



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA – RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA



BEATRIZ QUARESEMIN GOMES

**TRATAMENTO COM ANTIOXIDANTE RESVERATROL NA FASE
GESTACIONAL E AMAMENTAÇÃO REDUZ ATIVIDADE DE MMP-2 E
REMODELAMENTO MAL ADAPTATIVO E HIPERTENSÃO ARTERIAL NA
PROLE ADULTA**

Ribeirão Preto

2023

BEATRIZ QUARESEMIN GOMES

**TRATAMENTO COM ANTIOXIDANTE RESVERATROL NA FASE
GESTACIONAL E AMAMENTAÇÃO REDUZ ATIVIDADE DE MMP-2 E
REMODELAMENTO MAL ADAPTATIVO E HIPERTENSÃO ARTERIAL NA
PROLE ADULTA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

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

Ribeirão Preto

2023

Autor: Beatriz Quaresemin Gomes

Título: TRATAMENTO COM ANTIOXIDANTE RESVERATROL NA FASE GESTACIONAL E AMAMENTAÇÃO REDUZ ATIVIDADE DE MMP-2 E REMODELAMENTO MAL ADAPTATIVO E HIPERTENSÃO ARTERIAL NA PROLE ADULTA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em

Área de Concentração: Farmacologia

Nota: Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Ribeirão Preto

2023

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.

Gomes, Beatriz Quaresemin

Tratamento com antioxidante resveratrol na fase gestacional e amamentação reduz atividade de MMP-2 e remodelamento mal adaptativo e hipertensão arterial na prole adulta. Ribeirão Preto, 2023.

62 folhas.

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

Orientador: Castro, Michele Mazzaron de

1. Resveratrol (Resv). 2. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR).
3. Prole. 4. Estresse oxidativo. 5. MMP-2.

*Aos meus pais, com muito amor, por todo o apoio
para que fosse possível a realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre protegeu e abençoou meu caminho. Que seja feita sempre a Tua vontade em minha vida.

Aos meus pais, Luciano Gomes e Amanda Quaresemin Gomes, por estarem ao meu lado nos meus melhores e piores momentos. Pelos conselhos e risadas. Me falta palavras para expressar a tamanha gratidão que sinto por tê-los em minha vida. Tudo o que sou e as oportunidades que tive devo a vocês. Amo vocês.

A alguém que compartilho a vida faz cinco anos, Marco Antonio Costa Bucci, que me ensinou o que é o companheirismo e a confiar novamente. Me ensinou a ter mais paciência e a sempre acreditar em mim mesma.

Agradeço à Prof.^a Dr^a Michele Mazzaron de Castro, minha orientadora, pela oportunidade de realização deste trabalho e pelos ensinamentos adquiridos.

A todos os colegas de laboratório que me ajudaram e contribuíram de alguma forma para este trabalho, Eduardo Vieira da Rocha, Viviano Gomes de Oliveira Neves, Marcela Maria Blascke de Mello, Elielma, os agradeço profundamente por cada ajuda e tempo empregado foi muito importante para que esse trabalho pudesse ser finalizado. Os momentos de descontração que tivemos também foram imprescindíveis para que os momentos difíceis fossem visualizados com mais leveza, diante dos problemas que apareceram. Gostaria de agradecer também a todos aqueles que colaboraram de forma expressiva para que alguns dos experimentos fossem realizados.

Às amigas da faculdade que permaneceram comigo também durante o Mestrado: Amanda Becerra, Ana Luiza Morato e Júlia Menezes, obrigada por tornarem meus dias mais leves quando nos reuníamos e compartilhávamos das experiências e aflições de cada uma dentro da pós-graduação, mas também sobre nossos problemas pessoais.

À todas as amigas que fiz desde quando ingressei no Mestrado. Aline Esposito, você foi uma delas. Obrigada por compartilhar os perrengues comigo, desde a entrega de um simples relatório até a defesa do Mestrado. Obrigada também por dividir experiências pessoais e pelo conforto

de poder ter alguém para conversar sempre que preciso. Giuliana, você também. Obrigada por ser além de técnica, alguém que pude ser como sou. Você também foi um conforto nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Carlos Tirapelli e seu aluno, Victor de Assis Oliveira. À Prof.^a Dr^a Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro e sua aluna Caroline Mantovani da Luz, juntamente com a técnica Maria Aparecida. À Eleni Luiza Tamburus Gomes, técnica de Histologia do Departamento de Farmacologia pelo tempo empregado na preparação de todos os cortes e lâminas necessários, sempre com disposição e prontidão. À Vani Maria Alves, técnica do Laboratório Multiusuário de Histotécnica (LMH) que também empregou tempo e paciência na preparação dos cortes necessários, também com muita paciência, cuidado e disposição em ajudar. À Elizabete Rosa Milani, técnica do Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC), que com muito carinho e paciência realizou o treinamento necessário para que eu estivesse apta a utilizar o microscópio para finalização dos experimentos.

Agradeço às agências de fomento FAPESP, CNPQ, CAPES, FAEPA por todo o investimento financeiro que foi realizado para que o projeto acontecesse. Esse investimento é necessário para que professores e alunos consigam caminhar em busca de novos estudos que contribuam com a sociedade.

“Tudo depende do tipo de lente que você utiliza para ver as coisas.”

Jostein Gaarder

RESUMO

GOMES, B.Q. **Tratamento com antioxidante resveratrol na fase gestacional e amamentação reduz atividade de MMP-2 e remodelamento mal adaptativo e hipertensão arterial na prole adulta.** 2023. Dissertação (Mestrado em Farmacologia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023).

