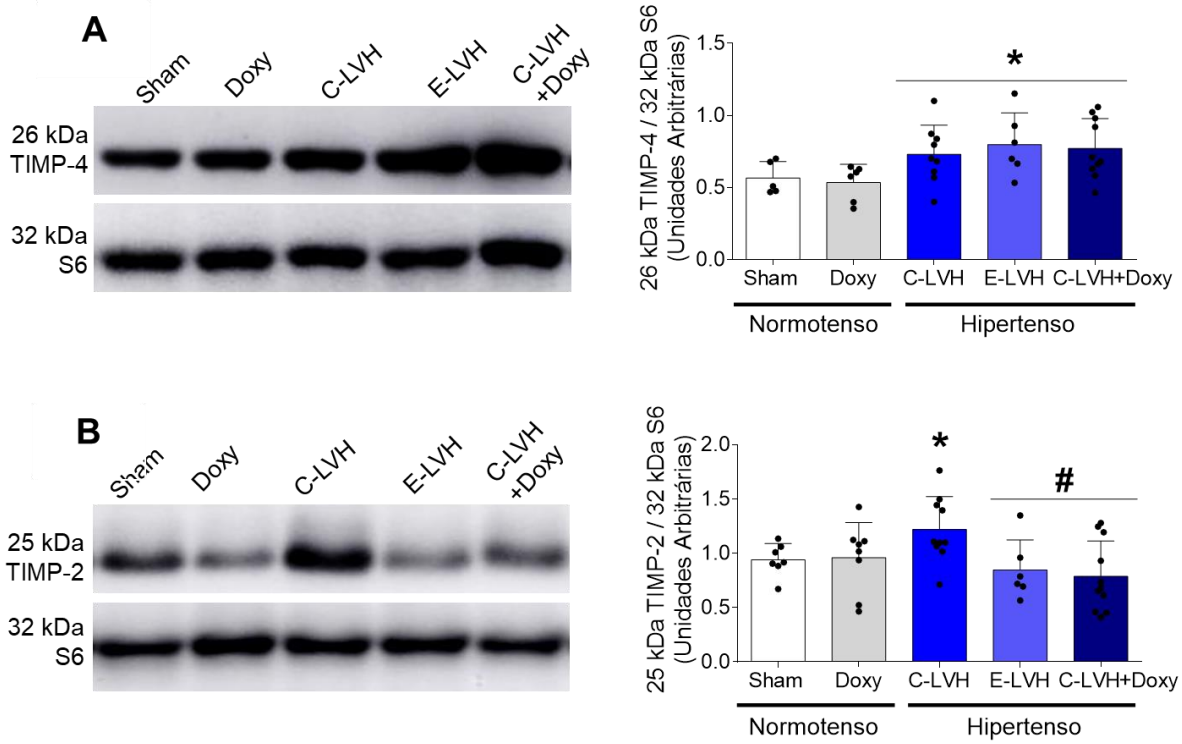


Figura 8 – O tratamento com doxiciclina modifica de forma diferente a expressão de TIMP-4 e TIMP-2 no ventrículo esquerdo de ratos hipertensos 2R-1C. Imagens ilustrativas de western blot e gráficos com os valores quantificados da expressão de 26 kDa TIMP-4 (A) e 25 kDa TIMP-2 (B) (normalizados pelo *loading control* 32 kDa S6) no ventrículo esquerdo dos animais de todos os grupos experimentais em 16 semanas de hipertensão renovascular. *p<0,05 vs. Sham e Doxy por ANOVA de duas vias e #p<0,05 vs. C-LVH por teste *t* não-pareado (grupo E-LVH) e por ANOVA de duas vias (grupo C-LVH+Doxy). n=5-11. Os dados são mostrados como média ± EPM.

Sabendo que a atividade de MMP-2 estava aumentada no coração dos animais com hipertensão renovascular, o próximo passo foi analisar se esta atividade acentuada podia ser relacionada a proteólise de troponina I e distrofina. Se a MMP-2 reduzir as concentrações proteicas de troponina I e distrofina, então este seria um mecanismo importante pelo qual a MMP-2 contribui para alteração estrutural e funcional do coração na hipertensão crônica. Em um estudo prévio, foi demonstrado que a MMP-2 se colocaliza com a troponina I e a degrada no ventrículo esquerdo de ratos submetidos a isquemia miocárdica e lesão de reperfusão (17). Usando microscopia de fluorescência confocal, foi confirmado que a MMP-2 (fluorescência

vermelha) se colocaliza com troponina I (fluorescência verde) no ventrículo esquerdo dos ratos normotensos (fluorescência amarela na imagem Merge, Figura 9A). A colocalização foi determinada a partir da análise do coeficiente de *Mander* (tM1 = 0.63±0.05 e tM2 = 0.67±0.05, n=3). Quanto mais próximo a 1 o coeficiente de *Mander* está, maior é a chance de duas proteínas estarem colocalizadas.

Além disso, houve um aumento na expressão de um produto proteolítico da troponina I (de aproximadamente 20 kDa) por western blot nos animais E-LVH quando comparado ao grupo C-LVH ($p<0,05$, Figura 9B), embora nenhuma alteração tenha sido vista na expressão total de troponina I de 30 kDa entre os grupos ($p>0,05$, Figura 9B). Este efeito pode ser consequência do aumento da atividade de MMP-2 no ventrículo esquerdo de ratos hipertensos e possivelmente uma das causas que contribuem para a disfunção cardíaca observada nestes animais. Para confirmar se o produto de 20 kDa observado no western blot era de fato produto de proteólise da troponina I, foi feito uma análise deste por espectrometria de massas.

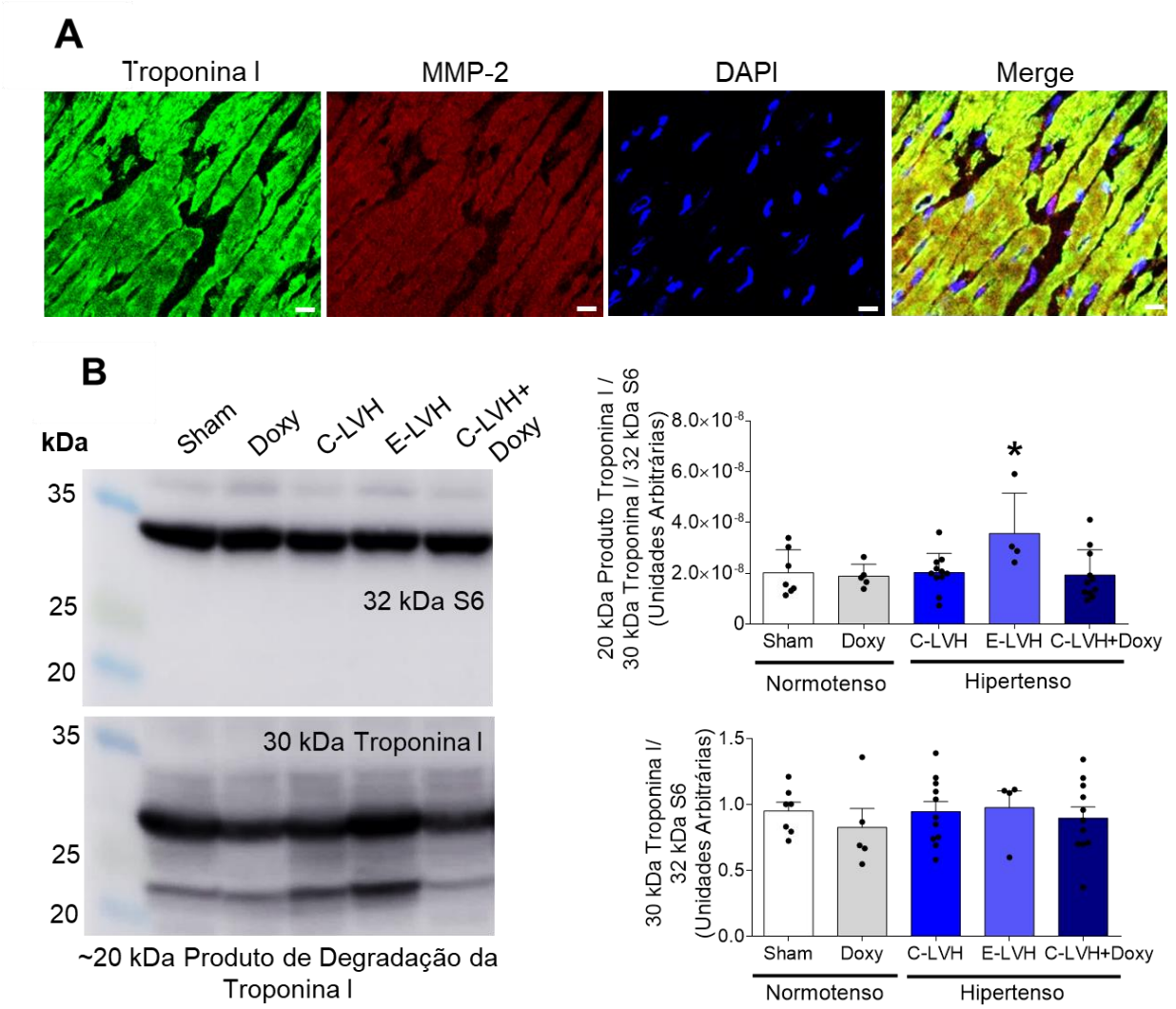


Figura 9 – A transição de hipertrofia cardíaca concêntrica para excêntrica leva a proteólise de troponina I por uma provável ação de MMP-2 no ventrículo esquerdo de ratos 2R-1C. (A) Imagens representativas de cortes longitudinais do ventrículo esquerdo de ratos sham (n=3) capturadas por microscopia confocal. A MMP-2 (vermelho) apresenta-se colocalizada com troponina I (verde). As barras brancas correspondem a 25 µm. (B) Imagens representativas da membrana de western blot e gráficos com os valores quantificados de troponina I de 30 kDa e de um produto proteolítico de troponina I de aproximadamente 20 kDa no ventrículo esquerdo. A proteína ribossomal S6 de 32 kDa foi usada como *loading control*. *p<0,05 vs. C-LVH por teste *t* não-pareado. n=4-11. Os dados são mostrados como média ± EPM.

A análise de espectrometria de massas confirmou a presença de um produto proteolítico de aproximadamente 20 kDa da troponina I no ventrículo esquerdo de animais do grupos C-LVH e E-LVH. Os valores de cobertura foram calculados considerando os aminoácidos semelhantes entre as amostras de produtos de degradação de troponina I de rato coletadas neste experimento e a estrutura completa da troponina I de *Rattus norvegicus* (211 aminoácidos) extraída do banco de dados UniProt (UniProtKB - P23693). A Figura 10A mostra a porcentagem de cobertura do produto de degradação da troponina I de rato de aproximadamente 20 kDa detectado por western blot no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos C-LVH (55%) e E-LVH (54%) quando comparado com toda a sequência de aminoácidos que compoem a troponina I, representada na Figura 10B.

A Figura 10A também mostra as sequências de aminoácidos do produto de degradação da troponina I do ventrículo esquerdo de ratos hipertensos C-LVH e E-LVH (em vermelho), semelhantes à sequência intacta da troponina I de rato. Os fragmentos de troponina I que não foram encontrados pela espectrometria de massas correspondem ao seu domínio N-terminal e parte de seu domínio C-terminal, entre outros mostrados em preto na Figura 10A. Além disso, a comparação da sequência de aminoácidos primária da troponina I de rato com a humana (UniProtKB - P19429) mostrou 91,9% de homologia (194 aminoácidos) em toda a sua estrutura (Figura 10B). A Figura 10C mostra 70% de cobertura da troponina I de rato de 30 kDa encontrada no ventrículo esquerdo de animais Sham quando comparada com toda a sua sequência. Todos estes achados confirmam que a troponina I foi degradada durante o processo de transição entre hipertrofia concêntrica (representada pelo grupo C-LVH) e excêntrica (grupo E-LVH), sendo que a expressão de produtos de degradação de troponina I é maior no grupo E-LVH. Como a atividade de MMP-2 estava aumentada em ambos os grupos experimentais, é possível hipotetizar que essa proteólise de

troponina I se deva à ação da MMP-2. Entretanto, não podemos excluir a possível participação de outras proteases neste efeito.

A

Cleaved products of troponin I	Molecular weight (kDa)	Rat troponin I (211 amino acids)	
		# peptides	% coverage
C-LVH hypertensive rats	20	17	55% (117 amino acids)
E-LVH hypertensive rats	20	21	54% (113 amino acids)

C-LVH troponin I cleaved product

```
1     MADESSDAAG EPQPAPAPVR RRSSANYRAY ATEPHAKKKS KISASRKLQL KTLMLQIAKQ
61    EMEREAEERR GEKGRVLSTR CQPLVLDGLG FEELQDLCRQ LHARVDKVDE ERYDVEAKVT
121   KNITEIADLT QKIYDLRGKF KRPTLRRVRI SADAMMQALL GTRAKESLDL RAHLKQVKKE
181   DIEKENREVG DWRKNIDALS GMEGRKKKFE G
```

E-LVH troponin I cleaved product

```
1     MADESSDAAG EPQPAPAPVR RRSSANYRAY ATEPHAKKKS KISASRKLQL KTLMLQIAKQ
61    EMEREAEERR GEKGRVLSTR CQPLVLDGLG FEELQDLCRQ LHARVDKVDE ERYDVEAKVT
121   KNITEIADLT QKIYDLRGKF KRPTLRRVRI SADAMMQALL GTRAKESLDL RAHLKQVKKE
181   DIEKENREVG DWRKNIDALS GMEGRKKKFE G
```

B

```
P19429_Human   MADGSSDAAR EPRPAPAPIR RRS-SNYRAY ATEPHAKKKS KISASRKLQL KTLLLQIAKQ
P23693_Rat     MADESSDAAG EPQPAPAPVR RRSSANYRAY ATEPHAKKKS KISASRKLQL KTLMLQIAKQ
Consensus      ...*.....* ..*.....*. ...**..... .......... .......... ...*......

P19429_Human   ELEREAEERR GEKGRALSTR CQPLELAGLG FAELQDLCRQ LHARVDKVDE ERYDIEAKVT
P23693_Rat     EMEREAEERR GEKGRVLSTR CQPLVLDGLG FEELQDLCRQ LHARVDKVDE ERYDVEAKVT
Consensus      .*........ .....*.... ....*.*... .*........ .......... ....*.....

P19429_Human   KNITEIADLT QKIFDLRGKF KRPTLRRVRI SADAMMQALL GARAKESLDL RAHLKQVKKE
P23693_Rat     KNITEIADLT QKIYDLRGKF KRPTLRRVRI SADAMMQALL GTRAKESLDL RAHLKQVKKE
Consensus      .......... ...*...... .......... .......... .*........ ..........

P19429_Human   DTEKENREVG DWRKNIDALS GMEGRKKKFES
P23693_Rat     DIEKENREVG DWRKNIDALS GMEGRKKKFEG
Consensus      .*........ .......... ..........*
```

C

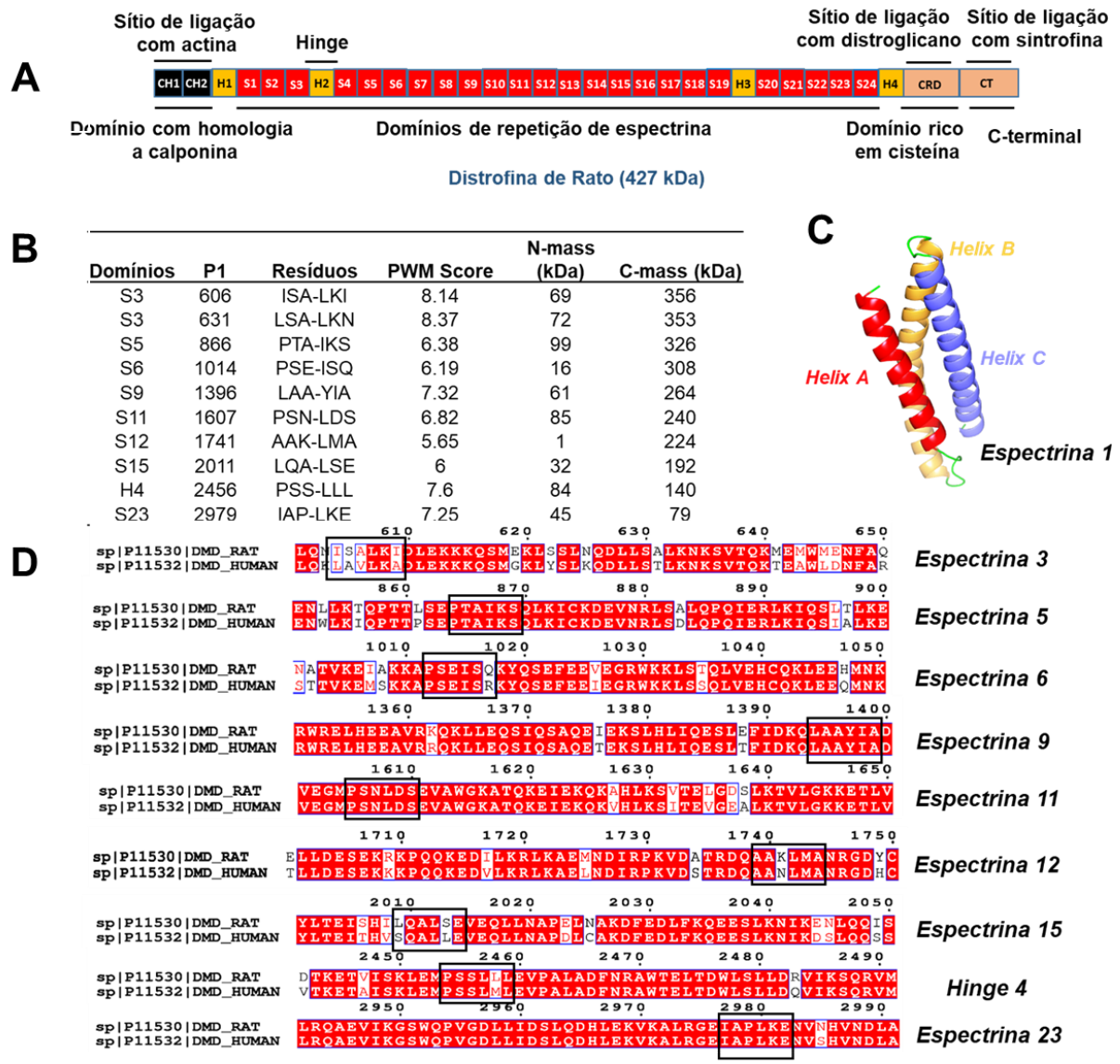
Mother band of troponin I	Molecular weight (kDa)	Rat troponin I (211 amino acids)	
		# peptides	% coverage
Sham	30	24	70% (148 amino acids)

```
1     MADESSDAAG EPQPAPAPVR RRSSANYRAY ATEPHAKKKS KISASRKLQL KTLMLQIAKQ
61    EMEREAEERR GEKGRVLSTR CQPLVLDGLG FEELQDLCRQ LHARVDKVDE ERYDVEAKVT
121   KNITEIADLT QKIYDLRGKF KRPTLRRVRI SADAMMQALL GTRAKESLDL RAHLKQVKKE
181   DIEKENREVG DWRKNIDALS GMEGRKKKFE G
```

Figura 10 – A proteólise de troponina I em ratos hipertensos dos grupos C-LVH e E-LVH foi confirmada por espectrometria de massas. (A) A tabela mostra a cobertura espectrofotométrica de massa de 55% e 54% do produto de clivagem da troponina I de rato de 20 kDa no ventrículo esquerdo de ratos C- e E-LVH quando comparado com toda a

sequência de troponina I. As sequências de aminoácidos do produto de degradação da troponina I que foram reconhecidos pela espectrofotometria e são semelhantes à troponina I íntegra estão marcados em vermelho. (B) A sequência de aminoácidos primária da troponina I de rato e humana foi comparada usando o software *Uniprot* e mostrou 91,9% entre as duas proteínas; os pontos (.) e * representam aminoácidos iguais e diferentes entre a sequência da troponina I de rato e humana, respectivamente. (C) A tabela mostra 70% de cobertura da troponina I de rato de 30 kDa no ventrículo esquerdo de rato Sham quando comparada com toda a sua sequência. Os aminoácidos da troponina I que foram reconhecidos pela espectrofotometria com base em toda a sua sequência estão marcados em vermelho.