A hipertensão arterial sistêmica é um problema de saúde pública mundial. O modelo de hipertensão em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) apresenta quantidade aumentada de metaloproteinase de matriz (MMP)-2 na aorta e espécies reativas de oxigênio (eROs). O estresse oxidativo é importante na expressão e ativação de MMP-2 nas artérias, contribuindo para o remodelamento vascular. O antioxidante resveratrol é capaz de reduzir eROs e diminuir a atividade das MMPs em algumas doenças cardiovasculares. Além disso, o tratamento com resveratrol em ratas hipertensas durante gestação e aleitamento mostrou redução da hipertensão em seus filhotes na vida adulta. A hipótese deste trabalho é que o tratamento com resveratrol durante a gestação e aleitamento de ratas SHR diminui o estresse oxidativo e a atividade da MMP-2 nas aortas dos filhos adultos, o que resultaria em atenuação do remodelamento vascular crônico e pressão arterial. Para isto, fêmeas SHR de 10 semanas de idade foram colocadas junto aos machos para cruzamento, sendo estes tratados por uma dieta suplementada com resveratrol (4g/kg de ração) até o nascimento da prole. Após este período, machos foram separados e as fêmeas permaneceram recebendo esta dieta durante o aleitamento. Ao final do aleitamento, a prole foi separada por gênero (fêmeas e machos) e mantida até 12 semanas, recebendo dieta normal do biotério, sem suplementação com resveratrol. Durante estas 12 semanas, a pressão arterial sistólica (PAS) foi analisada semanalmente por pletismografia de cauda. Ao final, a aorta foi coletada para avaliar a atividade de MMP-2 por zimografia em gel e *in situ*, além da avaliação do estresse oxidativo (por DHE e lucigenina) e análise morfológica. Foi feita também avaliação de óxido nítrico (NO) por DAF nas aortas. Além disso, a capacidade de inibição da MMP-2 pelo resveratrol foi avaliada *in vitro*. A PAS de ratos e ratas SHR foi significativamente maior quando comparada com seus respectivos Wistar-Kyoto (WKY). O tratamento materno com resveratrol reduziu a PAS na prole adulta. A atividade da MMP-2 está aumentada nas aortas da prole SHR adulta. O tratamento com antioxidante diminuiu a atividade gelatinolítica de MMP-2 em aortas de fêmeas e machos, além de melhorar a disponibilidade de NO. O antioxidante atenuou o estresse oxidativo apenas nas aortas das ratas. Enquanto que não observamos remodelamento arterial hipertrófico significativo nas fêmeas, o tratamento com o resveratrol parece melhorar a hipertrofia vascular na prole masculina hipertensa. Por fim, o resveratrol inibiu diretamente a atividade da MMP-2 *in vitro*, independente da concentração

utilizada. Em conclusão, o tratamento com resveratrol durante a gestação e aleitamento diminuiu o estresse oxidativo na aorta das fêmeas, reduziu a atividade da MMP-2 e aumentou a biodisponibilidade de NO nas aortas de ambos gêneros (fêmea e macho), e isto contribuiu para atenuar a PAS durante a hipertensão.

Palavras-chave: Resveratrol; Ratos espontaneamente hipertensos; Prole; Estresse oxidativo; MMP-2.

ABSTRACT

GOMES, B.Q. **Treatment with resveratrol during the gestational and lactation phase reduces MMP-2 activity and maladaptive remodeling and arterial hypertension in adult offspring.** 2023. Dissertation (Masters) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Systemic arterial hypertension is a worldwide public health problem. The spontaneously hypertensive rats (SHR) show increased levels of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and reactive oxygen species (ROS) in the vasculature. Oxidative stress *per se* increases MMP-2 expression and activity in the arteries, thus contributing to vascular remodeling. The antioxidant resveratrol is able to reduce ROS and decrease MMPs activity in some cardiovascular diseases. Furthermore, treatment with resveratrol in the hypertensive rats during their period of gestation and lactation showed reduced levels of hypertension in their offspring in adulthood. Thus, we hypothesized that treatment of SHR dams with a diet rich in resveratrol during pregnancy and lactation decreases MMP-2 activity, maladaptive vascular remodeling and hypertension in adult offspring. For this purpose, 10-week-old SHR and WKY females were put together with males for mating, which were treated with resveratrol on diet at a dose of (4g/kg) until the birth of the pups. After this, males were separated and females continued on a diet with resveratrol during lactation. The offspring were separated by gender (females and males) and maintained for 12 weeks being treated with chow, but without resveratrol supplementation. In this period, systolic blood pressure (SBP) was weekly analyzed by tail-cuff plethysmography. At the end of 12 weeks, the aorta was collected to evaluate MMP-2 activity by gel and *in situ* zymography, oxidative stress by DHE and lucigenin and morphological analysis by HE staining. Nitric oxide (NO) was determined by using the probe DAF in the aortas. In addition, the ability of resveratrol to inhibit MMP-2 *in vitro* was also evaluated. The SBP of male and female SHR rats was significantly higher when compared with their controls Wistar-Kyoto (WKY). Maternal treatment with resveratrol reduced SBP in the SHR offspring. MMP-2 activity is increased in the aortas of adult SHR offspring. Treatment with resveratrol decreased the gelatinolytic activity of MMP-2 in aortas of females and males and improved NO availability. Resveratrol attenuated oxidative stress only in the aortas of female offspring. Although we did not observe hypertrophic aortic remodeling in female, treatment with resveratrol tended to decrease the hypertrophic remodeling occurred in the aortas of male offspring. In conclusion, resveratrol decreased the gelatinolytic activity of MMP-2 and increased NO availability in adult offspring

(female and male) and these contributed to attenuate elevated SBP.

Keywords: Resveratrol; Spontaneously hypertensive rats; Offspring; Oxidative stress; MMP-2.

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1 - As MMPs contribuem para o remodelamento vascular na HAS por degradar componentes da matriz extracelular (colágeno e elastina) e também componentes intracelulares, como a calponina-1. Estes dois mecanismos permitem a migração e proliferação das células musculares lisas ¹⁵ 20
- Figura 2 - Estrutura esquemática da MMP-2 de 72 kDa, mostrando o peptídeo de sinalização na porção N-terminal (indicado como “Pre”), o domínio pró-peptídico ligado ao sítio catalítico composto de um íon zinco e três domínios de fibronectina e o domínio hemopexina na porção C-terminal (Adaptada de Kandasamy, A. D. et al.) ¹⁸ 21
- Figura 3 - Estrutura esquemática da MMP-2 de 64 kDa sem a presença do domínio pró-peptídeo, mostrando a sua forma ativa no meio extracelular (Adaptada de Kandasamy, A. D. et al.) ¹⁸ 22
- Figura 4 - Mecanismo de ativação proteolítica, que mostra a clivagem da ligação entre a sulfidril (-SH) do pró-peptídeo e o íon zinco Zn^{2+} do sítio catalítico presente na MMP-2 (72 kDa) resultando em MMP-2 ativa no meio extracelular na sua forma molecular de 64 kDa (Adaptada de Kandasamy, A. D. et al.) ¹⁸ 23
- Figura 5 - Mecanismo de ativação não proteolítica, mostrando que o estresse oxidativo (ONOO-) e a glutatona celular (GSH) reagem com o grupo cisteína sulfidril do pró-peptídeo (PRCGVPD) deslocando-o e permitindo que a MMP-2 fique ativa no meio intracelular na forma molecular de 72 kDa (Adaptada de Kandasamy, A. D. et al.) ¹⁸ 24
- Figura 6 - Fluxograma para visualização da metodologia empregada no projeto. 29
- Figura 7 - Avaliação semanal do peso corporal de fêmeas (A) e machos (B) SHR nascidos de ratas tratadas ou não com resveratrol (durante gestação e amamentação). Valores expressos como média \pm erro padrão (* $p < 0,05$ versus grupos controles; $n = 7-17$). 34

Figura 8 – O gráfico A representa a média de consumo de ração por dia e o gráfico B representa a média de consumo de resveratrol por dia. Os valores foram plotados de forma separada, levando em consideração os períodos de gestação e aleitamento.	35
Figura 9 - Pletismografia de cauda em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) versus controles (WKY) separados por gênero, sendo demonstrado em (A) fêmeas e em (B) machos. Valores expressos como média ± erro padrão (* $p < 0,05$ versus grupos controles; # $p < 0,05$ versus grupos SHR. veículo; $n = 7-17$).	36
Figura 10 - Pletismografia de cauda em animais espontaneamente hipertensos (SHR) versus controles (WKY) sem distinção de gênero. Valores expressos como média ± erro padrão (* $p < 0,05$ versus grupos controles; # $p < 0,05$ versus grupo SHR veículo; $n = 19-30$).	37
Figura 11 - Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela técnica de DHE (dihidroetídio) representada pela letra A e quimiluminescência de lucigenina representada pela letra B nas aortas de fêmeas SHR nascidas de ratas tratadas ou não com resveratrol. As fotografias são representativas de cada grupo (400x) e a barra de escala representa 50 μm , seguidas dos resultados apresentados como a intensidade de fluorescência (Unidades arbitrárias) para DHE. Para lucigenina, os resultados são apresentados como ULR/ mg de proteína. Os valores estão expressos como média ± erro padrão (* $p < 0,05$ versus controles; # $p < 0,05$ versus grupo SHR veículo; $n = 5-7$).	39
Figura 12 - Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela técnica de DHE (dihidroetídio) em aortas de machos SHR nascidos de ratas tratadas ou não com resveratrol (durante gestação e amamentação). As fotografias são representativas de cada grupo (400x) e a barra de escala representa 50 μm , seguidas dos resultados apresentados como a intensidade de fluorescência (Unidades arbitrárias). Os valores estão expressos como como média ± erro padrão (* $p < 0,05$ versus controles; $n = 5$).	39
Figura 13 - Avaliação da presença de peroxinitrito pela técnica de IHQ (Imunohistoquímica para Nitrotirosina) em aortas de fêmeas SHR nascidas de ratas tratadas ou não com resveratrol (durante gestação e amamentação). As fotografias são representativas de cada grupo (400x) e a barra de escala representa 50 μm , seguidas dos resultados apresentados em unidades arbitrárias. Os valores estão expressos como média ± erro padrão (* $p < 0,05$ versus controles; # $p < 0,05$ versus SHR veículo, $n = 5-7$).	40

Figura 14 - Avaliação do efeito do resveratrol sobre a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) na prole de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) versus controle (WKY) separados de acordo com o gênero, sendo representado em (A) fêmeas e em (B) machos. As fotografias são representativas de cada grupo (400x) e a barra de escala representa 25 μ m, seguidos dos resultados apresentados como a intensidade de fluorescência (Unidades arbitrárias). Os valores estão expressos como média \pm erro padrão (*p<0,05 versus grupos controles; #p<0,05 versus grupo SHR veículo; n=4). 42

Figura 15 - Avaliação do efeito do resveratrol sobre a atividade de MMP-2 por zimografia em gel na prole de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) versus controles (WKY), separados de acordo com o gênero, sendo demonstrado em (A) fêmeas e em (B) machos. As fotografias são representativas de cada grupo, seguidas dos resultados apresentados em unidades arbitrárias. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão (*p<0,05 versus grupos controles; n=7-8). 44

Figura 16 - Avaliação do efeito do resveratrol sobre a atividade gelatinolítica por zimografia in situ na aorta da prole de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) versus controle (WKY) separada de acordo com o gênero, sendo demonstrado em (A) fêmeas e em (B) machos. As fotografias são representativas de cada grupo (400x) e a barra de escala representa 25 μ m, seguidas dos resultados apresentados como a intensidade de fluorescência (Unidades arbitrárias). Os valores estão expressos como média \pm erro padrão (*p<0,05 versus grupos controles; #p<0,05 versus grupo SHR veículo; n=5-6). 46

Figura 17 - Avaliação do efeito do resveratrol nas concentrações de 30, 60 e 1200 μ M sobre a atividade gelatinolítica da MMP-2 por ensaio in vitro. As fotografias dos géis são representativas de cada grupo, seguidas dos resultados em unidades arbitrárias. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão (#p<0,05 vs. Apenas Tris, One-Way ANOVA Dunnett; n=3). 48

Figura 18 - Avaliação do efeito do resveratrol em parâmetros morfológicos na aorta da prole de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) versus controle (WKY) separada de acordo com o gênero, sendo demonstrado em (A) fêmeas e em (B) machos. As fotografias são representativas

de cada grupo (400x) e a barra de escala representa 50 μm . Os valores estão expressos como média \pm erro padrão (* $p < 0,05$ versus grupos controles; $n=4-7$). 49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Hipertensão Arterial, Remodelamento Vascular e Metaloproteinases de Matriz.....	19
1.2. Participação do Estresse Oxidativo na Hipertensão e seus Efeitos Sobre a Atividade das MMPs 23	
1.3. Resveratrol e seus Efeitos Cardiovasculares	24
2. HIPÓTESE	27
3. OBJETIVOS.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. Animais	28
4.2. Delineamento Experimental	28
4.3. Avaliação da Pressão Arterial Sistólica e Peso Corporal	29
4.4. Dosagem de Proteínas pelo Método de Bradford.....	29
4.5. Avaliação da Atividade de MMP-2.....	30
4.5.1. Zimografia em gel.....	30
4.5.2. Zimografia <i>in situ</i>.....	30
4.6. Avaliação do Estresse Oxidativo.....	31
4.6.1. DHE <i>in situ</i>	31
4.6.2. Quimioluminescência Derivada da Lucigenina	31
4.6.3. Imunohistoquímica (IHQ) para Nitrotirosina	32
4.7. Avaliação de Óxido Nítrico (NO) <i>in situ</i>	32
4.8. Análise Morfológicas das Aortas	33
4.9. Avaliação dos Efeitos <i>in vitro</i> do Resveratrol na Atividade de MMP-2	33
4.10. Análise Estatística	33
5. RESULTADOS	33
5.2. Resveratrol reduz a pressão arterial sistólica (PAS) da prole SHR adulta	35
5.3. Resveratrol diminui o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas aortas de ratas SHR, mas não em machos SHR	37
5.4. Resveratrol aumentou a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) na prole hipertensa	41
5.5. Efeito do resveratrol sobre a atividade gelatinolítica de MMP-2 na prole hipertensa.....	42
5.6. Efeito do resveratrol sobre a atividade gelatinolítica de MMP-2 <i>in vitro</i>	46
5.7. Tratamento com resveratrol durante gestação e amamentação parece melhorar o remodelamento hipertrófico da aorta da prole SHR masculina.....	48

6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÃO.....	55
8. REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipertensão Arterial, Remodelamento Vascular e Metaloproteínas de Matriz

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um problema de saúde pública mundial. Ela é definida como secundária (quando resulta de aldosteronismo primário, feocromocitoma) ou essencial (etiologia multifatorial)^{1,2}. A HAS essencial também é determinada geneticamente. Estudos realizados em familiares mostraram similaridades nos valores de pressão arterial (normal ou elevada) entre irmãos, pais e filhos³. A epigenética apresenta um impacto importante no desenvolvimento da hipertensão, pois já se sabe que a desnutrição intrauterina, a constrição dos vasos sanguíneos da placenta e útero induzidos por estresse, álcool, medicamentos e toxinas podem estar diretamente relacionados ao desenvolvimento da hipertensão na prole⁴. Assim, uma vez que fatores ambientais podem alterar a inclinação de um indivíduo para desenvolver riscos cardiovasculares por meio de processos epigenéticos, a identificação destes pode ser capaz de contribuir para o tratamento⁴.