O próximo possível alvo proteolítico de MMP-2 estudado foi a distrofina. Para avaliar se a distrofina possui sítios de clivagem para MMP-2, a análise *in silico* foi feita pelo software *CleavPredict* e revelou vários possíveis locais de proteólise da distrofina de rato pela MMP-2. A maior parte da estrutura da distrofina é composta por repetições semelhantes à espectrina, que são estruturas de feixe de três hélices em forma de bastonete (Figuras 11A e 11C). Uma lista dos dez principais locais de clivagem da MMP-2 na estrutura da distrofina de rato foi feita de acordo com sua pontuação no algoritmo PWM (Figura 11B). Com o auxílio do *CleavPredict*, foi calculado o peso molecular dos fragmentos N- e C-terminais da distrofina a partir da posição P1 dos locais de clivagem. Todos os dez locais de clivagem possíveis foram encontrados em domínios de repetição semelhantes à espectrina da distrofina, exceto um que foi encontrado no domínio 4 do tipo *hinge*. Os domínios de espectrina compreendem a maior parte da estrutura da distrofina entre os domínios 1 e 4 do tipo *hinge*. Logo, estes nove locais de clivagem da MMP-2 previstos em múltiplos domínios de espectrina devem gerar uma ampla gama de produtos de proteólise. A comparação entre a sequência de aminoácidos da distrofina de rato e a humana mostrou 91,6% de homologia entre as duas proteínas e a presença de resíduos de aminoácidos conservados em toda a estrutura. Os resultados também mostraram semelhanças significativas entre os dez principais sítios de clivagem na posição P3-P3' (Figura 11D) da distrofina de rato e humana, o que sugere a presença de possíveis locais de clivagem para MMP-2 também na distrofina humana.



Domínios	P1	Resíduos	PWM Score	N-mass (kDa)	C-mass (kDa)
S3	606	ISA-LKI	8.14	69	356
S3	631	LSA-LKN	8.37	72	353
S5	866	PTA-IKS	6.38	99	326
S6	1014	PSE-ISQ	6.19	16	308
S9	1396	LAA-YIA	7.32	61	264
S11	1607	PSN-LDS	6.82	85	240
S12	1741	AAK-LMA	5.65	1	224
S15	2011	LQA-LSE	6	32	192
H4	2456	PSS-LLL	7.6	84	140
S23	2979	IAP-LKE	7.25	45	79

Figura 11 - A distrofina como alvo proteolítico da MMP-2 *in silico*. (A) Esquema estrutural da distrofina de rato (427 kDa). (B) Análise *in silico* dos locais de clivagem de MMP-2 previstos na distrofina de rato. A tabela resume os dez principais locais de proteólise na distrofina de rato por MMP-2, de acordo com a pontuação de PWM. O hífen denota os locais de clivagem entre os resíduos P1 e P1'. (C) Estrutura tridimensional do domínio da espectrina 1 de rato. (D) Alinhamento da sequência de aminoácidos da distrofina de rato e humana. Semelhanças de sequência de locais de clivagem previstos (P3-P3 ') em distrofina de rato e humana estão destacados nos retângulos pretos.

Como revisado anteriormente, a perda de distrofina leva a defeitos de permeabilidade na membrana plasmática e desestabiliza estruturalmente os cardiomiócitos, o que pode contribuir para a falência cardíaca (40). O aumento da atividade de MMP-2 observado na hipertensão arterial crônica talvez possa alterar os níveis de distrofina no ventrículo esquerdo e contribuir para a perda de função

cardíaca. Foi observada uma discreta colocalização de distrofina com MMP-2 no ventrículo esquerdo de ratos Sham (Coeficiente de *Mander*, tM1 = 0,381 ± 0,022 e tM2 = 0,293 ± 0,029, n=3) (Figura 12A). Entretanto, uma redução na expressão de distrofina foi detectada por imunofluorescência no ventrículo esquerdo dos animais do grupo E-LVH quando comparado aos grupos Sham e Doxy ($p<0,05$, Figura 12B). Este achado, junto com os experimentos de troponina I, pode justificar a função cardíaca reduzida detectada por ecocardiografia nestes animais. Há uma tendência não significativa de redução de distrofina nos animais C-LVH quando comparado aos controles ($p>0,05$, Figura 12B) e o tratamento com doxiciclina preserva a expressão dessa proteína no ventrículo esquerdo destes animais hipertensos ($p<0,05$ vs. C-LVH, Figura 12B). A perda não significativa de distrofina observada no grupo C-LVH pode ser um indício de que estes animais poderiam evoluir para falência cardíaca caso permanecessem hipertensos por mais tempo, contudo, tal perda não foi suficiente para prejudicar a função cardíaca, como visto na análise deste grupo por ecocardiografia. O tratamento com doxicilcina parece preservar os níveis de distrofina iguais aos vistos nos grupos controles, mostrando assim um efeito benéfico de inibição de MMPs. É importante ressaltar que a redução da expressão de distrofina nos ratos 2R-1C não se deve à apoptose dos cardiomiócitos, uma vez que a imunofluorescência com o marcador de membrana WGA e com o marcador nuclear DAPI mostrou cardiomiócitos com estrutura íntegra e preservada (Figura 12B).

A análise por western blot da expressão de distrofina de 427 kDa no ventrículo esquerdo dos animais de todos os grupos experimentais mostrou um perfil de expressão de distrofina semelhante à imunofluorescência, com redução no grupo E-LVH quando comparado aos controles, contudo, não houve diferença estatística significativa (Figura 13). Por fim, o uso de inibidores de MMPs parece ser uma ferramenta farmacológica importante para prevenir/reduzir a proteólise de proteínas essenciais para o funcionamento cardíaco. Assim, especula-se que estes inibidores, junto ao tratamento anti-hipertensivo, podem evitar o surgimento de falência cardíaca e morte de pacientes com hipertensão arterial crônica.

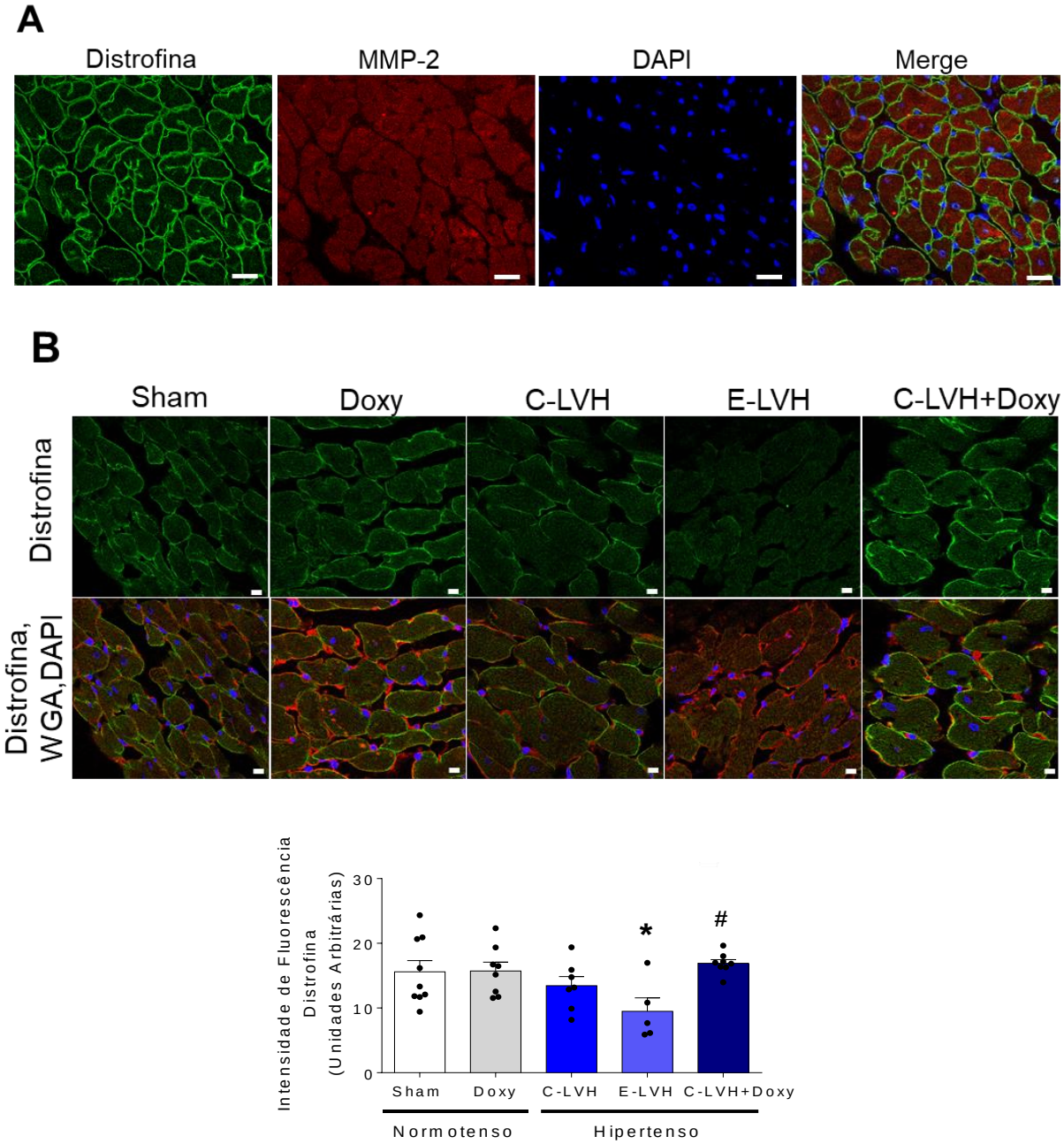


Figura 12 - A MMP-2 contribui para a proteólise de distrofina na transição de hipertrofia concêntrica para excêntrica na hipertensão renovascular crônica. (A) Imagens representativas da co-localização (merge, em amarelo) da distrofina (em verde) com a MMP-2 (em vermelho) no ventrículo esquerdo de ratos Sham. As barras brancas correspondem a 25 µm. (B) Painel com imagens representativas (acima) da imunofluorescência da distrofina (verde) mescladas com um marcador de membrana (WGA, em vermelho) e com um marcador de núcleo (DAPI, em azul). O marcador de membrana WGA foi usado para demarcar a membrana plasmática dos cardiomiócitos e e confirmar sua integridade. As barras brancas correspondem a 20 µm. O gráfico (abaixo) mostra os valores quantificados da fluorescência verde da distrofina. #p<0,05 vs. C-LVH por teste *t* não-pareado; *p<0,05 vs. Sham e Doxy por ANOVA de duas vias. n=5-9. Os dados são mostrados como média ± EPM.

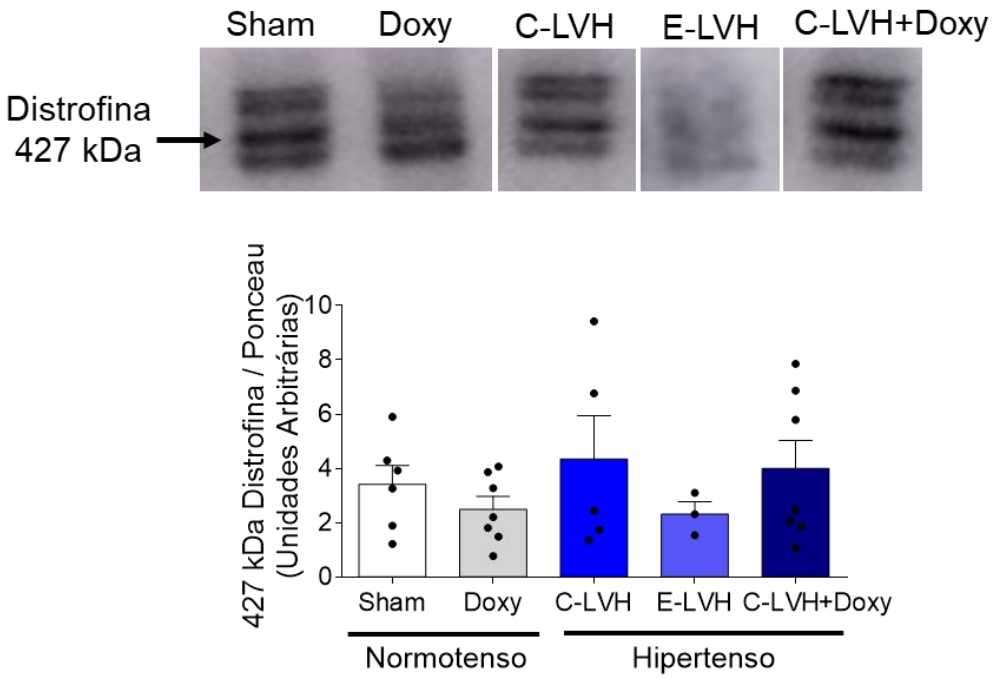


Figura 13 – Redução de expressão de distrofina de 427 kDa por western blot no ventrículo esquerdo de ratos 2R-1C. Imagem representativa de membranas de western blot incubadas com anticorpo anti-distrofina e gráfico com os valores quantificados de distrofina normalizados pela marcação por *Ponceau*. n=3-7. Os dados são mostrados como média ± EPM.

Discussão dos Resultados

5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Foi mostrado pela primeira vez que a inibição da atividade de MMP-2 com a doxiciclina diminuiu o número de ratos hipertensos que desenvolveram disfunção cardíaca associada à hipertrofia excêntrica, mesmo sem reduzir a pressão arterial sistólica. Isto pode ocorrer porque o tratamento com doxiciclina evitou a perda de troponina I e distrofina no ventrículo esquerdo de ratos submetidos à hipertensão renovascular crônica. Portanto, o tratamento com inibidores de MMPs pode ser uma intervenção farmacológica relevante para melhorar o remodelamento e a perda de função cardíaca induzidos pela hipertensão arterial e, possivelmente, evitar o desenvolvimento de falência cardíaca nestes indivíduos.

Durante o curso da hipertensão arterial, o ventrículo esquerdo se adapta para compensar a tensão resultante do aumento da pressão arterial na tentativa de restaurar a função cardíaca. A hipertrofia cardíaca do tipo concêntrica é caracterizada, principalmente, por um aumento na espessura das paredes anterior e posterior do ventrículo esquerdo seguida por redução, ou não, do diâmetro da câmara ventricular. Tais alterações culminam na preservação da função cardíaca (52). Foi observado que a maioria dos ratos 2R-1C apresentou hipertrofia cardíaca concêntrica em dez semanas de hipertensão renovascular, vista por meio do aumento na espessura das paredes posterior e anterior do ventrículo esquerdo na diástole e pela não alteração do diâmetro da câmara ventricular na sístole. Estes animais hipertensos também apresentaram frações de ejeção e de encurtamento preservadas, o que indica uma boa função cardíaca. Foi demonstrado anteriormente que o tratamento com doxiciclina (inibidor não seletivo de MMPs) por oito semanas restaurou completamente essas características hipertróficas do coração em dez semanas de hipertensão 2R-1C (30). No entanto, foi decidido investigar neste trabalho se a inibição da atividade de MMPs, especialmente a MMP-2, impede a transição de hipertrofia cardíaca concêntrica à excêntrica na hipertensão renovascular crônica. Dessa forma, os ratos foram tratados com doxiciclina ou veículo da décima à décima sexta semana de hipertensão renovascular.

Foi mostrado que aproximadamente 25% dos animais hipertensos 2R-1C tratados com veículo desenvolveram hipertrofia cardíaca excêntrica com frações de ejeção e encurtamento reduzidas em 16 semanas de hipertensão renovascular (grupo E-LVH), enquanto que cerca de 11% dos animais 2R-1C tratados com doxiciclina

demonstraram este mesmo perfil (grupo E-LVH+Doxy). Este resultado mostra o efeito benéfico da inibição de MMPs em prevenir o surgimento de disfunção cardíaca associada à hipertrofia excêntrica mesmo qundo não houve redução da pressão arterial sistólica. O restante dos animais hipertensos tratados com veículo ou doxiciclina permaneceram com hipertrofia concêntrica e função cardíaca preservada (grupos C-LVH e C-LVH+Doxy, respectivamente).

Os animais do grupo E-LVH apresentaram aumento do diâmetro da câmara ventricular esquerda na sístole e maior deposição de colágeno quando comparados aos animais normotensos, o que pode ter contribuído para a redução do desempenho contrátil cardíaco. É bem conhecido que o aumento da deposição de colágeno no ventrículo esquerdo contribui para a rigidez da câmara ventricular e para insuficiência cardíaca na hipertensão (14, 53). Embora o tratamento com doxiciclina não tenha reduzido a deposição de colágeno observada no ventrículo esquerdo de ratos hipertensos com hipertrofia concêntrica (grupo C-LVH), ele reduziu o aumento da área transversal (hipertrofia) dos cardiomiócitos, o que pode ser um efeito valioso para restaurar a estrutura cardíaca caso este tratamento tivesse continuado por mais tempo ou fosse associado à uma terapia anti-hipertensiva.

A inibição de MMPs evitou algumas alterações bioquímicas importantes durante a transição de hipertrofia cardíaca concêntrica para excêntrica. O aumento da atividade de MMPs contribuiu para a dilatação do ventrículo esquerdo e para a falência do coração em um modelo de obesidade em ratos espontaneamente hipertensos com falência cardíaca, efeito que foi prevenido pelo tratamento com um inibidor de MMPs (31). Foi observado por zimografia *in situ* que houve aumento de atividade gelatinolítica dentro dos cardiomiócitos de ratos hipertensos C- e E-LVH e o tratamento com doxiciclina reduziu essa atividade. Esse aumento de atividade gelatinolítica provavelmente se deve à MMP-2, uma vez que não foi detectada nenhuma banda correspondente à MMP-9 na zimografia em gel e também no western blot, ambos feitos nas mesmas amostras. É importante ressaltar que as duas técnicas utilizadas neste trabalho para avaliar a atividade de MMPs (zimografias em gel e *in situ*) são específicas para o estudo das MMP-2 e -9, uma vez que utilizam a gelatina como substrato enzimático. Entre estas MMPs, a MMP-2 é constitutiva do coração e parece ser a única ativada no interior dos cardiomiócitos por estresse oxidativo (19).

O termo estresse oxidativo descreve as condições que envolvem uma elevação crônica de espécies reativas de oxigênio com desregulação das ações antioxidantes

e isto é associado às doenças cardiovasculares. Indivíduos com hipertensão arterial têm aumento dos produtos do estresse oxidativo junto com a diminuição endógena de enzimas antioxidantes (54, 55). Além de degradar proteínas da matriz extracelular cardíaca, a MMP-2 pode ser ativada nos cardiomiócitos por estresse oxidativo e degradar proteínas do sarcômero, o que causa disfunção cardíaca (17, 18, 24). Existem três isoformas de MMP-2 no interior dos cardiomiócitos (19). De fato, a MMP-2 de 72 kDa pode ser ativada intracelularmente por peroxinitrito via S-glutatiolação do domínio de cisteína em seu pro-peptídeo (16, 24, 56) e contribuir para a proteólise da troponina I, resultando em disfunção cardíaca (17). Após a incubação de cardiomiócitos AC16 com fenilefrina para simular um estado hipertensivo *in vitro*, foi visto que há uma maior formação de espécies reativas de oxigênio no interior destas células e isto foi associado à maior S-glutatiolação de MMP-2 quando comparado aos cardiomiócitos controle. Estes achados sugerem que o estresse oxidativo causado pela hipertensão arterial crônica pode ser relacionado ao aumento da atividade intracelular de MMP-2 e, consequentemente, à proteólise de alvos intracelulares importantes da maquinaria contrátil dos cardiomiócitos. Entretanto, os ensaios em cultura de células apresentados neste trabalho ainda possuem caráter preliminar. Para investigar se essa hipótese se confirma tanto em cardiomiócitos quanto em animais, mais análises precisam ser feitas.

O TIMP-4 pode inibir a atividade da MMP-2 intracelular durante a lesão miocárdica por isquemia e reperfusão (51), ao contrário do TIMP-2, que geralmente inibe a MMP-2 extracelularmente. Aqui, foi mostrado que o TIMP-4, mas não o TIMP-2, estava aumentado no ventrículo esquerdo de ratos hipertensos do grupo E-LVH. Um aumento de TIMP-4 pode acontecer como forma de compensar os efeitos proteolíticos elevados de MMP-2 em alvos intracelulares, como troponina I e distrofina, no entanto, mais estudos precisam ser feitos para verificar esta hipótese.

Embora a fibrose e a hipertrofia dos cardiomiócitos sejam considerados marcadores críticos para a falência cardíaca (57), o desarranjo das proteínas do citoesqueleto e do sarcômero também contribui para o desenvolvimento desta patologia (58, 59). Como foi visto que a MMP-2 e a troponina I estão colocalizadas nos cardiomiócitos de ratos normotensos, o próximo passo foi investigar se a MMP-2 pode degradar troponina I durante a transição de hipertrofia cardíaca concêntrica para excêntrica na hipertensão renovascular crônica. Foi observado um aumento na expressão de um produto proteolítico de aproximadamente 20 kDa de troponina I por

western blot e espectrometria de massas no ventrículo esquerdo de ratos hipertensos do grupo E-LVH. É possível que o aumento da atividade de MMP-2 culmine na proteólise da troponina I no ventrículo esquerdo de animais hipertensos com hipertrofia cardíaca excêntrica e que isto contribua para a perda de função cardíaca observada nestes animais.

Além da troponina I, também foi analisado o potencial efeito proteolítico intracelular da MMP-2 sobre a distrofina no ventrículo esquerdo de ratos 2R-1C. A distrofina é uma proteína do citoesqueleto que confere estabilidade mecânica à membrana plasmática dos cardiomiócitos (39). Portanto, sua perda desestabiliza a estrutura dos cardiomiócitos e contribui para a disfunção cardíaca. A distrofina possui quatro regiões importantes: um domínio N-terminal, um domínio *rod-shaped*, um domínio rico em cisteína e, por último, um domínio C-terminal. O domínio N-terminal começa com duas regiões semelhantes à calponina que servem como locais de ligação à actina; os domínios C-terminal e rico em cisteína contêm locais de ligação para a sintrofina e para o distroglicano; os domínios N e C-terminais são conectados por um domínio com 24 repetições do tipo espectrina, também conhecido como domínio *rod-shaped*. Existem também quatro regiões do tipo *hinge* no início e dentro do domínio *rod-shaped* (60) que são sensíveis à clivagem, pois têm uma estrutura aberta e flexível que facilita o acesso de proteases (61). Foi demonstrado que todos os dez locais de clivagem de MMP-2 previstos na estrutura da distrofina de rato estão no domínio *rod-shaped*, incluindo um na região do tipo *hinge* 4. Além disso, a distrofina parece estar discretamente colocalizada com MMP-2 no ventrículo esquerdo de ratos normotensos, o que aumenta a chance de sua proteólise por MMP-2.

De fato, o aumento da atividade de MMP-2 foi relacionado à redução de distrofina no ventrículo esquerdo de ratos do grupo E-LVH tanto por imunofluorescência quanto por western blot. O tratamento com doxiciclina parece evitar a perda discreta de distrofina cardíaca observada nos animais do grupo C-LVH por imunofluorescência e pode estar relacionado à preservação da função cardíaca e da estrutura dos cardiomiócitos nestes animais. Foi visto, em um estudo prévio, que a MMP-2 cliva a distrofina em corações de ratos submetidos à lesão miocárdica por isquemia e reperfusão e isto promoveu danos na estrutura dos cardiomiócitos, efeitos que foram prevenidos pelo uso de doxiciclina (34). Além disso, a clivagem do domínio *rod-shaped* da distrofina por uma protease enteroviral levou à perda da integridade do sarcolema de cardiomiócitos e isto contribuiu para o desenvolvimento de

cardiomiopatia dilatada (62). A perda de distrofina também pode levar à morte o cardiomiócito e, possivelmente, à disfunção cardíaca devido à perda de estabilidade da membrana plasmática e ao alto influxo de cálcio (63). Portanto, inibir a atividade da MMP-2 com o intuito de diminuir a proteólise de alvos intracelulares cardíacos, como a troponina I e a distrofina, pode ser uma boa estratégia farmacológica para prevenir o desenvolvimento de falência cardíaca na hipertensão arterial crônica.

Embora a doxiciclina seja um inibidor de MMPs de amplo espectro, ela tem sido utilizada como uma ferramenta farmacológica importante para reduzir a atividade da MMP-2 no sistema cardiovascular em estudos clínicos (64). É bem conhecido que a atividade da MMP-2 está aumentada em muitas doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão arterial. Ao realizar a zimografia em gel e o western blot, foi observado apenas bandas correspondentes à MMP-2 e não à MMP-9 no ventrículo esquerdo de ratos normotensos e hipertensos. Além disso, a MMP-2 é a principal MMP presente no coração que pode ser ativada intracelularmente. Portanto, os efeitos benéficos do tratamento com doxiciclina na transição de hipertrofia cardíaca concêntrica à excêntrica na hipertensão renovascular crônica se deva, principalmente, à inibição de sua atividade. Outros inibidores de MMPs também apresentam limitações, pois compartilham a não seletividade para MMP-2, além de terem restrições para uso *in vivo* e não serem disponíveis para uso por via oral. Camundongos homozigotos *knockout* para MMP-2 geralmente desenvolvem defeitos cardiovasculares e costumam não apresentar viabilidade para reprodução (65, 66).

Conclusão

6 CONCLUSÃO

A inibição da atividade de MMPs, especialmente de MMP-2, contribui para reduzir a transição do coração de hipertrofia concêntrica à excêntrica e a disfunção cardíaca na hipertensão renovascular crônica. Esta transição pode estar relacionada à proteólise de troponina I e distrofina induzida por MMP-2 no ventrículo esquerdo de ratos hipertensos. Os efeitos causados pela MMP-2 nos cardiomiócitos a tornam um alvo potencial a ser inibido para preservar a estrutura e a função cardíaca na hipertensão arterial crônica. Os resultados também mostraram uma utilidade potencial dos inibidores de MMPs como ferramentas farmacológicas para prevenir a evolução da hipertrofia cardíaca para falência na hipertensão arterial crônica.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation. 2021.

2. Barroso WKS, et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2021;116(3):516-658.

3. Gjesdal O, Bluemke DA, Lima JA. Cardiac remodeling at the population level--risk factors, screening, and outcomes. Nat Rev Cardiol. 2011;8(12):673-85.

4. Gavaghan M. Cardiac anatomy and physiology: a review. AORN J. 1998;67(4):802-22; quiz 24-8.

5. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. J Am Coll Cardiol. 2000;35(3):569-82.

6. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. J Am Soc Echocardiogr. 2005;18(12):1440-63.

7. Little RC, Little WC. Cardiac preload, afterload, and heart failure. Arch Intern Med. 1982;142(4):819-22.

8. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SA, Zornoff LA. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. Arq Bras Cardiol. 2016;106(1):62-9.

9. Schiattarella GG, Hill JA. Inhibition of hypertrophy is a good therapeutic strategy in ventricular pressure overload. Circulation. 2015;131(16):1435-47.

10. Pelouch V, Dixon IM, Golfman L, Beamish RE, Dhalla NS. Role of extracellular matrix proteins in heart function. Mol Cell Biochem. 1993;129(2):101-20.

11. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res. 2003;92(8):827-39.

12. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc Res. 2006;69(3):562-73.

13. Parente JM CM. Matrix metalloproteinase in the cardiovascular remodeling of hypertension: current insights and therapeutic potential. Metalloproteinases In Medicine. 2018;5:1-11.

14. Mujumdar VS, Smiley LM, Tyagi SC. Activation of matrix metalloproteinase dilates and decreases cardiac tensile strength. Int J Cardiol. 2001;79(2-3):277-86.

**De acordo com o estilo Vancouver.*

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

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

17. Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JR, Sawicki G, Schulz R. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. Circulation. 2002;106(12):1543-9.

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

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

20. Coker ML, Doscher MA, Thomas CV, Galis ZS, Spinale FG. Matrix metalloproteinase synthesis and expression in isolated LV myocyte preparations. Am J Physiol. 1999;277(2 Pt 2):H777-87.

21. Chow AK, Cena J, Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. Br J Pharmacol. 2007;152(2):189-205.

22. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. Circ Res. 2002;90(3):251-62.

23. Bode W, Maskos K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. Biol Chem. 2003;384(6):863-72.

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

25. Ali MA, Chow AK, Kandasamy AD, Fan X, West LJ, Crawford BD, et al. Mechanisms of cytosolic targeting of matrix metalloproteinase-2. J Cell Physiol. 2012;227(10):3397-404.

26. Lovett DH, Mahimkar R, Raffai RL, Cape L, Maklashina E, Cecchini G, et al. A novel intracellular isoform of matrix metalloproteinase-2 induced by oxidative stress activates innate immunity. PLoS One. 2012;7(4):e34177.

27. Lovett DH, Mahimkar R, Raffai RL, Cape L, Zhu BQ, Jin ZQ, et al. N-terminal truncated intracellular matrix metalloproteinase-2 induces cardiomyocyte hypertrophy, inflammation and systolic heart failure. PLoS One. 2013;8(7):e68154.

28. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol. 2001;17:463-516.

29. Muller AL, Dhalla NS. Role of various proteases in cardiac remodeling and progression of heart failure. Heart Fail Rev. 2012;17(3):395-409.

30. Rizzi E, Castro MM, Prado CM, Silva CA, Fazan R, Jr., Rossi MA, et al. Matrix metalloproteinase inhibition improves cardiac dysfunction and remodeling in 2-kidney, 1-clip hypertension. J Card Fail. 2010;16(7):599-608.

31. Peterson JT, Hallak H, Johnson L, Li H, O'Brien PM, Sliskovic DR, et al. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure. Circulation. 2001;103(18):2303-9.

32. Sung MM, Schulz CG, Wang W, Sawicki G, Bautista-Lopez NL, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 degrades the cytoskeletal protein alpha-actinin in peroxynitrite mediated myocardial injury. J Mol Cell Cardiol. 2007;43(4):429-36.

33. Sawicki G, Leon H, Sawicka J, Sariahmetoglu M, Schulze CJ, Scott PG, et al. Degradation of myosin light chain in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion injury: a new intracellular target for matrix metalloproteinase-2. Circulation. 2005;112(4):544-52.

34. Buchholz B, Perez V, Siachoque N, Miksztowicz V, Berg G, Rodriguez M, et al. Dystrophin proteolysis: a potential target for MMP-2 and its prevention by ischemic preconditioning. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2014;307(1):H88-96.

35. Kostin S, Hein S, Arnon E, Scholz D, Schaper J. The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart. Heart Fail Rev. 2000;5(3):271-80.

36. Prado FP, Dos Santos DO, Blefari V, Silva CA, Machado J, Kettelhut IDC, et al. Early dystrophin loss is coincident with the transition of compensated cardiac hypertrophy to heart failure. PLoS One. 2017;12(12):e0189469.

37. Bergman MR, Teerlink JR, Mahimkar R, Li L, Zhu BQ, Nguyen A, et al. Cardiac matrix metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic dysfunction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007;292(4):H1847-60.

38. Solaro RJ, Van Eyk J. Altered interactions among thin filament proteins modulate cardiac function. J Mol Cell Cardiol. 1996;28(2):217-30.

39. Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. Circ Res. 2004;94(8):1023-31.

40. Kawada T, Masui F, Tezuka A, Ebisawa T, Kumagai H, Nakazawa M, et al. A novel scheme of dystrophin disruption for the progression of advanced heart failure. Biochim Biophys Acta. 2005;1751(1):73-81.

41. Dubey RK, Oparil S, Imthurn B, Jackson EK. Sex hormones and hypertension. Cardiovasc Res. 2002;53(3):688-708.

42. Yaras N, Sariahmetoglu M, Bilginoglu A, Aydemir-Koksoy A, Onay-Besikci A, Turan B, et al. Protective action of doxycycline against diabetic cardiomyopathy in rats. Br J Pharmacol. 2008;155(8):1174-84.

43. Golub LM, Sorsa T, Lee HM, Ciancio S, Sorbi D, Ramamurthy NS, et al. Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. J Clin Periodontol. 1995;22(2):100-9.

44. Kumar S, Ratnikov BI, Kazanov MD, Smith JW, Cieplak P. CleavPredict: A Platform for Reasoning about Matrix Metalloproteinases Proteolytic Events. PLoS One. 2015;10(5):e0127877.

45. Berman HM, Battistuz T, Bhat TN, Bluhm WF, Bourne PE, Burkhardt K, et al. The Protein Data Bank. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2002;58(Pt 6 No 1):899-907.

46. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. Nucleic Acids Res. 2014;42(Web Server issue):W252-8.

47. Rodrigues JP, Levitt M, Chopra G. KoBaMIN: a knowledge-based minimization web server for protein structure refinement. Nucleic Acids Res. 2012;40(Web Server issue):W323-8.

48. Luthy R, Bowie JU, Eisenberg D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. Nature. 1992;356(6364):83-5.

49. Sievers F, Higgins DG. Clustal omega. Curr Protoc Bioinformatics. 2014;48:3 13 1-6.

50. Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. Nucleic Acids Res. 2014;42(Web Server issue):W320-4.