O modelo experimental que mais se aproxima da hipertensão essencial é o rato espontaneamente hipertenso (SHR). Estes ratos exibem alterações na hemodinâmica renal e aumento da resistência vascular com três semanas de idade, sendo que tais alterações são causa e não consequência da hipertensão nesse modelo^{5,6}. A prole de ratos SHR desenvolve hipertensão quando adultos, mantendo esta característica genética importante do modelo.

A disfunção endotelial e o remodelamento vascular são consequências importantes da HAS. Estas alterações levam ao desenvolvimento de outras doenças cardiovasculares, como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, dentre outros^{7,8}. O termo remodelamento vascular é usado para descrever qualquer alteração duradoura no tamanho ou composição das artérias, permitindo que estas se adaptem ao aumento sustentado da pressão. É considerado uma resposta mal adaptativa ao aumento da tensão na qual as artérias são submetidas, por isto, está envolvido na patogênese das principais doenças cardiovasculares citadas⁹.

Em artérias de condutância, como a aorta, o tipo de remodelamento que ocorre de forma predominante é o hipertrófico. Neste ocorre aumento de migração e proliferação das células musculares lisas (CMLs) na camada média arterial, sendo caracterizado pelo espessamento da média, aumento da relação média por lúmen (M/L) e aumento da área de secção transversal (CSA), sem alteração do lúmen^{10,11}. É comum de ser encontrado em ratos SHR, já que estudos demonstraram todas estas alterações estruturais citadas em suas aortas torácicas¹².

Em condições fisiológicas, as CMLs possuem fenótipo contrátil e expressam marcadores, tais como a α -actina, a cadeia leve da miosina, a calponina-1, a esmotelina B e a SM-22;

proteínas que fazem parte do citoesqueleto e estão envolvidas no processo de contração¹³. Estímulos mecânicos como o aumento de pressão arterial, além de níveis mais altos de eROS e compostos vasoativos (Ang II, endotelina-1 e aldosterona) influenciam a mudança do fenótipo contrátil para o sintético (proliferativo), sendo este caracterizado pela redução das proteínas contráteis e do citoesqueleto. Isto facilita a migração e proliferação destas células, o que culmina no estabelecimento do remodelamento vascular hipertrófico¹⁴.

Além do remodelamento vascular fisiopatológico que acontece na HAS depender da alteração fenotípica das CLMs, é necessário que ocorra também a degradação dos componentes da matriz extracelular vascular. As metaloproteinases de matriz (MMPs) estão envolvidas em ambos os processos, já que degradam colágeno e elastina na matriz, e são mais abundantes no fenótipo sintético do que contrátil, tornando-as capazes de degradar a calponina-1, por exemplo. Esta é uma proteína que faz parte do citoesqueleto das CLMs, sendo que sua degradação exerce papel importante na alteração de fenótipo destas células¹⁴ (Figura 1).

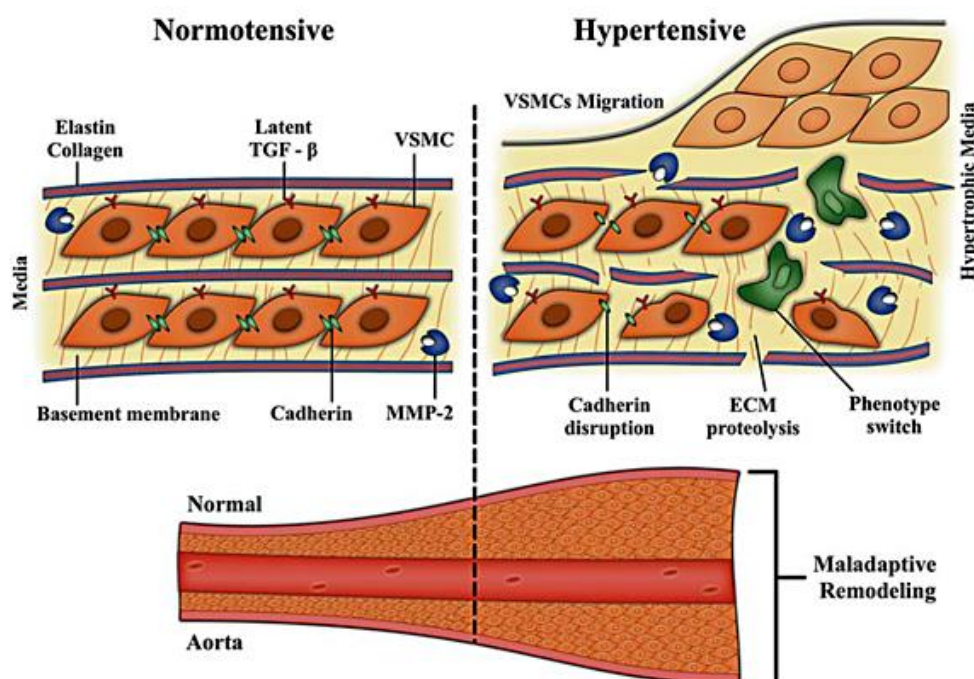


Figura 1 - As MMPs contribuem para o remodelamento vascular na HAS por degradar componentes da matriz extracelular (colágeno e elastina) e também componentes intracelulares, como a calponina-1. Estes dois mecanismos permitem a migração e proliferação das CMLs¹⁵.

As MMPs são um grupo de enzimas proteolíticas dependentes do zinco (Zn^{+2}), que podem ser produzidas por CMLs, fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, dentre outras¹⁶. Em condições fisiológicas, estão envolvidas na proteólise da matriz extracelular (MEC) em vários tecidos^{16,17}. Elas são classificadas de acordo com seus substratos. Há as collagenases

(MMP-1, -8 e -13), estromelinas (MMP-3 e -10), matrilisinas (MMP-7 e -26), MMPs de membrana (MT-MMPs) e gelatinases (MMP-2 e -9). Como apresentam potencial destrutivo, elas são sintetizadas como pré-pró-MMPs, onde um peptídeo sinal é removido durante o processo de tradução para gerar a pró-MMP (zimogênio, forma inativa), maneira como são secretadas das células. A regulação delas pode ocorrer a nível de transcrição gênica e pós-transcricional (regulando a expressão do RNAm transcrito). Além disso, podem sofrer regulação por mecanismos pós-translacionais como S-glutatioilação e fosforilação, ativação da pró-enzima para forma ativa e ações inibitórias reguladas pelos inibidores teciduais endógenos, TIMPs¹⁸.