51. Schulze CJ, Wang W, Suarez-Pinzon WL, Sawicka J, Sawicki G, Schulz R. Imbalance between tissue inhibitor of metalloproteinase-4 and matrix metalloproteinases during acute myocardial ischemia-reperfusion injury. Circulation. 2003;107(19):2487-92.

52. Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. Circulation. 2000;102(4):470-9.

53. Hughes BG, Schulz R. Targeting MMP-2 to treat ischemic heart injury. Basic Res Cardiol. 2014;109(4):424.

54. Redon J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, et al. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. Hypertension. 2003;41(5):1096-101.

55. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. Cardiovasc Res. 2006;71(2):247-58.

56. Blascke de Mello MM, Parente JM, Schulz R, Castro MM. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation by oxidative stress decreases aortic calponin-1 levels during hypertrophic remodeling in early hypertension. Vascul Pharmacol. 2019;116:36-44.

57. Weber KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. Curr Opin Cardiol. 2000;15(4):264-72.

58. Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J. The role of the cytoskeleton in heart failure. Cardiovasc Res. 2000;45(2):273-8.

59. Hein S, Scholz D, Fujitani N, Rennollet H, Brand T, Friedl A, et al. Altered expression of titin and contractile proteins in failing human myocardium. J Mol Cell Cardiol. 1994;26(10):1291-306.

60. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. Cell. 1988;53(2):219-28.

61. Koenig M, Kunkel LM. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. J Biol Chem. 1990;265(8):4560-6.

62. Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, Martone ME, Campbell KP, Rhoads RE, et al. Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. Nat Med. 1999;5(3):320-6.

63. Celes MR, Malvestio LM, Suadicani SO, Prado CM, Figueiredo MJ, Campos EC, et al. Disruption of calcium homeostasis in cardiomyocytes underlies cardiac structural and functional changes in severe sepsis. PLoS One. 2013;8(7):e68809.

64. Schulze CJ, Castro MM, Kandasamy AD, Cena J, Bryden C, Wang SH, et al. Doxycycline reduces cardiac matrix metalloproteinase-2 activity but does not ameliorate myocardial dysfunction during reperfusion in coronary artery bypass patients undergoing cardiopulmonary bypass. Crit Care Med. 2013;41(11):2512-20.

65. Oh J, Takahashi R, Adachi E, Kondo S, Kuratomi S, Noma A, et al. Mutations in two matrix metalloproteinase genes, MMP-2 and MT1-MMP, are synthetic lethal in mice. Oncogene. 2004;23(29):5041-8.

66. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8(3):221-33.

Apêndice

APÊNDICE

Manuscrito submetido à revista *Biochemical Pharmacology* para publicação.

MMP Inhibition Attenuates Hypertensive Eccentric Cardiac Hypertrophy and Dysfunction by Preserving Troponin I and Dystrophin

Short title: MMP Inhibition Prevents Hypertensive Cardiac Dysfunction

Research Article

Juliana Montenegro Parente[a], MSc; Marcela Maria Blascke de Mello[a]; Pedro Henrique Leite da Silva[a]; Ana Carolina Mieko Omoto[b], PhD; Laena Pernomian[a], PhD; Isadora Sousa de Oliveira[c], MSc; Zabed Mahmud[d], MSc; Rubens Fazan Jr[b], PhD; Eliane Candiani Arantes[c], PhD; Richard Schulz[e], PhD and Michele Mazzaron de Castro[a], PhD

[a] Department of Pharmacology and [b] Department of Physiology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900, Ribeirao Preto, SP, Brazil; [c] Department of Biomolecular Sciences, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900, Ribeirao Preto, SP, Brazil; [d] Department of Biochemistry, 474 Medical Sciences Building, University of Alberta, Edmonton, Alberta, T6G 2R3, [e] Departments of Pediatrics and Pharmacology, University of Alberta, Mazankowski Alberta Heart Institute, 462 Heritage Medical Research Center, T6G 2S2 Edmonton, Canada.

Address for correspondence:

Prof. Dr. Michele Mazzaron de Castro, Department of Pharmacology
Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo
Av. Bandeirantes, 3900 - 14049-900, Ribeirao Preto, SP, Brazil
Phone: +55 16 33153038, FAX: +55 16 33150220, E-mail: castro@fmrp.usp.br

Abstract

Purpose: Cardiac transition from concentric (C-LVH) to eccentric left ventricle hypertrophy (E-LVH) is a maladaptive response of hypertension. Matrix metalloproteinases (MMPs) may contribute to tissue remodeling by proteolyzing extra- and intracellular proteins. Troponin I and dystrophin are two potential targets of MMP-2 in this study and their proteolysis would impair cardiac contractile function. We hypothesized that MMP-2 contributes to the decrease in troponin I and dystrophin in the hypertensive heart thus controlling the transition from C-LVH to E-LVH and cardiac dysfunction. **Methods:** Male Wistar rats were divided into sham or two kidney-1 clip (2K-1C) groups and treated with water (vehicle) or doxycycline (MMP inhibitor, 15 mg/kg/day) by gavage from the tenth to the sixteenth week post-surgery. Tail-cuff plethysmography, echocardiography, gelatin and *in situ* zymography, confocal microscopy, western blot, mass spectrometry, *in silico* protein analysis and immunofluorescence were performed. **Results:** About 25% of 2K-1C rats had E-LVH followed by reduced ejection fraction. The remaining had C-LVH with preserved cardiac function. Doxycycline prevents the transition from C- to E-LVH. MMP activity is increased in C- and E-LVH hearts, which was inhibited by doxycycline. This effect was associated with an increase in troponin I cleavage products and a decline in dystrophin levels in the left ventricle of E-LVH rats, which was prevented by doxycycline. **Conclusion:** Hypertension causes increased cardiac MMP activity which then proteolyzes troponin I and dystrophin, thus contributing to the transition from C- to E-LVH and cardiac dysfunction.

Key words: cardiac hypertrophy; matrix metalloproteinase; troponin I; dystrophin; hypertension.

1. Introduction

Left ventricular hypertrophy (LVH) is a risk factor for developing heart failure in hypertension. LVH is an adaptive morphological response to compensate for the strain on the left ventricle wall after sustained increase in blood pressure [1]. Concentric LVH (C-LVH) is illustrated by increased ventricular wall thickness with slight or no reduction of the left ventricle chamber volume as a result of cardiac myocyte hypertrophy [1, 2]. Eccentric LVH (E-LVH) eventually follows in an attempt to compensate for sustained left ventricle wall strain. The elongation of the cardiac myocytes results in enlarged left ventricle chamber volume and an increase in wall thickness. E-LVH is an important risk factor for heart failure in hypertension [2, 3]. Although fibrosis [4] and myocyte hypertrophy [5] are considered to be hallmarks of cardiac dysfunction, the derangement of cytoskeletal and contractile proteins in the sarcomere also notably contributes to it [6, 7]. Several proteases including matrix metalloproteinases (MMPs) are activated during the transition from C- to E-LVH in hypertension [8, 9].

MMP-2 is a zinc-dependent endopeptidase localized within cardiac myocytes [10]. Increased MMP-2 activity is generally observed in the left ventricle in different models of hypertension which contributes to LVH and contractile dysfunction [11]. Treatment with MMP inhibitors mitigates accentuated MMP-2 activity and cardiac remodeling in hypertensive and diabetic rats [11, 12]. MMP-2 proteolyzes many extracellular matrix proteins including collagen which is re-synthesized to contribute to hypertension-induced myocardial stiffness with diastolic/systolic dysfunction and failure [13]. Increased MMP activity contributed to left ventricle dilation and progression to failure in an obese rat model of spontaneous hypertensive heart failure, in which an MMP inhibitor attenuated this process [9]. However, the exact mechanism that MMP-2 contributes to it remains to be determined.

MMP-2 is also an ubiquitous, intracellular protease that is activated by peroxynitrite generated during the reperfusion of ischemic hearts whereby it proteolyzes several intracellular proteins including troponin I [14], myosin light chain I [15] and titin [16], leading to cardiac contractile dysfunction. Treatment with MMP inhibitors prevented the loss of cardiac troponin I in addition to improving cardiac contractile function [17, 18]. Given that troponin I is essential for efficient cardiac muscle contractile function, its proteolysis should contribute to the dysfunction that precedes heart failure. In fact, myocardial specific expression of active MMP-2 in mice resulted in the transition from C- to E-LVH accompanied by a reduction in ejection fraction and fractional shortening,

and a significant troponin I reduction [19]. However, whether troponin I is a potential target of MMP-2 and contributes to left ventricular dilation in hypertension has not been investigated.

Dystrophin is a cytoskeletal protein that links the extracellular matrix to intracellular actin, providing mechanical stability to the plasma membrane of cardiac myocytes [20]. Its loss notably leads to permeability defects in the plasma membrane which destabilize cardiac myocytes and results in heart failure [21]. In rat hearts subjected to ischemia and reperfusion injury, MMP-2 proteolyzes dystrophin in a doxycycline-inhibitable fashion [22]. Dystrophin was also decreased in the hearts of mice treated with the antitumor drug doxorubicin which causes cardiomyopathy [23]. The transition from C-LVH to E-LVH and failure was also accompanied by a loss in dystrophin in hearts from rats subjected to pressure overload by aortic stenosis [24]. Whether MMPs contribute to a decrease in cardiac dystrophin levels in chronic hypertension, thus contributing to the switch in cardiac architecture from C- to E-LVH, is unknown. We therefore hypothesized that increased MMP-2 activity contributes to the transition from C- to E-LVH and cardiac dysfunction in renovascular hypertension, partly through its proteolytic effects on troponin I and dystrophin.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Approval

All experimental protocols are in accordance with the standards defined by the Ethics Committee on Animal Research of Ribeirao Preto Medical School (protocol number: 023/2015-1), the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (NIH) and the National Council of Animal Experimentation Control (CONCEA).

2.2. Animals and Housing

Seven-week-old male Wistar rats (180-200g), obtained from the animal facility of the University of Sao Paulo, were maintained in the animal facility of the Department of Physiology at Ribeirao Preto Medical School with a 12h light/dark cycle at 25ºC and free access to water and chow. Three animals were housed in each cage.

2.3. Renovascular Hypertension

Rats were intraperitoneally anesthetized with ketamine (100 mg/kg, Syntec, Brazil) and xylazine (10 mg/kg, Syntec, Brazil) and two kidney, one clip (2K-1C)

hypertension was induced by the insertion of a 0.2 mm silver clip in the left renal artery [11]. Sham rats were submitted to the same anesthesia and laparotomy but without placing the silver clip. Flunixin meglumine (1.0 mL/kg in 0.9% saline, Schering-Plough Santé Animale, France) and oxytetracycline (0.5 mL/kg, Zoetis, Brazil) were administered subcutaneously and intramuscularly, respectively, to cause analgesia and prevent infection after surgery. This model of hypertension was done using male Wistar rats as it is known to cause severe cardiac afterload because of maladaptive arterial remodeling. In addition, ten weeks of 2K-1C hypertension also lead to an increase of cardiac MMP-2 activity and C-LVH [11]. In female rats, estrogen and progesterone may interfere with the cardiac remodeling in hypertension [25]. Systolic blood pressure (SBP) was registered weekly by tail-cuff plethysmography for sixteen weeks and the 2K-1C rats with SBP ≥ 180 mmHg in the tenth week were used for study. About 70% of the 2K-1C operated rats developed hypertension.

2.4. Experimental Design

From the tenth to the sixteenth week, Sham and 2K-1C rats were treated with doxycycline at 15 mg/kg/day [12] (broad-spectrum MMP inhibitor, Pharma Nostra, Brazil) or vehicle (water) by gavage. Doxycycline is an efficient MMP inhibitor [26] with the benefit of being orally administered. We defined C-LVH in the 2K-1C rats which presented with ejection fraction above 50%, increased diastolic left ventricle posterior wall thickness, and no alterations in the systolic left ventricle chamber diameter (in relation to Sham group). E-LVH was defined in rats with cardiac ejection fraction ≤ 50%, followed by reduced fractional shortening and increased systolic left ventricle chamber diameter at the sixteenth week. The experimental groups are represented in Figure 1 as follows: Sham rats treated with vehicle (Sham) or doxycycline (Doxy), 2K-1C rats with C-LVH treated with vehicle (C-LVH) or doxycycline (C-LVH+Doxy) and 2K-1C rats with E-LVH treated with vehicle (E-LVH) or doxycycline (E-LVH+Doxy). The group E-LVH+Doxy was not included in the graphs or statistical analyses as the number of rats in this condition was too small (n=2) for statistical comparison. Furthermore, one of the aims of this study is to understand the effect of MMP inhibition during the transition from C- to E-LVH and not its effect at E-LVH. A randomization of rats between groups and treatment was performed.

2.5. Tail-cuff Plethysmography

Rats were restrained and kept at 37ºC with a heated platform. Cuffs placed on their tail were connected to an acquisition system (CODA non-invasive blood pressure system, V.1.1, 2007, Kent Scientific Inc.). After a 30-min acclimatization period, at least three consecutive measurements of SBP were used to calculate the mean. SBP was measured before 2K-1C surgery and weekly until the sixteenth week.

2.6. Assessment of Cardiac Structure and Function by Echocardiography

Morphometry and cardiac functional parameters were blindly analyzed before 2K-1C surgery and ten and sixteen weeks post-surgery by Doppler echocardiography (Vevo 2100 System, Visual Sonics, Canada) with a 21 MHz probe. Rats were anesthetized with vaporized isoflurane (3.5% for induction and then 1-2% during the analysis) and placed on a heat-regulated plate (37-40□C) with paws connected to electrodes and positioned in dorsal decubitus for heart rate detection and two-dimensional M-mode image acquisition. Left ventricle posterior and anterior wall thickness, internal diameter of the left ventricle chamber, ejection fraction, fractional shortening and cardiac output were measured during systole and diastole off-line from parasternal long-axis images using the Vevo 2100 workstation.

2.7. Left Ventricle Sample Preparation

Rats were intraperitoneally anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and euthanized by an abdominal and thoracic incision. The heart was removed and perfused through the aorta with Krebs solution (in mM: 118 NaCl; 4.7 KCl; 1.2 KH2PO4; 1.6 MgSO4.7H2O; 24.9 NaHCO3; 11.1 glucose and 2.5 CaCl2.2H2O). A 1 M KCl solution was used to stop the heart at diastole. Left ventricle was isolated and snap frozen in liquid nitrogen and then kept at -70ºC for biochemical analysis. A piece of left ventricle was also inserted in Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek) for performing immunofluorescence or in situ zymography. Hearts were fixed in phosphate-buffered 10% formalin for histological measurements.

2.8. Assessment of Collagen Deposition and Cardiac Myocyte Morphology

Hearts were fixed in phosphate-buffered 10% formalin, pH 7.0, for 48 h and then dehydrated in 70% ethanol followed by paraffin inclusion. The left ventricle was cut in 5 µm sections and stained with Picrosirius Red and hematoxylin and eosin to determine collagen and the area of cardiac myocytes, respectively. Sections were

captured at 200x using the bright field of the microscope (Leica Camera, Germany and Carl Zeiss Microscopy Ltd.). Collagen was quantified by Image J after calculating the arithmetic mean of the red threshold percentages of five images for each sample. Cardiac myocyte area was accessed in their transversal position by measuring at least fifty cross-sectional cells areas per section by Image J.

2.9. Measurement of Cardiac MMP-2 Activity by Gelatin Zymography and In Situ Zymography

Frozen left ventricle was gently disrupted by a glass homogenizer that was at ice temperature. Protein extraction buffer containing protease inhibitors cocktail (#S8820; Sigma-Aldrich, USA), 1 mM sodium orthovanadate (#S6508; Sigma-Aldrich, USA) and 10 mM sodium fluoride (#201154; Sigma-Aldrich, USA) diluted in RIPA buffer (#R0278; Sigma-Aldrich, USA) was used to homogenize left ventricles. After an overnight incubation at 4ºC, the homogenates were centrifuged at 15,300g for 20 min at 4ºC and the supernatants were used as the ventricular extracts. Bradford reagent (#B6916; Sigma-Aldrich, USA) was used to quantify the protein concentration in the extracts.

To assess MMP-2 activity, left ventricle extracts (60 µg protein each) were mixed in non-reducing buffer (0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 30% glycerol, 10% sodium dodecyl sulphate and 0.179 mM bromophenol blue), loaded onto an 8% polyacrylamide gel co-polymerized with gelatin, and submitted to electrophoresis. Gels were incubated with 2.5% v/v Triton X-100 twice for 30 min each at room temperature and then incubated with an activator buffer (150 mM NaCl, 5 mM CaCl2 .2H2O, 50 mM Tris, pH 7.6) for 16 h at 37°C. Gels were stained with 0.05% Coommassie Blue G-250 (diluted in 25% methanol and 10% acetic acid) and then bleached with 30% methanol and 10% acetic acid buffer. The 72 kDa MMP-2 was detected as clear bands against Coommassie Blue-stained background gel and quantified by Image J.

To analyze in situ gelatinolytic MMP activity, Tissue-Tek OCT-embedded left ventricle cryosections were hydrated in PBS for 10 min. Sections were incubated with dye-quenched gelatin (1 mg/mL, #D12054, ThermoFisher, diluted 1:10 in activator buffer (150 mM NaCl, 5 mM CaCl2.2H2O, 50 mM Tris, pH 7.6) in a dark, humidified chamber, for 1 h, 37ºC). Left ventricle section was then fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min, washed with PBS and quickly stained with DAPI. Images were captured at 400x with a fluorescence microscope (Leica TCS SPE). The green fluorescence

representing the gelatinolytic activity was quantified by ImageJ. The arithmetic mean of the fluorescent three different areas intensity was calculated for each sample. Negative controls were done by incubating the sections only with PBS (no fluorescence was observed; data not shown). Representative images were obtained by incubating the sections with the membrane marker Wheat Germ Agglutinin (WGA) Texas Red-X Conjugated (1:500; #W21405, Invitrogen, USA) for 1 h. WGA was used to delimit the membrane of the cardiac myocytes to facilitate our observation of green intracellular gelatinase activity.