A estrutura das MMPs é semelhante, sendo em sua maioria formada por um peptídeo sinalizador, pelo domínio pró-peptídeo, domínio catalítico, peptídeo ligante (região de dobradiça) e um domínio de hemopexina. O peptídeo de sinalização está presente na região N-terminal e permite a secreção da protease pelo retículo endoplasmático e o transporte para fora da célula. Adjacente a ele, está o domínio pró-peptídeo (PRCGVPD) que possui um grupo cisteína sulfidríla (-SH) e o domínio catalítico contendo Zn^{+2} . A ligação de -SH com Zn^{+2} é responsável por quelar a porção catalítica. O sítio catalítico presente nas gelatinases (MMP-2 e MMP-9) é diferente do de outras MMPs porque contém três domínios de fibronectina tipo II que permite a clivagem da laminina, elastina, fibronectina e colágeno tipo IV. A região C-terminal de hemopexina é conectada ao sítio catalítico por um peptídeo ligante que permite a ligação de outras proteínas, as quais podem alterar a atividade da MMPs^{18,19} (Figura 2).

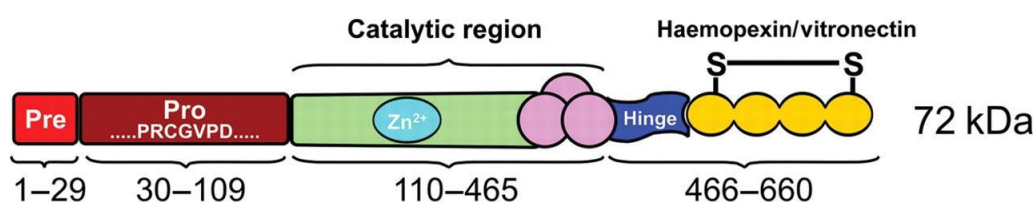


Figura 2 - Estrutura esquemática da MMP-2 de 72 kDa, mostrando o peptídeo de sinalização na porção N-terminal (indicado como “Pre”), o domínio pró-peptídico ligado ao sítio catalítico composto de um íon zinco e três domínios de fibronectina (rosa) e domínio hemopexina na porção C-terminal (Adaptada de *Kandasamy, A. D. et al.*)¹⁸.

Um aumento de expressão e atividade dessas enzimas levam à degradação de forma desregulada de componentes da matriz extracelular (MEC), fato que contribui então, para o remodelamento vascular hipertrófico mal adaptativo observado na hipertensão^{9,20,21}. As MMPs do tipo -2 e -9 (72 kDa e 92 kDa, respectivamente) são as mais relevantes neste processo^{9,22-24}. Estudos mostram níveis aumentados da MMP-2 na aorta de ratos SHR²⁵, e aumento da

atividade de MMP-2 e -9 no plasma de pacientes hipertensos ²⁶. Estudos já mostraram que camundongos com deficiência genética de MMP-2 obtiveram prejuízo na migração das CLMs, além de prejudicar a hiperplasia da camada íntima arterial. Isso nos mostra que a MMP-2 é importante para a migração celular, contribuindo para perda do lúmen arterial e consequentemente para o remodelamento²⁷. Em adição, foi visto que a doxiciclina, em doses subantimicrobianas, pode inibir as MMPs através da sua ligação ao zinco e cálcio presente no sítio catalítico, impedindo sua ativação e a degradação da MEC. O tratamento com doxiciclina realizado em ratos hipertensos dois rins-um clipe (2RIC) mostrou reduzir a espessura da camada média, a hiperplasia vascular, a disfunção endotelial e atividade de MMP-2, mostrando a importância da MMP no remodelamento hipertrófico na hipertensão crônica ^{28,29}. Além disso, ratos SHR de 13 semanas de idade tratados com doxiciclina obtiveram redução significativa da pressão arterial, além de diminuir os níveis proteicos aumentados de MMP-2, assim como sua atividade proteolítica na aorta ²⁵.

A ativação da MMP-2 (72 kDa) ocorre quando há quebra da ligação entre a sulfidril (-SH) e o Zn^{2+} devido ação de enzimas proteolíticas como serina proteases, plasmina ou outras MMPs, como a MMP de membrana, MT1-MMP. A interação desta com TIMP-2 e MMP-2 (72 kDa) forma o complexo MMP-2/TIMP-2/MT1-MMP responsável por permitir a clivagem e liberação do pró-peptídeo resultando em MMP-2 ativa (64 kDa) no meio extracelular ^{9,19,21,30,31} (Figuras 3 e 4). Esta é denominada de ativação proteolítica. Entretanto, a MMP-2 também pode ser ativada no meio intracelular por estresse oxidativo. Em adição, este influencia a expressão de MMP-2 nas artérias, mecanismos que serão descritos posteriormente ^{32,33}.



Figura 3 - Estrutura esquemática da MMP-2 de 64 kDa sem a presença do domínio pró-peptídeo, mostrando a sua forma ativa no meio extracelular (Adaptada de *Kandasamy, A. D. et al.*) ¹⁸.

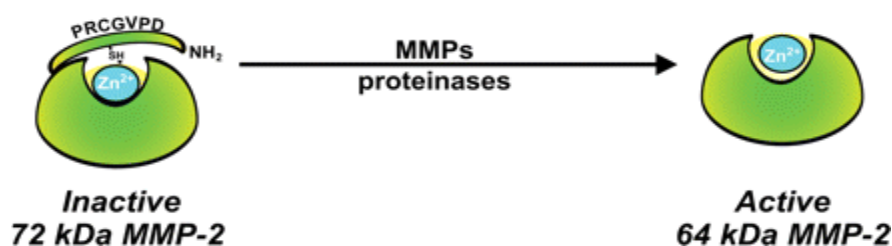


Figura 4 - Mecanismo de ativação proteolítica, que mostra a clivagem da ligação entre a sulfidrila (-SH) do pró-peptídeo e o íon zinco Zn^{2+} do sítio catalítico presente na MMP-2 (72 kDa) resultando em MMP-2 ativa no meio extracelular na sua forma molecular de 64 kDa (Adaptada de *Kandasamy, A. D. et al.*)¹⁸.

1.2. Participação do Estresse Oxidativo na Hipertensão e seus Efeitos Sobre a Atividade das MMPs

O estresse oxidativo é dado como o aumento da geração ou diminuição da eliminação das eROs³⁴. São exemplos de eROs: ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^\cdot), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrito ($ONOO^-$).³⁵ Estas são produzidas por sistemas biológicos, como desacoplamento da enzima óxido nítrico sintase, pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, xantina oxidase e processos de respiração mitocondrial desacoplada. Uma das principais fontes de eROs nos vasos é a NADPH oxidase, que tem participação importante na disfunção vascular da hipertensão³⁶. O estresse oxidativo está presente em vários modelos animais de hipertensão, inclusive nos ratos SHR^{25,34,37}. Neste modelo, ocorre a supra regulação da NADPH oxidase e produção de O_2^- em artérias mesentéricas, na aorta e rins³⁸.