2.10. Western Blot to Detect Troponin I and TIMPs Levels in Left Ventricular Extracts

Left ventricle extracts (60 µg protein each) were mixed to a reducing buffer (0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 30% glycerol, 0.6 M DTT, 10% sodium dodecyl sulphate and 0.179 mM bromophenol blue), heated for 5 min at 95ºC and loaded onto 12% polyacrylamide gels. After electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Germany) using a wet transfer apparatus (#TE22 Mini Tank Transfer Unit, GE Healthcare, Germany) at 100 V for 1 h and 15 min. The membranes were blocked for 2 h with 5% milk and then incubated for 16 h at 4ºC with the following primary antibodies: mouse anti-troponin I (1:10,000, #MA-1040, IPOCdx, Canada), mouse anti-TIMP-2 (1:5,000, #MAB13446, RRID: AB_94170, Millipore, USA), rabbit anti-TIMP-4 (1:5,000, #ab58425, RRID: AB_883025, Abcam, USA) and rabbit anti-S6 ribosomal protein (1:5,000, #2217, RRID: AB_331355, Cell Signaling). All membranes were probed with polyclonal mouse or rabbit anti-IgG horseradish peroxidase conjugated antibodies (1:10,000, #12-349, #12-348, Millipore, USA) for 1 h. Bands were visualized by ECL chemiluminescence (#32106, Thermo Fisher Scientific) with an Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Germany). Band intensities, including proteolytic products of troponin I, were quantified by using Image J. Western blots to detect the possible presence of MMP-9 were also done using the above-mentioned protocol, however, no signal was detected.

2.11. Immunofluorescence of Dystrophin

Left ventricle sections were fixed with cold acetone for 5 min, washed with 0.1 M PBS and 0.03% v/v Triton-X 100, pH 7.3. After 1 h blocking with 10% donkey serum (#S-30, Millipore, USA), sections were incubated in a humidified chamber with rabbit anti-dystrophin antibody (1:50; #sc-15376, RRID: AB_2091230, Santa Cruz

Biotechnology) for 1 h at room temperature. Sections were washed with 0.03% v/v Triton-X 100 and 0.1 M PBS and incubated for 1 h with donkey anti-rabbit Alexa 488 secondary antibody (1:100; #A21206, RRID: AB_2535792, Life Technologies, USA) and WGA (1:500; #W21405, Invitrogen) followed by DAPI. Images were captured by fluorescence microscopy (Leica TCS SPE, Germany) at 400x. Dystrophin was identified in left ventricles as green fluorescence and was quantified after adding 40 squares with the same area thorough the image by the ImageJ, and the arithmetic mean was calculated. As negative controls, left ventricle sections were incubated with PBS or secondary antibodies (no fluorescence was observed).

2.12. Confocal Microscopy to Co-localize MMP-2 with Troponin I in the Left Ventricles

Left ventricles embedded in Tissue-Tek OCT was cryosectioned at 5 µm. Sections were fixed with 4% v/v paraformaldehyde for 15 min and incubated with a blocking buffer (1% m/v bovine albumin serum, 0.3 M glycine and 0.1% v/v PBS-Tween) for 1 h. The following primary antibodies were then used together for 16 h at 4°C: mouse anti-MMP-2 (1:200; #MAB3308, RRID: AB_2235453, Millipore, USA) and rabbit anti-troponin I (1:150; #ab47003, Abcam, USA). The secondary antibodies were incubated together for 1 h at room temperature: rabbit anti-FITC (1:250; #FI-1000, Vector Laboratories, USA) and mouse anti-Cy3 (1:250; #AP192C, RRID: AB_92642, Millipore, USA). Fluoroshield® with DAPI (#F6057, Sigma-Aldrich, USA) was used to stain cardiac myocyte nuclei by overnight incubation at 4°C. Sections were sealed with formaldehyde-free colorless varnish at 4°C until completely dry. Images were acquired using confocal microscopy at 630x (Leica TSC SPE, Germany). The Leica Application Suite Advanced Fluorescence Lite 2.3.0 software (Leica Microsystems) was used to capture both single and merged images on TCS SPE xyz mode, with 400Hz frequency and 1024x1024 format (argon 488 nm, diode 405 nm and HeNe 532 nm). The co-localization of troponin I and MMP-2 was analyzed by the Mander’s coefficient (Coloc 2, FIJI software, NIH, USA). Each area of the picture was used to obtain the split Mander’s coefficient for channel (M1 and M2). Coefficients show the percentage of red dye that shares the same location with the green dye. Negative control was performed by incubating the sections with the secondary antibodies anti-FITC and anti-Cy3 and the Fluoroshield with DAPI. Only DAPI fluorescence was seen in the negative control (data not shown).

2.13. Mass Spectrometry Analysis for Troponin I from Electrophoretic Bands of Left Ventricles Extracts

Protein bands of interest were excised from SDS-PAGE, reduced, alkylated and digested with sequencing grade porcine pancreatic trypsin 10 ng/µL (Promega, USA) and analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) with time of flight (TOF) analyzer (ultrafleXtreme, Bruker Corporation, USA), with the software flexControl 4.0 (Bruker Corporation, USA) for data acquisition. UltrafleXtreme was calibrated with a mixture of peptides (Peptide Calibration Standard II, ~700-3500 Da, #8222570, Bruker Corporation, USA). The parameters used to obtain data were 1500 laser shots per spectrum, 1000 Hz laser frequency and the instrument operating in reflectron positive mode, within a range of 700 to 5000 Da. As matrix, a saturated solution of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix was prepared in acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid (v/v), at the ratio of 1:1 (v/v). Data analysis was performed by flex Analysis 3.4 (Bruker Corporation, USA), BioTools 3.2 (Bruker Corporation, USA) and Sequence Editor 3.2 (Bruker Corporation, USA). Digested peptides were also submitted to MS/MS fragmentation with the same instrument and software for data acquisition. UltrafleXtreme was operated in MS/MS mode and MS/MS spectra were interpreted with the same software used for data analysis the following parameters: MS/MS error tolerance set at 1.5 Da, carbamidomethyl cysteine was fixed modification, while oxidation of methionine and phosphorylation of threonine were variable modifications, and three missed cleavages per peptide.

2.14. *In silico* Prediction of MMP-2 Cleavage Sites in Rat Dystrophin

The amino acid sequence of rat dystrophin (UniProtKB- P11530) was retrieved from Uniprot (https://uniprot.org) and submitted to CleavPredict (http://cleavpredict.sanfordburnham.org/) [27] to predict putative MMP-2 cleavage sites in rat dystrophin. This generates a list of putative cleavage sites and resulting fragment sizes of the target substrate based on the position weight matrix (PWM) algorithm. CleavPredict also considers the secondary structures and disordered regions of proteins to make predictions. Currently, there is no 3D structure of spectrin-like repeat domains in rat dystrophin available in the Protein data bank (www.rcsb.org) [28]. The spectrin 1 domain of rat dystrophin was modeled by homology modeling using Swiss-MODEL [29] with the template of spectrin 1 from human dystrophin (UniProtKB-P11532). It showed 86.8% of sequence identity to the spectrin 1 domain of rat

dystrophin. The structure was refined using KobaMIN [30]. The refined structure was finally evaluated and verified by the Structural Analysis and Verification Server (SAVES) [31]. Pymol (v 2.1.1) was used to visualize and generate a 3D structure of the spectrin 1 domain of dystrophin. Multiple sequence alignments between rat and human dystrophin was performed using Clustal Omega [32] and ESPript 3.0 (http://espript.ibcp.fr) [33].

2.15. Statistical Analysis

Data were analyzed in an observer-blinded fashion by two-way ANOVA with the GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, USA). Unpaired t test was also used to compare C-LVH vs. E-LVH since C-LVH is considered the control group for E-LVH. Statistically significant values were considered with $p<0.05$. Data are presented as mean values ± standard error of the mean (SEM). The confocal microscopy studies were designed to have three rats per group since the objective was to show the qualitative co-localization of MMP-2 with troponin I in the left ventricle.

3. Results

3.1. Doxycycline Reduces the Transition from C-LVH to E-LVH and Cardiac Dysfunction in Chronic Renovascular Hypertension

At sixteen weeks, the 2K-1C rats had increased SBP when compared to Sham and Doxy groups (Fig. 2A). The increased SBP began one week after surgery and remained elevated for sixteen weeks. By echocardiography, we observed that 2K-1C rats presenting with C-LVH at ten weeks of hypertension had increased left ventricle posterior and anterior wall thickness in diastole and no changes in the systolic left ventricle internal chamber diameter (vs. Sham, Fig. 2B). The C-LVH rats also showed no changes in ejection fraction or fractional shortening when related to Sham groups. Interestingly, at sixteen weeks, we observed that 6 of 23 rats (about 25%) presented the E-LVH profile as shown by the reduction of left ventricle posterior wall thickness and an increase in the systolic left ventricular internal chamber diameter (Fig. 2B and Table 1). The E-LVH rats start to develop cardiac dysfunction as denoted by a reduction in ejection fraction (≤ 50%), fractional shortening and cardiac output (Fig. 2B and Table 1). Therefore, to test whether inhibition of MMP-2 activity prevents the transition from cardiac hypertrophy to dysfunction, 2K-1C rats were treated with doxycycline starting at tenth to the sixteenth week post-surgery. Although doxycycline

did not reduce SBP in hypertensive rats at sixteen weeks (Fig. 2A), it reduces the prevalence of 2K-1C rats that developed E-LVH (2 of 18 C-LVH rats treated with doxycycline progressed to demonstrate E-LVH (about 11%, Fig. 2B and Table 1). No changes were observed in the heart rate among groups (Table 1). Both C- and E-LVH hypertensive rats showed reduced body weight (Table 1) which was not affected by doxycycline. The heart to body weight ratio was higher in C-LVH and E-LVH rats when compared to Sham and Doxy groups and doxycycline did not decrease it (Table 1). The percentage of collagen deposition in the left ventricles was higher in C- and E-LVH hypertensive rats ($p<0.05$ in the E-LVH vs. Sham groups, Fig. 2C) and the cross-sectional area of cardiac myocytes was increased in C- and E-LVH rats and doxycycline reduced it in the C-LVH group ($p<0.05$, Fig. 2C).

3.2. Doxycycline Reduced Increased MMP-2 Activity Without Interfering With TIMP-4 in the Hearts From 2K-1C Rats

MMP-2 notably contributes to cardiac hypertrophy in hypertension [11]. Increased MMP-2 activity was seen in the left ventricles of hypertensive rats by both in situ and gelatin zymography. Gelatin zymography analysis showed that 72 kDa MMP-2 activity was increased in the left ventricles of C- and E-LVH rats (Fig. 3A, $p<0.05$ vs. Sham groups). No bands corresponding to MMP-9 activity were observed in gelatin zymography (Fig. 3A) or western blot in any group (data not shown). That doxycycline did not reduce the increased MMP-2 activity in the hypertensive hearts may be due to doxycycline detaching itself from the catalytic domain of MMPs during sample preparation and electrophoresis for gelatin zymography. In situ zymography showed an increase in the gelatinolytic activity in left ventricles of 2K-1C rats ($p<0.05$ in the C-LVH vs. Sham groups), and treatment with doxycycline prevented this effect ($p<0.05$, Fig. 3B).

TIMP-4 is an endogenous tissue inhibitor of MMPs in cardiac myocytes [34]. TIMP-4 levels were increased in the left ventricles of 2K-1C rats (Fig. 4A), perhaps as a mean to compensate for the accentuated MMP-2 activity. Although doxycycline decreased the in situ gelatinolytic activity in the left ventricles of 2K-1C, it did not alter TIMP-4. On the other hand, TIMP-2 levels were only increased in the left ventricles of C-LVH rats and treatment with doxycycline decreased it (Fig. 4B). TIMP-2 was not altered in the left ventricle from E-LVH when compared to Sham and Doxy groups.

3.3. Doxycycline Decreased the Appearance of Troponin I Proteolytic Products and Inhibited the Loss of Dystrophin During E-LVH in Chronic Hypertension

Using confocal fluorescence microscopy, we found that MMP-2 (red) was localized with troponin I (green) in the left ventricular sections of sham rat hearts (Fig. 5A). The co-localization was confirmed from the Mander's coefficient analysis (tM1 = 0.63□0.05 and tM2 = 0.67□0.05, n=3). MMP-2 is co-localized with troponin I and proteolyzes it in the left ventricles of rat hearts subjected to myocardial ischemia and reperfusion injury [14]. There was an increase in a putative proteolytic product of troponin I (~20 kDa) in the E-LVH rats when related to C-LVH (Fig. 5B), although no changes were seen in the 30 kDa troponin I bands. This effect may be consequence of increased MMP activity in the hypertensive rat left ventricle and possibly one of the causes that contributes to cardiac dysfunction. Mass spectrometric analysis confirmed the presence of troponin I proteolytic products in the left ventricles of E-LVH rats. Figure 5C shows 55% and 54% coverage of the 20 kDa rat troponin I cleaved product in the left ventricle of C- and E-LVH rats when compared with its entire sequence (Fig. 5D), amongst the number of peptides found. Coverage values were calculated considering similar amino acids between rat troponin I samples and the entire Rattus norvegicus protein (211 amino acids) from UniProt database (UniProtKB – P23693). Figure 5C also shows the amino acid sequences of troponin I cleavage products from C- and E-LVH hypertensive rat hearts detected by mass spectrometry (in red) related to the intact rat troponin I sequence. The fragments of troponin I that were not found by mass spectrometry correspond to its N-terminal domain and part of its C-terminal domain, among others shown in black in Figure 5C. Furthermore, the comparison of primary amino acids sequence of rat and human troponin I (UniProtKB – P19429) showed 91.9% homology (194 amino acids) throughout its entire sequence (Fig. 5D). Figure 5E shows 70% coverage of the 30 kDa rat troponin I in the left ventricle of Sham rat when compared with its entire sequence.

Dystrophin loss notably leads to permeability defects in the plasma membrane and destabilizes cardiac myocytes that contribute to contractile dysfunction. Increased MMP activity may affect dystrophin levels in chronic hypertension. In silico analysis by CleavPredict revealed several putative MMP-2 cleavage sites in rat dystrophin. Most of the structure of dystrophin is composed of spectrin-like repeats which are rod-shaped, three-helix bundle structures (Fig. 6A and C). A list of top ten putative cleavage sites in dystrophin by MMP-2 was made according to their PWM score (Fig. 6B).

CleavPredict calculated the molecular weight of the N- and C-terminal fragments of dystrophin from the P1 position of the cut sites. All ten possible cleavage sites were found in spectrin-like repeat domains of dystrophin, except one that was found in the hinge 4 domain. Spectrin domains comprise most of dystrophin between hinge 1 and 4 domains and, thus, these nine predicted MMP-2 cleavage sites in multiple spectrin domains should generate a broad range of masses in the cleavage fragments. Sequence alignment of rat and human dystrophin showed 91.6% homology and the presence of conserved amino acid residues throughout the entire sequence. The results also show significant similarities in the top ten cleavage sites from P3-P3' position (Fig. 6D) in rat and human dystrophin, which suggest the presence of possible MMP-2 mediated cleavage sites also in human dystrophin. Interestingly, decreased levels of dystrophin appeared only in the E-LVH rats ($p<0.05$ vs. Sham) and treatment with doxycycline reduced this effect ($p<0.05$, Fig. 7).

3. Discussion

We show for the first time that inhibiting MMP-2 activity with doxycycline prevents the loss of troponin I and dystrophin in the left ventricle of rats subjected to chronic hypertension and helps to reduce the transition from C- to E-LVH and cardiac dysfunction, even without reducing SBP. The main novelty here is to show this potential intracellular mechanism that MMP-2 may use to contribute to the transition from concentric to eccentric cardiac remodeling in hypertension. Therefore, MMP inhibitors such as doxycycline may be an attractive pharmacological tool to reduce hypertension-induced maladaptive cardiac remodeling and dysfunction, and possibly, the development of heart failure.

During hypertension, the structure of the left ventricle adapts to compensate for the resulting strain of enhanced blood pressure and in attempt to restore normal cardiac function. C-LVH is especially characterized by an increase in both anterior and posterior left ventricle wall thickness, which is followed by a discrete or no alteration in the chamber diameter with preserved function [1]. We observed that most 2K-1C rats presented with C-LVH at ten weeks of hypertension as seen by an increase in the left ventricle posterior and anterior wall thickness in diastole, with no changes in systolic internal chamber diameter. The C-LVH rats also had preserved ejection fraction and fractional shortening. It was previously shown that treatment with doxycycline completely restored these hypertrophic features at ten weeks of 2K-1C hypertension

[11]. However, we decided to study here whether doxycycline prevents the transition from C- to E-LVH in chronic hypertension, and therefore, rats were treated with the MMP inhibitor from the tenth to the sixteenth week. We show that nearly 25% of 2K-1C rats had E-LVH with reduced ejection fraction at 16 weeks of hypertension. The E-LVH rats had increased left ventricle internal chamber diameter and a higher percentage of collagen deposition, which may contribute to reduced cardiac contractile performance. It is well known that increased collagen deposition in the left ventricles contributes to chamber rigidity and cardiac failure in hypertension [10]. Although treatment with doxycycline did not reduce the higher collagen content in the left ventricle of hypertensive rats, it reduced the increase in cardiac myocyte cross-sectional area in the C-LVH rats, which may be a valuable effect to restore the cardiac structure. Furthermore, inhibition of MMPs prevented many biochemical changes observed here in the heart from C-LVH to E-LVH, thus helping to stop 2K-1C hypertension to fully establish the eccentric remodeling.

Increased MMP activity also contributed to cardiac dilation and progression to failure in an obese rat model of spontaneously hypertensive heart failure, an effect that was prevented by an MMP inhibitor [9]. A minority of hypertensive rats presented with an ejection fraction less than 50% at ten weeks of hypertension (Figure 2), and those which were then treated with doxycycline in this situation had no amelioration of the cardiac parameters. Our data shows that the use of an MMP inhibitor for chronic cardiac remodeling may be more efficient in preventing the transition to E-LVH and before hypertension-induced cardiac contractile dysfunction and potential failure.

In addition to proteolyze cardiac extracellular matrix proteins, MMP-2 is the only MMP activated inside cardiac myocytes directly by oxidative stress and proteolyzes intracellular proteins to cause cardiac contractile dysfunction in many cardiovascular pathologies [35]. There are three intracellular isoforms of MMP-2 which localize with diverse proteins [35]. One of these is the canonical 72 kDa MMP-2 that contains an inefficient signal sequence which only partially directs it to the secretory pathway of cells [36]. There is also an N-terminal splice variant of MMP-2 that lacks the first 50 amino acids in its signal sequence which also maintains it within the cell [36]. There is also an MMP-2 isoform lacking the first 76 amino acids that is additionally expressed at or near mitochondria in response to oxidative stress [37]. We observed by in situ zymography that there was increased gelatinase activity within cardiac myocytes of hypertensive rats and doxycycline decreased this activity. This increased gelatinase

activity most likely represents that of MMP-2 as we did not observe any MMP-9 bands when the gelatin zymography was performed in the same samples. Gelatin and in situ zymography are techniques used to evaluate the activities of MMP-2 and MMP-9. We do not exclude the importance of others MMPs to contribute to the cardiac remodeling, however, other techniques should be performed to analyze their activities. MMP-2 can also be activated by peroxynitrite via the S-glutathiolation of a cysteine domain in its propeptide [38], [39], [40] and then contributes to the proteolysis of troponin I and then cardiac dysfunction [14].

Although fibrosis and cardiac myocyte hypertrophy are considered critical markers for heart failure [41], the derangement of cytoskeletal and contractile proteins in the sarcomere also contributes to its development [42], [43]. As we confirmed that MMP-2 and troponin I are in fact co-localized in cardiac myocytes [14], we investigated whether MMP-2 contributes to cleave troponin I in the transition from C- to E-LVH in hypertension. Increased MMP-2 activity contributes to troponin I proteolysis in the left ventricles of E-LVH rats as we observed an increase in 20 kDa proteolytic products of it by western blot and mass spectrometry. It is possible that increased MMP-2 activity triggers the proteolysis of troponin I in left ventricle of hypertensive rats and contributes to the hypertension-induced impaired cardiac function in the E-LVH profile.

In addition to troponin I, we also analyzed the potential effects of MMP-2 on dystrophin in the left ventricles of 2K-1C rats. Dystrophin is a cytoskeletal protein that offers mechanical stability to the plasma membrane of cardiac myocytes [20]. Its loss destabilizes the myocyte membrane and contributes to cardiac dysfunction. Dystrophin has four important regions: N-terminal, rod-shaped, cysteine-rich and C-terminal. The N-terminal domain begins with two calponin-like regions that serve as actin-binding sites; the C-terminal and cysteine-rich domains contain binding sites for syntrophin and dystroglycan; the N- and C-terminal domains are connected by a domain with 24 spectrin-like repeats, also known as the rod-shaped domain. There are also four hinge regions at the beginning and inside the rod domain [44]. The four hinge segments inside the rod domain of dystrophin are sensitive to protein cleavage as these regions have a flexible open structure that is conducive to protease cleavage [45]. Here we showed that all ten predicted MMP-2 cleavage sites in rat dystrophin are in the rod-domain, including one at hinge 4. In fact, increased MMP activity contributed to reduce the levels of dystrophin in the left ventricles of E-LVH rats. Treating C-LVH rats with doxycycline prevented the loss in cardiac dystrophin and may be related to the

preservation of cardiac function in these rats. MMP-2 proteolyzes dystrophin in rat hearts submitted to ischemia and reperfusion injury and causes damage in cardiac myocytes, an effect that was also prevented by doxycycline [22]. Cleavage of the rod-domain of dystrophin by an enteroviral protease led to the loss of cardiac myocyte sarcolemma integrity, thus contributing to the development of dilated cardiomyopathy [46]. Lack of dystrophin may also lead to cardiac myocyte death and possibly cardiac dysfunction due to membrane instability and high calcium influx [47]. Therefore, inhibiting MMP activity to decrease the proteolysis of cardiac intracellular proteins, such as troponin I and dystrophin, may be a good pharmacological strategy to prevent the development of heart failure in hypertension.

TIMP-4 may inhibit the activity of intracellular MMP-2 during myocardial ischemia and reperfusion injury [34] in contrast to TIMP-2, which generally inhibits MMP-2 extracellularly. Here we showed that TIMP-4, but not TIMP-2, was increased in the left ventricles of E-LVH rats. An increase in TIMP-4 may compensate for the augmented proteolytic effects of MMP-2 on intracellular targets such as troponin I and dystrophin, however, more work needs to be done to test this hypothesis.

Although doxycycline is a broad spectrum MMP inhibitor, it has been gradually used in many clinical trials as an important tool to reduce the activity of MMP-2 in the cardiovascular system [48]. It is well known that MMP-2 activity is notably increased in many cardiovascular diseases including hypertension. By gelatin zymography, we observed here only bands corresponding to MMP-2 and not MMP-9. Also, MMP-2 is the major MMP shown to be present and active intracellularly, and then, doxycycline likely inhibiting it in the transition from C- to E-LVH in hypertension. Many others MMP inhibitors do also present limitations as they share the non-specificity to MMP-2 in addition to being prohibitively for in vivo use and often not orally available. MMP-2 knockout mice possibly develop cardiovascular defects in addition to be potentially lethal when MMP-2 is deleted together with MMP-14 [49, 50].

In conclusion, inhibition of MMP activity, specially MMP-2, contributes to reduce the transition from C- to E-LVH and potentially cardiac contractile dysfunction in hypertension. This effect may be associated with MMP-induced proteolysis of troponin I and dystrophin in the left ventricles of hypertensive rats, which are vital sarcomeric and cytoskeletal proteins of cardiac myocytes. These effects caused by MMP-2 in cardiac myocytes makes it a potential target to be inhibited to preserve transition to eccentric cardiac remodeling and failure in chronic hypertension. The results also show

the potential utility of MMP inhibitors as pharmacological tools to prevent the evolution of cardiac hypertrophy to failure in chronic hypertension.

Acknowledgments

We thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant numbers: #2014/11412-0 and #2016/09345-9 to M.M.C., #2004/08868-0 to L.P. and #2017/03580-9 to I.S.O.); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number #401725/2016-2 to M.M.C.); and the Canadian Institutes of Health Research (Foundation grant number: 143299 to R.S.) for the financial support that was received to perform this study.

Disclosures

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

[1] B.H. Lorell, B.A. Carabello, Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis, Circulation 102(4) (2000) 470-9.

[2] B.C. Berk, K. Fujiwara, S. Lehoux, ECM remodeling in hypertensive heart disease, J Clin Invest 117(3) (2007) 568-75.

[3] W. Nadruz, Myocardial remodeling in hypertension, Journal of human hypertension 29(1) (2015) 1-6.

[4] C.H. Conrad, W.W. Brooks, J.A. Hayes, S. Sen, K.G. Robinson, O.H. Bing, Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat, Circulation 91(1) (1995) 161-70.

[5] T. Onodera, T. Tamura, S. Said, S.A. McCune, A.M. Gerdes, Maladaptive remodeling of cardiac myocyte shape begins long before failure in hypertension, Hypertension 32(4) (1998) 753-7.

[6] A. Gupta, S. Gupta, D. Young, B. Das, J. McMahon, S. Sen, Impairment of ultrastructure and cytoskeleton during progression of cardiac hypertrophy to heart failure, Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 90(4) (2010) 520-30.

[7] V. Sequeira, L.L. Nijenkamp, J.A. Regan, J. van der Velden, The physiological role of cardiac cytoskeleton and its alterations in heart failure, Biochimica et biophysica acta 1838(2) (2014) 700-22.

[8] Y. Iwanaga, T. Aoyama, Y. Kihara, Y. Onozawa, T. Yoneda, S. Sasayama, Excessive activation of matrix metalloproteinases coincides with left ventricular remodeling during transition from hypertrophy to heart failure in hypertensive rats, Journal of the American College of Cardiology 39(8) (2002) 1384-91.

[9] J.T. Peterson, H. Hallak, L. Johnson, H. Li, P.M. O'Brien, D.R. Sliskovic, T.M. Bocan, M.L. Coker, T. Etoh, F.G. Spinale, Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure, Circulation 103(18) (2001) 2303-9.

[10] B.G. Hughes, R. Schulz, Targeting MMP-2 to treat ischemic heart injury, Basic Res Cardiol 109(4) (2014) 424.

[11] E. Rizzi, M.M. Castro, C.M. Prado, C.A. Silva, R. Fazan, Jr., M.A. Rossi, J.E. Tanus-Santos, R.F. Gerlach, Matrix metalloproteinase inhibition improves cardiac dysfunction and remodeling in 2-kidney, 1-clip hypertension, J Card Fail 16(7) (2010) 599-608.

[12] N. Yaras, M. Sariahmetoglu, A. Bilginoglu, A. Aydemir-Koksoy, A. Onay-Besikci, B. Turan, R. Schulz, Protective action of doxycycline against diabetic cardiomyopathy in rats, Br J Pharmacol 155(8) (2008) 1174-84.

[13] V.S. Mujumdar, L.M. Smiley, S.C. Tyagi, Activation of matrix metalloproteinase dilates and decreases cardiac tensile strength, Int J Cardiol 79(2-3) (2001) 277-86.

[14] W. Wang, C.J. Schulze, W.L. Suarez-Pinzon, J.R. Dyck, G. Sawicki, R. Schulz, Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury, Circulation 106(12) (2002) 1543-9.

[15] G. Sawicki, H. Leon, J. Sawicka, M. Sariahmetoglu, C.J. Schulze, P.G. Scott, D. Szczesna-Cordary, R. Schulz, Degradation of myosin light chain in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion injury: a new intracellular target for matrix metalloproteinase-2, Circulation 112(4) (2005) 544-52.

[16] M.A. Ali, W.J. Cho, B. Hudson, Z. Kassiri, H. Granzier, R. Schulz, Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury, Circulation 122(20) (2010) 2039-47.

[17] A.M. Murphy, H. Kogler, D. Georgakopoulos, J.L. McDonough, D.A. Kass, J.E. Van Eyk, E. Marban, Transgenic mouse model of stunned myocardium, Science 287(5452) (2000) 488-91.

[18] X. Huang, Y. Pi, K.J. Lee, A.S. Henkel, R.G. Gregg, P.A. Powers, J.W. Walker, Cardiac troponin I gene knockout: a mouse model of myocardial troponin I deficiency, Circulation research 84(1) (1999) 1-8.

[19] M.R. Bergman, J.R. Teerlink, R. Mahimkar, L. Li, B.Q. Zhu, A. Nguyen, S. Dahi, J.S. Karliner, D.H. Lovett, Cardiac matrix metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic dysfunction, American journal of physiology. Heart and circulatory physiology 292(4) (2007) H1847-60.

[20] K.A. Lapidos, R. Kakkar, E.M. McNally, The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma, Circ Res 94(8) (2004) 1023-31.

[21] T. Kawada, F. Masui, A. Tezuka, T. Ebisawa, H. Kumagai, M. Nakazawa, T. Toyo-Oka, A novel scheme of dystrophin disruption for the progression of advanced heart failure, Biochimica et biophysica acta 1751(1) (2005) 73-81.

[22] B. Buchholz, V. Perez, N. Siachoque, V. Miksztowicz, G. Berg, M. Rodriguez, M. Donato, R.J. Gelpi, Dystrophin proteolysis: a potential target for MMP-2 and its prevention by ischemic preconditioning, Am J Physiol Heart Circ Physiol 307(1) (2014) H88-96.

[23] E.C. Campos, J.L. O'Connell, L.M. Malvestio, M.M. Romano, S.G. Ramos, M.R. Celes, C.M. Prado, M.V. Simoes, M.A. Rossi, Calpain-mediated dystrophin disruption may be a potential structural culprit behind chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy, Eur J Pharmacol 670(2-3) (2011) 541-53.

[24] F.P. Prado, D.O. Dos Santos, V. Blefari, C.A. Silva, J. Machado, I.D.C. Kettelhut, S.G. Ramos, M.D. Baruffi, H.C. Salgado, C.M. Prado, Early dystrophin loss is coincident with the transition of compensated cardiac hypertrophy to heart failure, PLoS One 12(12) (2017) e0189469.

[25] R.K. Dubey, S. Oparil, B. Imthurn, E.K. Jackson, Sex hormones and hypertension, Cardiovasc Res 53(3) (2002) 688-708.

[26] L.M. Golub, T. Sorsa, H.M. Lee, S. Ciancio, D. Sorbi, N.S. Ramamurthy, B. Gruber, T. Salo, Y.T. Konttinen, Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva, J Clin Periodontol 22(2) (1995) 100-9.

[27] S. Kumar, B.I. Ratnikov, M.D. Kazanov, J.W. Smith, P. Cieplak, CleavPredict: A Platform for Reasoning about Matrix Metalloproteinases Proteolytic Events, PLoS One 10(5) (2015) e0127877.

[28] H.M. Berman, T. Battistuz, T.N. Bhat, W.F. Bluhm, P.E. Bourne, K. Burkhardt, Z. Feng, G.L. Gilliland, L. Iype, S. Jain, P. Fagan, J. Marvin, D. Padilla, V. Ravichandran, B. Schneider, N. Thanki, H. Weissig, J.D. Westbrook, C. Zardecki, The Protein Data Bank, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 58(Pt 6 No 1) (2002) 899-907.

[29] M. Biasini, S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T. Gallo Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli, T. Schwede, SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information, Nucleic Acids Res 42(Web Server issue) (2014) W252-8.

[30] J.P. Rodrigues, M. Levitt, G. Chopra, KoBaMIN: a knowledge-based minimization web server for protein structure refinement, Nucleic Acids Res 40(Web Server issue) (2012) W323-8.

[31] R. Luthy, J.U. Bowie, D. Eisenberg, Assessment of protein models with three-dimensional profiles, Nature 356(6364) (1992) 83-5.

[32] F. Sievers, D.G. Higgins, Clustal omega, Curr Protoc Bioinformatics 48 (2014) 3 13 1-16.

[33] X. Robert, P. Gouet, Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server, Nucleic Acids Res 42(Web Server issue) (2014) W320-4.

[34] C.J. Schulze, W. Wang, W.L. Suarez-Pinzon, J. Sawicka, G. Sawicki, R. Schulz, Imbalance between tissue inhibitor of metalloproteinase-4 and matrix metalloproteinases during acute myocardial [correction of myoctardial] ischemia-reperfusion injury, Circulation 107(19) (2003) 2487-92.

[35] R. Schulz, Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches, Annu Rev Pharmacol Toxicol 47 (2007) 211-42.

[36] M.A. Ali, A.K. Chow, A.D. Kandasamy, X. Fan, L.J. West, B.D. Crawford, T. Simmen, R. Schulz, Mechanisms of cytosolic targeting of matrix metalloproteinase-2, J Cell Physiol 227(10) (2012) 3397-404.

[37] D.H. Lovett, R. Mahimkar, R.L. Raffai, L. Cape, E. Maklashina, G. Cecchini, J.S. Karliner, A novel intracellular isoform of matrix metalloproteinase-2 induced by oxidative stress activates innate immunity, PloS one 7(4) (2012) e34177.

[38] S. Viappiani, A.C. Nicolescu, A. Holt, G. Sawicki, B.D. Crawford, H. Leon, T. van Mulligen, R. Schulz, Activation and modulation of 72kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione, Biochemical pharmacology 77(5) (2009) 826-34.

[39] M.M. Blascke de Mello, J.M. Parente, R. Schulz, M.M. Castro, Matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation by oxidative stress decreases aortic calponin-1

levels during hypertrophic remodeling in early hypertension, Vascular pharmacology (2018).

[40] M.M. Castro, J. Cena, W.J. Cho, M.P. Walsh, R. Schulz, Matrix metalloproteinase-2 proteolysis of calponin-1 contributes to vascular hypocontractility in endotoxemic rats, Arterioscler Thromb Vasc Biol 32(3) (2012) 662-8.

[41] K.T. Weber, Fibrosis and hypertensive heart disease, Current opinion in cardiology 15(4) (2000) 264-72.

[42] S. Hein, S. Kostin, A. Heling, Y. Maeno, J. Schaper, The role of the cytoskeleton in heart failure, Cardiovascular research 45(2) (2000) 273-8.

[43] S. Hein, D. Scholz, N. Fujitani, H. Rennollet, T. Brand, A. Friedl, J. Schaper, Altered expression of titin and contractile proteins in failing human myocardium, J Mol Cell Cardiol 26(10) (1994) 1291-306.

[44] M. Koenig, A.P. Monaco, L.M. Kunkel, The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein, Cell 53(2) (1988) 219-28.

[45] M. Koenig, L.M. Kunkel, Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility, The Journal of biological chemistry 265(8) (1990) 4560-6.

[46] C. Badorff, G.H. Lee, B.J. Lamphear, M.E. Martone, K.P. Campbell, R.E. Rhoads, K.U. Knowlton, Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy, Nature medicine 5(3) (1999) 320-6.

[47] M.R. Celes, L.M. Malvestio, S.O. Suadicani, C.M. Prado, M.J. Figueiredo, E.C. Campos, A.C. Freitas, D.C. Spray, H.B. Tanowitz, J.S. da Silva, M.A. Rossi, Disruption of calcium homeostasis in cardiomyocytes underlies cardiac structural and functional changes in severe sepsis, PloS one 8(7) (2013) e68809.