Para impedir as ações prejudiciais das eROs, vários mecanismos de defesa antioxidantes são ativados, como as superóxidos dismutases (SOD), catalase, glutatona peroxidases (GPx) e tiorredoxina; assim, o O_2^- é transformado em H_2O_2 pela SOD³⁴, e por fim, é transformado em água pela glutatona peroxidase ou catalase³⁵. Entretanto, quando isto não acontece, o excesso de O_2^- se junta ao NO e há formação de uma molécula altamente pró-oxidante, o $ONOO^-$ ³⁹, sendo este um dos principais responsáveis por malefícios vasculares da hipertensão³⁴.

Dessa forma, as eROs influenciam a regulação da pressão arterial pois podem contribuir para a contração e remodelamento vascular, por mediar processos como diminuição do NO (por sua ligação ao O_2^-), geração de produtos vasoconstritores de peroxidação lipídica (F2-isoprostanos), depleção de tetrahydrobiopterina e ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios³⁴. Além disso, as EROs podem aumentar a expressão da MMP-2 por ativação de NF- κ B¹⁵. Já o aumento de sua atividade ocorre na presença de $ONOO^-$ e glutatona celular que leva à S-glutatiolação no resíduo de cisteína no seu domínio pró-peptídico, interrompendo a ligação deste ao Zn^{2+} do sítio catalítico^{19,33} (Figura 5). A S-glutatiolação é o mecanismo pós-translacional que contribui para ativação da MMP-2 de 72 kDa no meio intracelular, facilitando seu efeito proteolítico sob componentes intracelulares, como a calponina-1¹⁹.

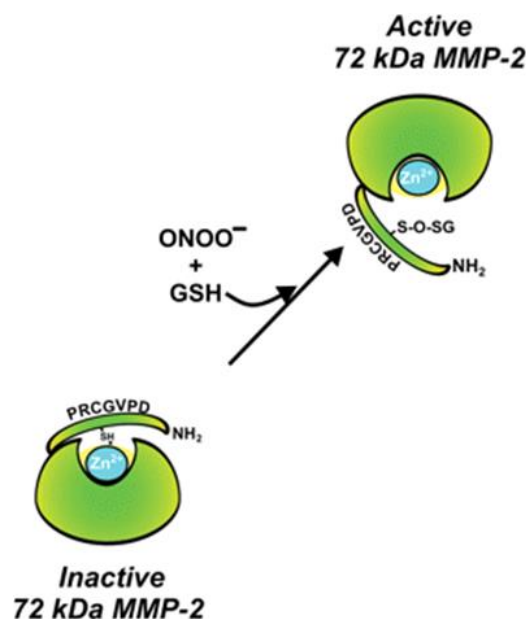


Figura 5 - Mecanismo de ativação não proteolítica, mostrando que o estresse oxidativo (ONOO^-) e a glutatona celular (GSH) reagem com o grupo cisteína sulfidrílica do pró-peptídeo (PRCGVPD) deslocando-o e permitindo que a MMP-2 fique ativa no meio intracelular na forma molecular de 72 kDa (Adaptada de *Kandasamy, A. D. et al.*)¹⁸.

O tratamento com tempol ou flavonoides, como a quercetina, contribuiu para diminuir o estresse oxidativo e a atividade das MMPs em ratos hipertensos, o que resultou em diminuição do remodelamento arterial hipertrófico^{33,40,41}. Além disto, pesquisadores mostraram que um grupo de pacientes com síndrome metabólica obteve redução do estresse oxidativo, melhora na hipertensão e biodisponibilidade de NO após dieta rica em antioxidantes naturais obtidos a partir de frutas e vegetais, juntamente com exercícios diários^{20,37}. Outro estudo clínico mostrou que pessoas com dieta vegetariana apresentaram menores índices de elevação da MMP-2 e outros marcadores inflamatórios quando comparadas aos omnívoros^{42,43}. Estes estudos sugerem que uma dieta rica em antioxidantes auxilia na prevenção de complicações cardiovasculares.

Com isso, o uso de antioxidantes, como o resveratrol, por exemplo⁴⁴, vem sendo cada vez mais empregado em estudos experimentais e clínicos para auxiliar na melhora das disfunções vasculares causadas pela hipertensão.

1.3. Resveratrol e seus Efeitos Cardiovasculares

O resveratrol é um flavonoide encontrado no amendoim, pistache, morango, ameixas, mirtilos, uva e derivados (vinho tinto) e atua na redução de eROs, atenuando significativamente os danos oxidativos vasculares⁴⁴.

Um estudo epidemiológico mostrou que certas regiões da França quando comparadas aos Estados Unidos e Reino Unido apresentam menor risco para desenvolver doenças cardiovasculares, apesar da dieta rica em gordura saturada. O consumo de vinho tinto foi apontado como um dos principais responsáveis por tal efeito^{45,46}. Como a uva é a principal fonte de resveratrol para o homem e o vinho tinto apresenta uma concentração de resveratrol entre 1 e 14 mg/L, este flavonoide é importante na participação desses efeitos protetores⁴⁶. Entretanto, a concentração de resveratrol nos produtos alimentícios é muito variável, tornando difícil estimar com precisão sua ingestão média diária. As concentrações de resveratrol na uva e vinho, por exemplo, podem variar muito de uma região para outra, devido fatores de estresse biológico e físico⁴⁷. Durante o processo de produção do vinho, o conteúdo de resveratrol pode ser modificado por fatores como temperatura e PH^{47,48}. Como suplementação, a quantidade de resveratrol recomendada para um adulto de 80 kg é equivalente a 12,5 mg/kg de peso corporal⁴⁷.

Estudos demonstraram que o resveratrol traz efeitos protetores à vasculatura por reduzir estresse oxidativo e inflamação, aumentar a capacidade metabólica e a síntese de NO por células endoteliais⁴⁴. Além disso, um estudo avaliou que o tratamento de CLMs com resveratrol diminuiu a expressão de proteínas do ciclo celular, tais como ciclina D1 e Cdk4, a ativação de Src e de MAP quinases, que são vias sabiamente envolvidas com a hiperproliferação de CLMS em ratos SHR. Isto pode melhorar o remodelamento vascular hipertrófico^{44,49}. O resveratrol também demonstrou ser capaz de evitar a disfunção endotelial em aortas de ratos SHR via eNOS, principalmente por aumentar fosforilação em ser1179⁵⁰⁻⁵². Dessa forma, o relaxamento dependente do endotélio (induzido por acetilcolina) melhorou significativamente em aortas de ratos SHR tratados com resveratrol em comparação com os não tratados⁵¹.