[48] C.J. Schulze, M.M. Castro, A.D. Kandasamy, J. Cena, C. Bryden, S.H. Wang, A. Koshal, R.T. Tsuyuki, B.A. Finegan, R. Schulz, Doxycycline reduces cardiac matrix metalloproteinase-2 activity but does not ameliorate myocardial dysfunction during reperfusion in coronary artery bypass patients undergoing cardiopulmonary bypass, Crit Care Med 41(11) (2013) 2512-20.

[49] J. Oh, R. Takahashi, E. Adachi, S. Kondo, S. Kuratomi, A. Noma, D.B. Alexander, H. Motoda, A. Okada, M. Seiki, T. Itoh, S. Itohara, C. Takahashi, M. Noda, Mutations in two matrix metalloproteinase genes, MMP-2 and MT1-MMP, are synthetic lethal in mice, Oncogene 23(29) (2004) 5041-8.

[50] A. Page-McCaw, A.J. Ewald, Z. Werb, Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling, Nat Rev Mol Cell Biol 8(3) (2007) 221-33.

Tables

Table 1. Echocardiographic parameters of the left ventricles, body weight and heart to body weight ratio after sixteen weeks of 2K-1C hypertension.

	Sham	Doxy	C-LVH	E-LVH	C-LVH+Doxy
Systolic LV anterior wall thickness (mm)	3.5 ± 0.1	3.5 ± 0.2	4.2 ± 0.1*	3.5 ± 0.2†	4.6 ± 0.2*
Diastolic LV internal diameter (mm)	9.0 ± 0.2	8.5 ± 0.2	8.3 ± 0.3	8.7 ± 0.4	8.5 ± 0.2
Systolic LV posterior wall thickness (mm)	3.1 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.7 ± 0.2*	2.6 ± 0.1†	3.4 ± 0.2*
Cardiac output (mL/min)	93.2 ± 4.0	76.2 ± 3.7	72.4 ± 4.3*	48.2 ± 2.5*†	77.6 ± 3.2†
Heart rate (bpm)	313 ± 6	307 ± 9	290 ± 7	298 ± 13	302 ± 7
Body weight (g)	677.7 ± 20	634.5 ± 25.3	537.2 ± 24.1*	470.2 ± 40.5*	527.1 ± 25*
Heart to body weight ratio (g/g)	0.0028 ± 0.00013	0.0029 ± 0.00021	0.0046 ± 0.00038*	0.0046 ± 0.0004*	0.0044 ± 0.00018*

n=6-17; *$p<0.05$ vs. Sham and Doxy; †$p<0.05$ vs. C-LVH; Doxy= doxycycline.

Figure Legends

Fig. 1: The experimental groups during the sixteen weeks of hypertension. Sham rats treated with vehicle (Sham) or doxycycline (Doxy), 2K-1C rats with C-LVH treated with vehicle (C-LVH) or doxycycline (C-LVH+Doxy) and 2K-1C rats with E-LVH treated with vehicle (E-LVH) or doxycycline (E-LVH+Doxy). From tenth to the sixteenth week, Sham and 2K-1C rats were treated with doxycycline at 15 mg/kg/day (42) or vehicle (water) by gavage.

Fig. 2: Effect of doxycycline on SBP and cardiac remodeling in the 2K-1C rats. (A) SBP (in mmHg) measured weekly by tail-cuff plethysmography for sixteen weeks post-surgery. *p<0.05 vs. Sham until the tenth week by unpaired *t* test (n=21-46) and vs. Sham and Doxy groups between the tenth and sixteenth week by two-way ANOVA (n=9-24). **(B)** M-mode echocardiographic images of left ventricles. Graphs show the quantification of diastolic left ventricle posterior and anterior walls thickness, the systolic left ventricle internal chamber diameter, and the ejection fraction and fractional shortening of baseline, ten and sixteen weeks. Data are shown as the means ± SEM; $ p<0.05 vs. Sham at ten weeks by unpaired *t* test; *p<0.05 vs. Sham and Doxy at sixteen weeks by two-way ANOVA; # p<0.05 vs. C-LVH by unpaired *t* test and & p<0.05 vs. E-LVH rats by two-way ANOVA at sixteen weeks (n=6-40). **(C)** Representative images of heart cross-sections (top row), cardiac myocyte cross-sectional area (H&E stain, middle row), and collagen deposition (picrosirius red stain, bottom row). The corresponding graphs show the percentage of collagen deposition in the left ventricle and the quantification of cardiac myocyte area. Data are shown as mean ± SEM; *p<0.05 vs. Sham and Doxy by two-way ANOVA, and # p<0.05 vs. C-LVH rats by unpaired *t* test (E-LVH) and two-way ANOVA (n=6-10). Scale black bars 20 µm, blue bars 50 µm. Red bars indicate that the pictures were captured with a picture scanner in their real size. SBP = systolic blood pressure, Doxy = doxycycline.

Fig. 3: Doxycycline decreases the rise in MMP gelatinolytic activity in 2K-1C rats. (A) Illustrative gelatin zymogram (left) and the quantified values (right) of 72 kDa MMP-2 activity in the left ventricles. Data are shown as the means ± SEM; *p<0.05 vs. Sham and Doxy groups by two-way ANOVA (n=6-13). Doxy = doxycycline, STD = standard (fetal bovine serum). **(B)** Representative images of gelatinolytic activity (in green, by *in*

situ zymography) and merged pictures of gelatinolytic activity, membrane marker (wheat germ agglutinin (WGA), in red) and nuclei staining (DAPI, in blue). The graph quantifies the green fluorescence emitted by the proteolysis of *Dq gelatin.* Data are shown as mean ± SEM; *p<0.05 vs. Sham and Doxy groups by two-way ANOVA; # p<0.05 vs. C-LVH by two-way ANOVA (n=5-9). Bars are 20 µm. WGA was used to demarcate the membrane of cardiac myocytes, which helps to observe intracellular gelatinase activity (green).

Fig. 4: Western blot analysis of TIMP-4 and TIMP-2 in the left ventricles at sixteen weeks of 2K-1C hypertension. Illustrative images and quantified values of 26 and 25 kDa TIMP-4 **(A)** and TIMP-2 **(B)** levels, respectively, in left ventricles for all groups normalized by 32 kDa S6 protein (loading control). Data are shown as mean ± SEM; *p<0.05 vs. Sham and Doxy groups by two-way ANOVA and # p<0.05 vs. C-LVH by unpaired t test (E-LVH) and by two-way ANOVA (C-LVH+Doxy) (n=5-11).

Fig. 5: Doxycycline prevents MMP-2-induced troponin I proteolysis in the transition from C-LVH to E-LVH remodeling in hypertension. (A) Representative images of left ventricle cross-sections from sham rats (n=3) by confocal microscopy. MMP-2 (red) co-localizes with troponin I (green) in the sarcomere. Bars are 25 µm. **(B)** Representative images and quantified values of 30 kDa troponin I and a putative 20 kDa troponin I proteolytic product in the left ventricle. 32 kDa S6 protein was used as loading control. Data are shown as the means ± SEM; *p<0.05 vs. C-LVH by unpaired *t* test (n=4-11). Doxy= doxycycline. **(C)** Table shows 55% and 54% mass spectrophotometric coverage of the 20 kDa rat troponin I cleavage product in the left ventricle of C- and E-LVH rats when compared with its entire sequence. Amino acids of troponin I cleavage products that were recognized by MS/MS based on its entire sequence are marked in red**. (D)** The primary amino acids sequence of rat and human troponin I was compared by using the Uniprot and showed 91.9% homology throughout its entire sequence; dots (.) and * represent equal and different amino acids between the sequence of rat and human troponin I, respectively; **(E)** table shows 70% coverage of the 30 kDa rat troponin I in the left ventricle of Sham rat when compared with its entire sequence. Amino acids of troponin I that were recognized by mass spectrometry based in its entire sequence are marked in red.

Fig. 6: Dystrophin is a potential proteolytic target of MMP-2 *in silico*. (A) Schematic of the functional domains and protein binding sites of rat dystrophin (427 kDa). **(B)** *In silico* analysis of predicted MMP-2 cleavage sites in rat dystrophin. The table summarizes the top ten predicted cleavage sites in rat dystrophin by MMP-2 according to the PWM score. Hyphen denotes cleavage sites between P1 and P1' residues. **(C)** Three-dimensional structure of the rat spectrin 1 domain. **(D)** Sequence alignment of rat and human dystrophin. Sequence similarities of predicted cleavage sites (P3-P3') in rat and human dystrophin are showing in black boxes.

Fig. 7: Doxycycline prevents MMP-2-induced reduction in dystrophin in the transition from C- to E-LVH remodeling in chronic hypertension. Representative images of dystrophin (green) and merged pictures after immunofluorescence analysis (dystrophin, wheat germ agglutinin (WGA) and DAPI). The membrane marker WGA Texas Red-X Conjugate was used to demarcate the membrane of cardiac myocytes and examine integrity. Bars are 20 µm. Graph shows the quantification of dystrophin green fluorescence. Data are shown as mean ± SEM; # $p<0.05$ vs. C-LVH by unpaired *t* test and E-LVH by two-way ANOVA; *$p<0.05$ vs. Sham and Doxy groups by two-way ANOVA (n=5-9).

Figures

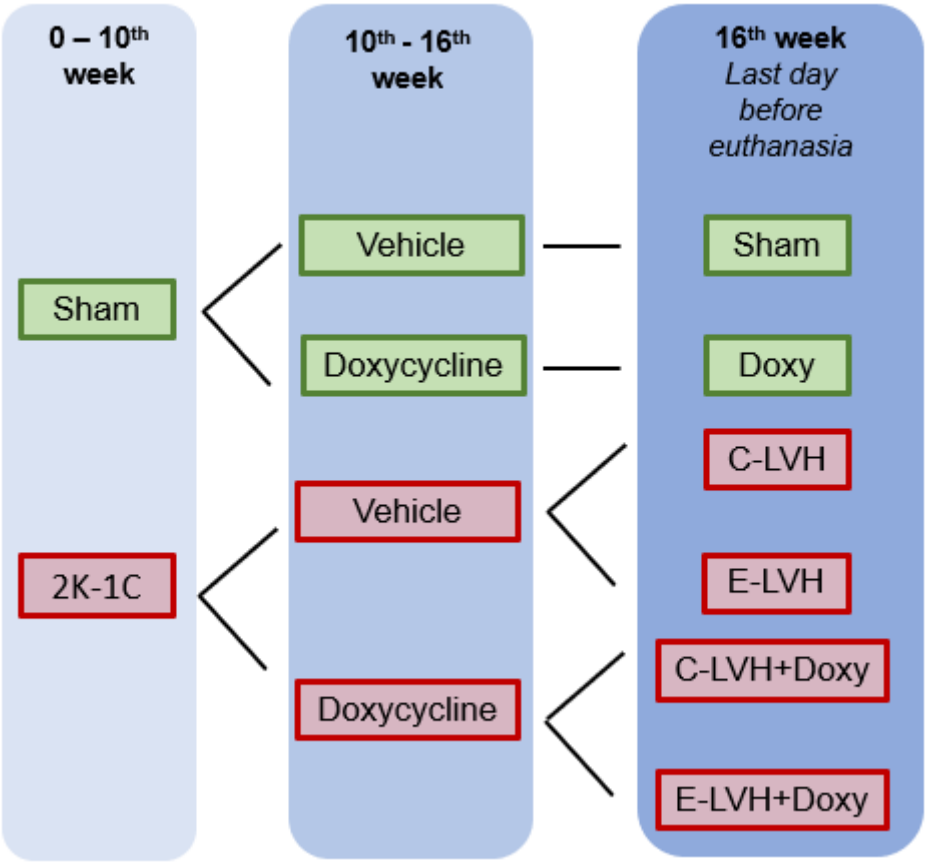


Figure 1

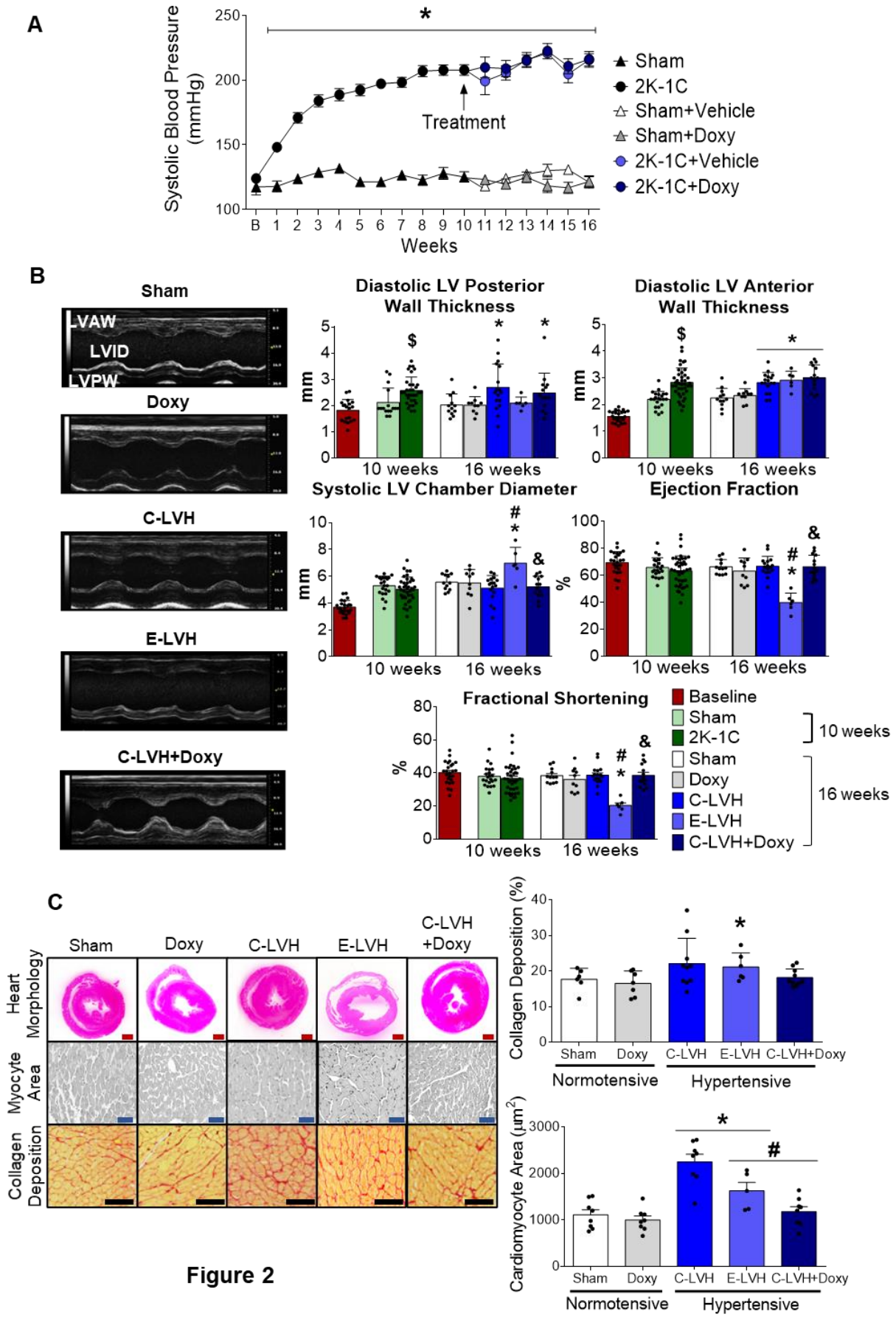

A
Systolic Blood Pressure (mmHg)
Treatment
Weeks
Sham
2K-1C
Sham+Vehicle
Sham+Doxy
2K-1C+Vehicle
2K-1C+Doxy
B
Sham
LVAW
LVID
LVPW
Doxy
C-LVH
E-LVH
C-LVH+Doxy
Diastolic LV Posterior Wall Thickness
Diastolic LV Anterior Wall Thickness
Systolic LV Chamber Diameter
Ejection Fraction
Fractional Shortening
10 weeks
16 weeks
Baseline
Sham
2K-1C
Sham
Doxy
C-LVH
E-LVH
C-LVH+Doxy
C
Sham
Doxy
C-LVH
E-LVH
C-LVH +Doxy
Heart Morphology
Myocyte Area
Collagen Deposition
Collagen Deposition (%)
Cardiomyocyte Area (µm²)
Normotensive
Hypertensive

Figure 2

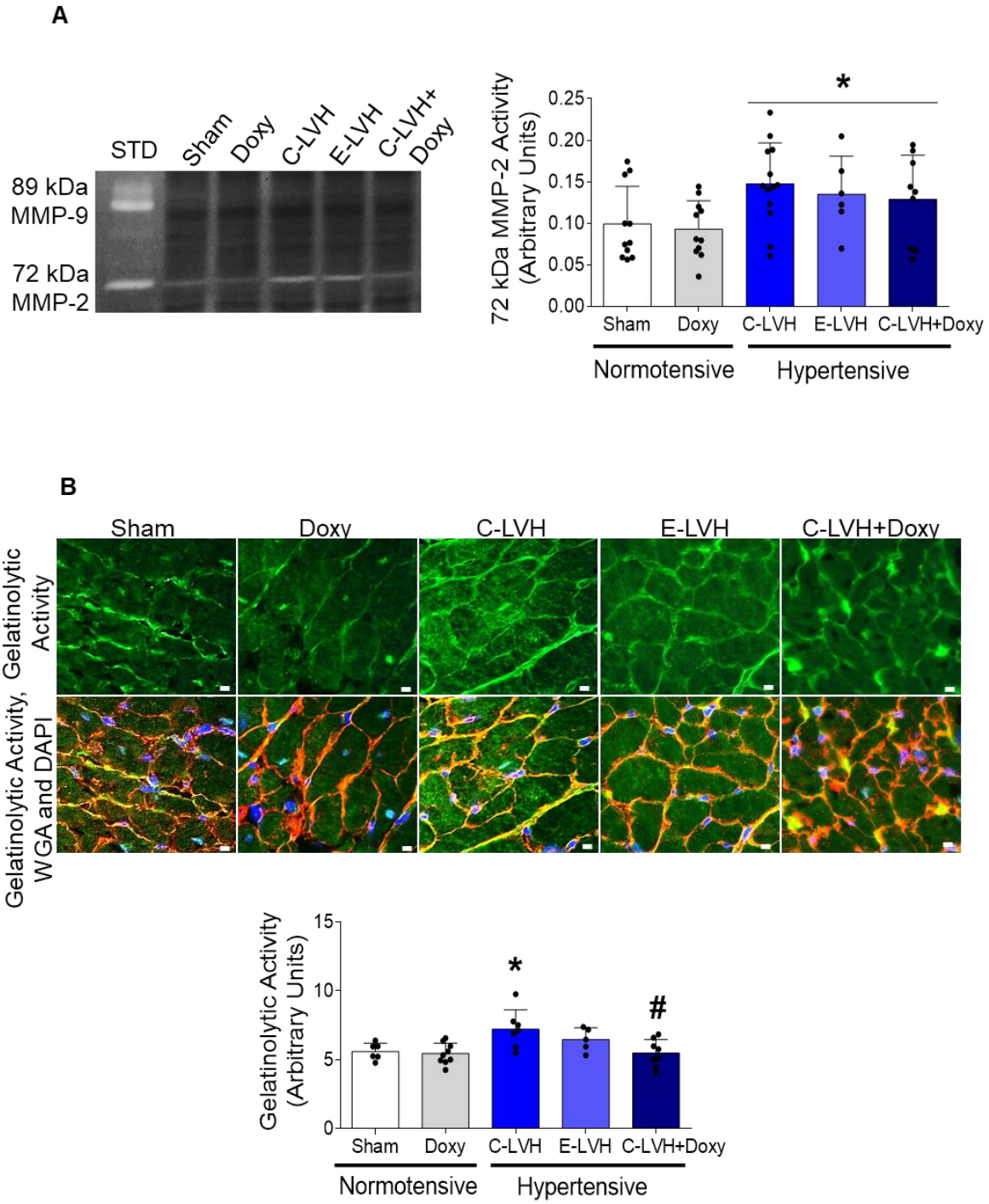

A
STD
Sham
Doxy
C-LVH
E-LVH
C-LVH+ Doxy
89 kDa MMP-9
72 kDa MMP-2
72 kDa MMP-2 Activity (Arbitrary Units)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
*
Sham
Doxy
C-LVH
E-LVH
C-LVH+Doxy
Normotensive
Hypertensive
B
Sham
Doxy
C-LVH
E-LVH
C-LVH+Doxy
Gelatinolytic Activity
Gelatinolytic Activity, WGA and DAPI
Gelatinolytic Activity (Arbitrary Units)
15
10
5
0
*
#
Sham
Doxy
C-LVH
E-LVH
C-LVH+Doxy
Normotensive
Hypertensive

Figure 3

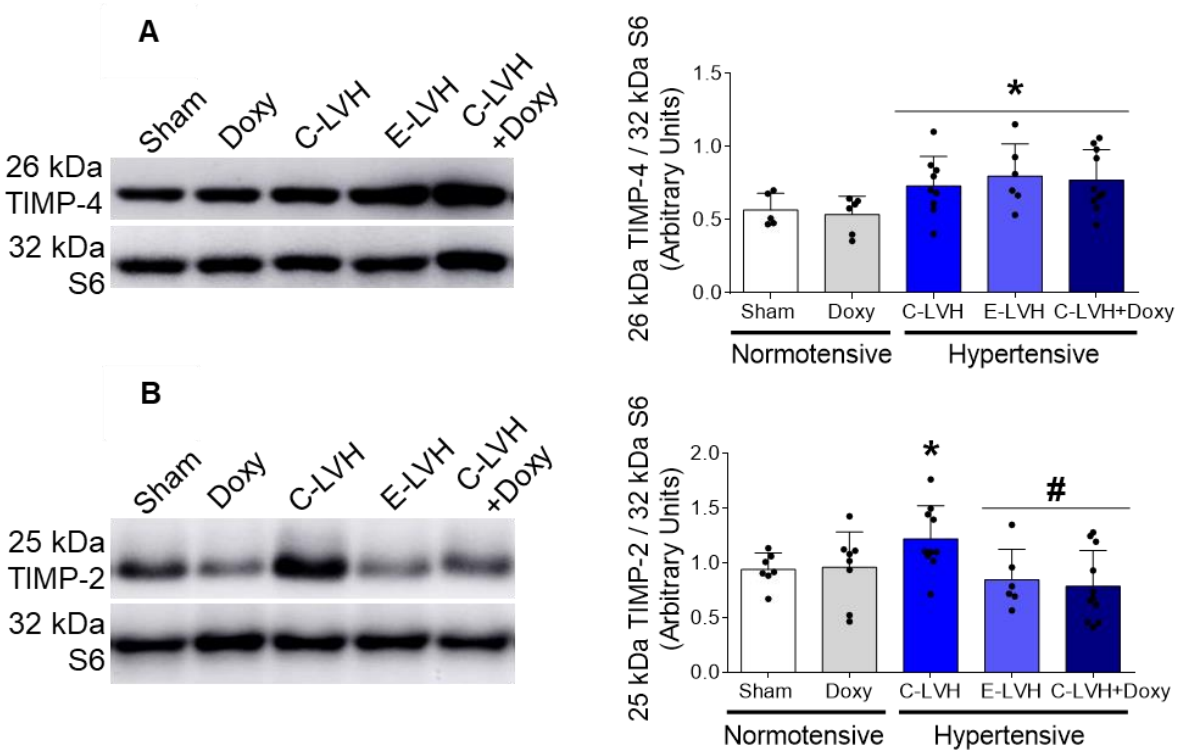
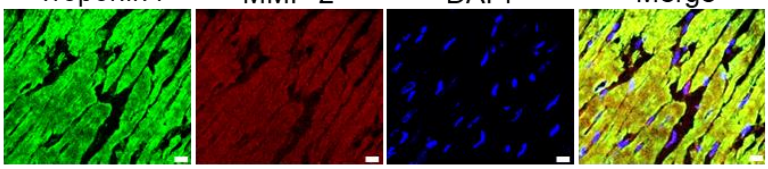
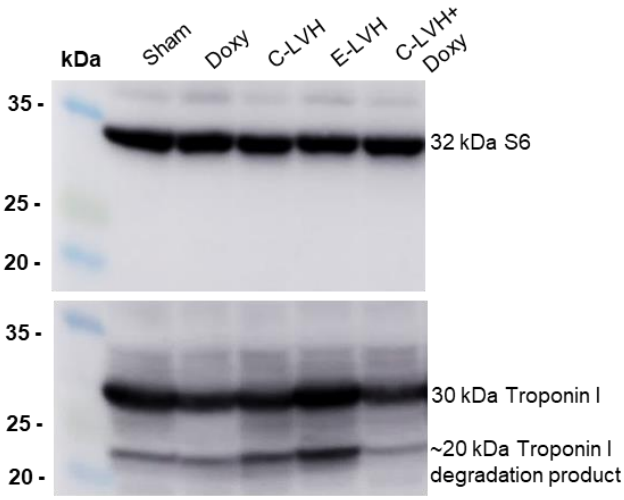

A
Sham
Doxy
C-LVH
E-LVH
C-LVH +Doxy
26 kDa TIMP-4
32 kDa S6
26 kDa TIMP-4 / 32 kDa S6 (Arbitrary Units)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Sham
Doxy
C-LVH
E-LVH
C-LVH+Doxy
Normotensive
Hypertensive
B
Sham
Doxy
C-LVH
E-LVH
C-LVH +Doxy
25 kDa TIMP-2
32 kDa S6
25 kDa TIMP-2 / 32 kDa S6 (Arbitrary Units)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
#
Sham
Doxy
C-LVH
E-LVH
C-LVH+Doxy
Normotensive
Hypertensive

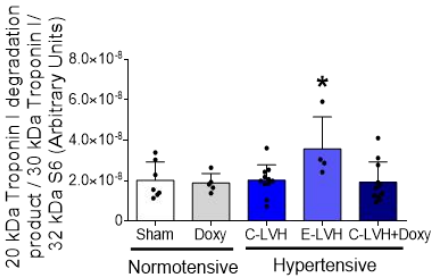
Figure 4

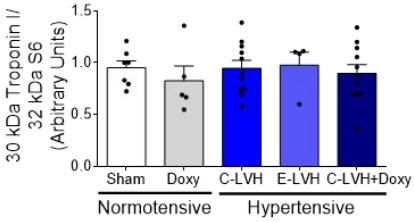
A



B







C

Cleaved products of troponin I	Molecular weight (kDa)	Rat troponin I (211 amino acids)	
		# peptides	% coverage
C-LVH hypertensive rats	20	17	55% (117 amino acids)
E-LVH hypertensive rats	20	21	54% (113 amino acids)

C-LVH troponin I cleaved product

```
1    MADESSDAAG EPQPAPAPVR RRSSANYRAY ATEPHAKKKS KISASRKLQL KTLMLQIAKQ
61   EMEREAEERR GEKGRVLSTR CQPLVLDGLG FEELQDLCRQ LHARVDKVDE ERYDVEAKVT
121  KNITEIADLT QKIYDLRGKF KRPTLRRVRI SADAMMQALL GTRAKESLDL RAHLKQVKKE
181  DIEKENREVG DWRKNIDALS GMEGRKKKFE G
```

E-LVH troponin I cleaved product

```
1    MADESSDAAG EPQPAPAPVR RRSSANYRAY ATEPHAKKKS KISASRKLQL KTLMLQIAKQ
61   EMEREAEERR GEKGRVLSTR CQPLVLDGLG FEELQDLCRQ LHARVDKVDE ERYDVEAKVT
121  KNITEIADLT QKIYDLRGKF KRPTLRRVRI SADAMMQALL GTRAKESLDL RAHLKQVKKE
181  DIEKENREVG DWRKNIDALS GMEGRKKKFE G
```

E

Mother band of troponin I	Molecular weight (kDa)	Rat troponin I (211 amino acids)	
		# peptides	% coverage
Sham	30	24	70% (148 amino acids)

```
1    MADESSDAAG EPQPAPAPVR RRSSANYRAY ATEPHAKKKS KISASRKLQL KTLMLQIAKQ
61   EMEREAEERR GEKGRVLSTR CQPLVLDGLG FEELQDLCRQ LHARVDKVDE ERYDVEAKVT
121  KNITEIADLT QKIYDLRGKF KRPTLRRVRI SADAMMQALL GTRAKESLDL RAHLKQVKKE
181  DIEKENREVG DWRKNIDALS GMEGRKKKFE G
```

D

```
P19429_Human   MADGSSDAAR EPRPAPAPIR RRS-SNYRAY ATEPHAKKKS KISASRKLQL KTLLLQIAKQ
P23693_Rat     MADESSDAAG EPQPAPAPVR RRSSANYRAY ATEPHAKKKS KISASRKLQL KTLMLQIAKQ
Consensus      ...*.....* ..*.....*. ...**..... .......... .......... ...*......

P19429_Human   ELEREAEERR GEKGRALSTR CQPLELAGLG FAELQDLCRQ LHARVDKVDE ERYDIEAKVT
P23693_Rat     EMEREAEERR GEKGRVLSTR CQPLVLDGLG FEELQDLCRQ LHARVDKVDE ERYDVEAKVT
Consensus      .*........ .....*.... ....*.*... .*........ .......... ....*.....

P19429_Human   KNITEIADLT QKIFDLRGKF KRPTLRRVRI SADAMMQALL GARAKESLDL RAHLKQVKKE
P23693_Rat     KNITEIADLT QKIYDLRGKF KRPTLRRVRI SADAMMQALL GTRAKESLDL RAHLKQVKKE
Consensus      .......... ...*...... .......... .......... .*........ ..........

P19429_Human   DTEKENREVG DWRKNIDALS GMEGRKKKFES
P23693_Rat     DIEKENREVG DWRKNIDALS GMEGRKKKFEG
Consensus      .*........ .......... ..........*
```

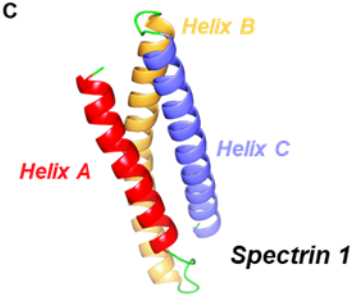
Figure 5

A

B

Domains	P1	Residues	PWM Score	N-mass (kDa)	C-mass (kDa)
S3	606	ISA-LKI	8.14	69	356
S3	631	LSA-LKN	8.37	72	353
S5	866	PTA-IKS	6.38	99	326
S6	1014	PSE-ISQ	6.19	16	308
S9	1396	LAA-YIA	7.32	61	264
S11	1607	PSN-LDS	6.82	85	240
S12	1741	AAK-LMA	5.65	1	224
S15	2011	LQA-LSE	6	32	192
H4	2456	PSS-LLL	7.6	84	140
S23	2979	IAP-LKE	7.25	45	79

C



D

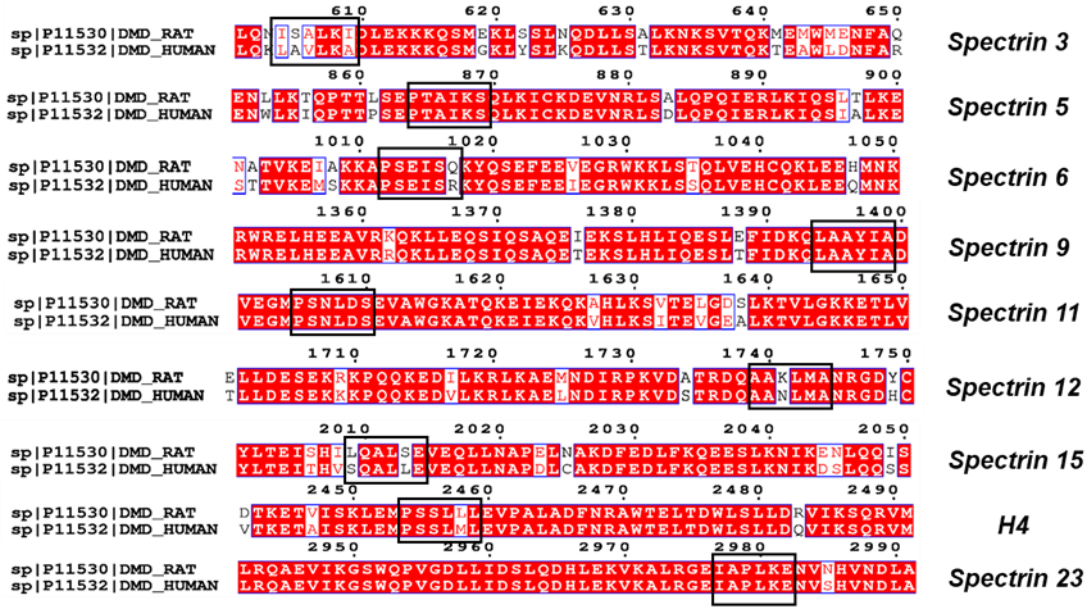
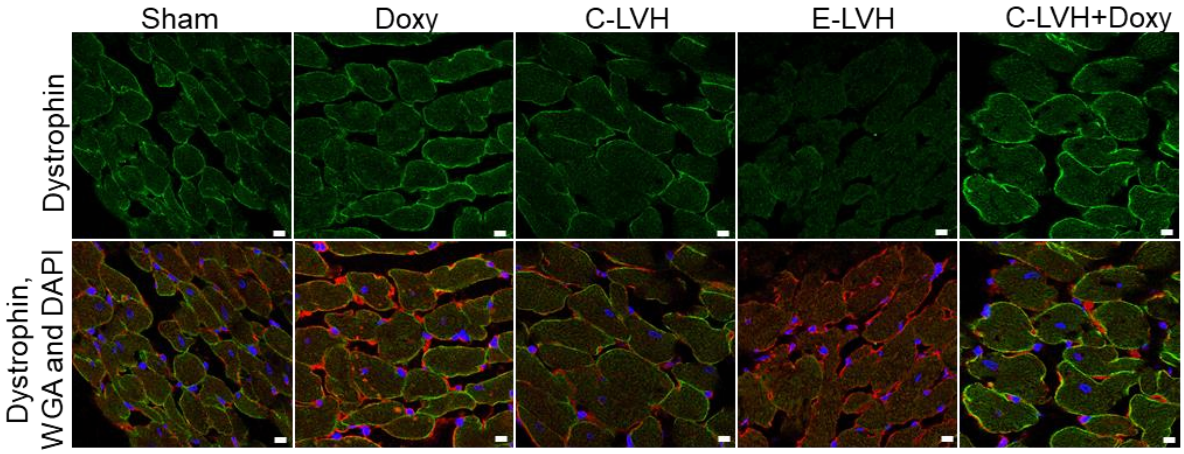


Figure 6


Sham
Doxy
C-LVH
E-LVH
C-LVH+Doxy
Dystrophin
Dystrophin, WGA and DAPI

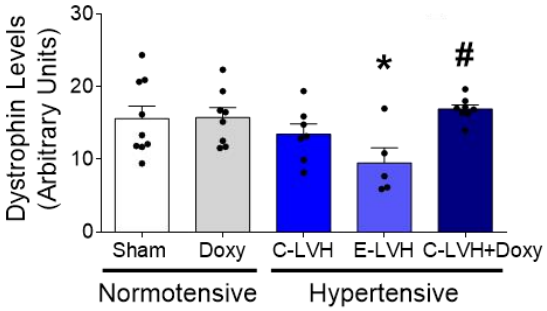

Dystrophin Levels (Arbitrary Units)
30
20
10
0
*
#
Sham
Doxy
C-LVH
E-LVH
C-LVH+Doxy
Normotensive
Hypertensive

Figure 7