Além de todos estes efeitos citados, outro aspecto importante em relação ao resveratrol é que este demonstrou ser capaz de interagir diretamente com resíduos do sítio ativo da MMP-2 e MMP-9 para inibir sua atividade. No caso da MMP-2, os aminoácidos Leu 164, Ala 165 e Thr 227 estão envolvidos na ligação com o resveratrol (através de ligações de hidrogênio), enquanto que os resíduos Ala 217 e Ala 220 interagem com o resveratrol através de ligações polares⁵³. Com isto, levanta-se a hipótese de que a proteção cardiovascular que o resveratrol oferece não está associada somente às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, mas também pode ser devido à sua ação na inibição direta das MMPs-2 e/ou -9⁵³.

O aumento de atividade das MMPs, sobretudo MMP-2, pode se dar através do seu mecanismo de ativação proteolítica. Um estudo demonstrou que os polifenóis do vinho tinto (RWPCs) foram capazes de inibir de forma direta e efetiva a atividade de MT1-MMP, o principal ativador fisiológico da pro-MMP-2. Em consequência, isto levou a uma expressão e

ativação reduzidas da pro-MMP-2. Portanto, é provável que a prevenção da ativação de MMP-2 por RWPCs seja mediada pela inibição direta da atividade de MT1-MMP nas CMLs⁵⁴.

A aterosclerose é também uma doença cardiovascular considerada problema de saúde pública mundial, tendo o estresse oxidativo um papel crítico na patogênese e desenvolvimento desta. O aumento na expressão de MMP-9 pelas células vasculares desempenha um papel importante na formação e ruptura da placa aterosclerótica. O pré-tratamento de CLMs com 0.2 mM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) levou ao aumento da expressão de MMP-9, sendo que quando elas foram tratadas com resveratrol nas concentrações de 80, 100 e 120 µmol/L foi visto uma redução dos níveis elevados da MMP-9. Isto mostra que o resveratrol pode ser benéfico para a redução dos níveis de MMPs em doenças cardiovasculares, podendo ser utilizado na prevenção e tratamento destas⁵⁵.

O tratamento com resveratrol na dose de 4g/kg em ratos SHR mostrou diminuição da pressão arterial sistólica, diastólica e média⁵⁶. Entretanto, se houver interrupção do tratamento, observa-se novamente rápido aumento da pressão arterial nestes animais. Assim, parece que o tratamento precoce com resveratrol (durante a gestação e amamentação) é mais eficaz para manter a pressão arterial baixa mesmo na ausência deste. Isto pôde ser observado no estudo em que a suplementação com resveratrol em ratas SHR prenhas, durante a gestação e o período de aleitamento, mostrou que os filhos SHR adultos apresentaram pressão arterial mais baixa, devido a melhora na ação do NO na função vascular. Assim, a suplementação precoce com este flavonoide pode ser uma alternativa importante para aliviar o grau da hipertensão nos modelos SHR⁶. Com isto, o ambiente intrauterino se mostra importante na determinação do desenvolvimento e saúde da prole. Assim, sabendo que a qualidade do ambiente intrauterino pode ser um fator determinante para o desenvolvimento de doenças crônicas e que o feto e recém-nascido, por apresentarem plasticidade fenotípica, estão suscetíveis à diversos acontecimentos, esse período pode ser o mais receptivo à terapêutica para a prole⁶.

A exposição prolongada à algumas substâncias, tais como a dioxina (TCDD), durante a gestação tem sido associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A exposição ao TCDD durante a gravidez foi associada ao aumento de PAS, diastólica e média na prole, e o resveratrol foi capaz de prevenir estas alterações⁵⁷. Ainda, estudos demonstraram que a exposição combinada ao glicocorticoide dexametasona e TCDD durante a gravidez aumenta a PAS, diastólica e média na prole masculina, e a intervenção com resveratrol reduziu esses parâmetros⁵⁸. A dieta hipoproteica também contribui ao aumento de eROS no fígado e plasma dos filhos, o que culmina em disfunção metabólica. O resveratrol na gravidez hipoproteica diminuiu o estresse oxidativo materno e da prole. Ademais, melhorou o metabolismo de ratas

preenhas, e como resultado, preveniu os efeitos adversos no metabolismo da prole adulta⁵⁹. Ainda, o uso deste antioxidante em ratas prenhas com pré-eclâmpsia melhorou a disfunção endotelial e biodisponibilidade de NO, mecanismos que estavam prejudicados na doença⁶⁰. Por fim, a hipóxia pré-natal é uma complicação comum durante a gravidez que culmina em morte fetal por reabsorção. A utilização de resveratrol foi capaz de melhorar a sobrevivência fetal⁶¹.

O tratamento com resveratrol durante a gravidez é seguro e não provoca efeito sobre a capacidade reprodutiva. Não foi observado efeitos adversos sobre o número de implantações, filhotes vivos ou perdas pré- e pós-implantação, pesos da placenta, da ninhada e feto; ou ainda, não houve incidências de anormalidades fetais^{62,63}. Com base nestes estudos da segurança na utilização do resveratrol na gravidez e os benefícios deste para o aparelho cardiovascular, ele pode ser candidato potencial para uso pré-natal em pacientes gestantes hipertensas, sendo capaz de reduzir futuros riscos cardiovasculares para prole⁶.

2. HIPÓTESE

Dessa forma, sabendo que durante a hipertensão arterial ocorre aumento da atividade da MMP-2 e que esta age extra e intracelularmente levando ao remodelamento arterial hipertrófico e, ainda considerando, 1) capacidade do resveratrol em promover efeitos protetores no aparelho cardiovascular, reduzindo estresse oxidativo e proliferação de CMLs nas artérias; e que 2) a suplementação materna com este antioxidante foi capaz de aliviar o grau de hipertensão em filhos adultos de ratos SHR, a hipótese deste trabalho é:

O tratamento materno com resveratrol diminui o estresse oxidativo e a atividade das MMPs, especialmente a MMP-2, nas artérias dos filhos adultos, o que resulta em redução da formação do remodelamento vascular hipertrófico mal adaptativo e pressão arterial.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar se a dieta rica em resveratrol durante gravidez e aleitamento diminui a atividade da MMP-2 e como consequência o remodelamento vascular mal adaptativo na prole adulta, além de reduzir a hipertensão.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o estresse oxidativo em artérias de ratos SHR adultos provenientes de mães SHR tratadas com resveratrol no período gestacional e de aleitamento;

- Avaliar a atividade de MMP-2 em artérias de ratos SHR adultos provenientes de mães SHR tratadas com resveratrol no período gestacional e de aleitamento;
- Avaliar se o remodelamento vascular mal adaptativo e hipertensão estarão atenuados em ratos SHR adultos provenientes de mães SHR tratadas com resveratrol no período gestacional e de aleitamento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Neste estudo foi utilizado o modelo animal de hipertensão essencial com ratos SHR, tanto fêmeas como machos. Os animais Wistar Kyoto (WKY) foram usados como controles. Eles foram provenientes do Biotério de Produção de Ratos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP de São Paulo (ICB/USP) e mantidos no Biotério de Manutenção e Experimentação do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). Os animais foram acondicionados em salas com ciclos claro/escuro de 12 h, com temperatura controlada (variando de 22 a 25°C) e com livre acesso à água e ração.

4.2. Delineamento Experimental

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da FMRP-USP (52/2021). Para avaliar os efeitos da suplementação materna com o resveratrol na prole SHR adulta, ratas SHR foram colocadas junto com machos SHR com 10 semanas de idade (cada casal em uma caixa) para realização do cruzamento e o casal foi tratado com uma dieta controle ou uma dieta suplementada com resveratrol (4g/kg de ração) até o nascimento dos filhotes. Neste momento, os machos SHR foram separados e as fêmeas SHR continuaram na dieta com resveratrol durante todo o período de aleitamento (21 dias). Após este período, os filhotes foram separados da mãe e separados por gênero (fêmeas e machos) para que fossem estudados nas 12 semanas (fase adulta). Nestas 12 semanas, os filhotes receberam dieta com ração padrão do biotério de Manutenção e Experimentação do Departamento de Fisiologia (sem suplementação com resveratrol). O mesmo foi realizado com ratas WKY e seus respectivos machos. Optamos por tratar o casal com resveratrol com o objetivo de analisar se este melhoraria parâmetros de fertilidade de machos quanto fêmeas hipertensas.

Os casais (ou matrizes) foram organizados da seguinte forma:

- Casal **WKY + Dieta controle** e Casal **WKY + Dieta c/ RESVERATROL**
- Casal **SHR + Dieta controle** e Casal **SHR + Dieta c/ RESVERATROL**

Ao nascimento dos filhotes, os machos foram separados e as fêmeas permaneceram tratadas com o resveratrol durante o aleitamento, organizadas da seguinte forma:

- Fêmea **WKY + Dieta controle** e Fêmea **WKY + Dieta c/ RESVERATROL**
- Fêmea **SHR + Dieta controle** e Fêmea **SHR + Dieta c/ RESVERATROL**

As análises foram realizadas na prole (machos e fêmeas) proveniente das mães suplementadas ou controle, assim, temos os seguintes grupos experimentais:

- **Fêmeas e Machos WKY + Dieta controle** e **Fêmeas e Machos WKY + Dieta c/ RESVERATROL**
- **Fêmeas e Machos SHR + Dieta controle** e **Fêmeas e Machos SHR + Dieta c/ RESVERATROL**

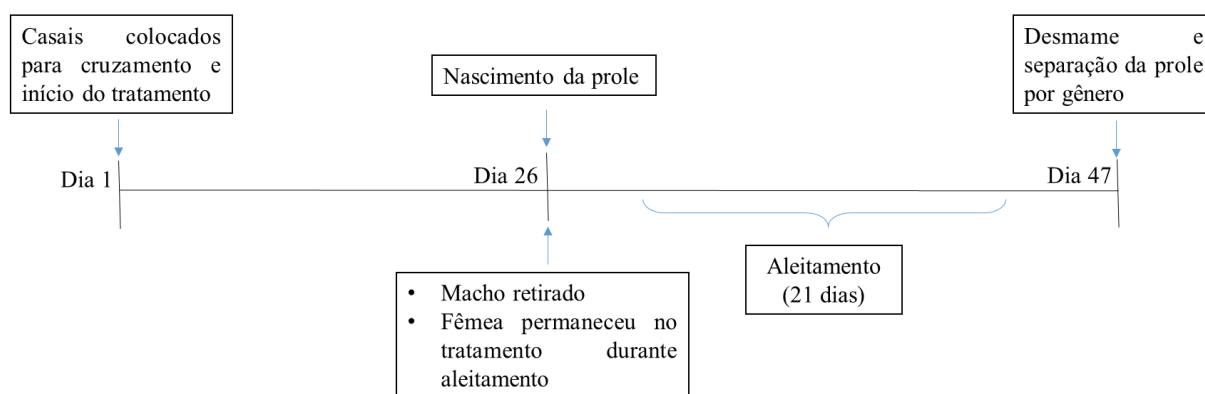


Figura 6 - Fluxograma para visualização da metodologia empregada no projeto.

4.3. Avaliação da Pressão Arterial Sistólica e Peso Corporal

A pressão arterial e o peso corporal foram avaliados semanalmente. A pressão arterial sistólica (PAS) foi avaliada pelo método de pletismografia de cauda. Para isto, os animais foram alocados do biotério para a sala de pletismografia e aclimatizados por uma hora para adaptação ao novo ambiente, a fim de minimizar o estresse e obter medidas fidedignas. Após isto, estes animais foram colocados em contensores adequados ao peso sobre uma placa aquecida a 37°C. Os manguitos do equipamento foram colocados na cauda dos animais e as variações de pressão foram identificadas por um sistema de aquisição de dados (CODA Non-Invasive Blood Pressure Acquisition System, Kent Scientific Corporation). Os resultados foram representados por uma média de todas as medidas consecutivas que foram obtidas para cada animal.

4.4. Dosagem de Proteínas pelo Método de Bradford

Antes de efetuar a zimografia em gel foi necessário dosar as proteínas das amostras para evitar variações proteicas inerentes a cada tecido. O método de Bradford é uma técnica que tem como objetivo determinar as proteínas totais dos tecidos. As aortas foram lavadas com solução de Krebs, trituradas e homogeneizadas em tampão de extração de proteínas (NaF 10 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, inibidor de protease 1X e RIPA q.s.p) por 16 horas. Os extratos foram centrifugados por 10 minutos, a 13.000 rpm e a 4°C. Os sobrenadantes foram retirados e colocados no freezer -80°C para determinação proteica. Os valores foram obtidos após a leitura por espectrofotometria (Espectrofotômetro Synergy H1 Microplate Reader, BioTek), para que fosse possível normalizar a quantidade que foi aplicada no gel de zimografia.

4.5. Avaliação da Atividade de MMP-2

4.5.1. Zimografia em gel

A zimografia em gel é uma técnica utilizada para avaliar a atividade das gelatinases, como a MMP-2. O princípio do método baseia-se no fato da MMP-2 degradar a gelatina do gel durante a eletroforese. As amostras foram previamente preparadas, aplicadas em géis de poliacrilamida 8% e separadas por eletroforese, conforme a técnica de SDS-PAGE. Após este processo, os géis foram submetidos a dois banhos de Triton X-100 para remoção do SDS e colocados em solução de incubação Tris-HCl/CaCl₂/NaCl (50mM Tris, 5 mM CaCl₂.2H₂O, 150 mM NaCl, pH 7,6) por 16 horas na estufa à 37°C. Posteriormente, foram corados em solução Coomassie Blue (metanol 25%, ácido acético 10% e Coomassie Blue G-250 0,05%) e em seguida descorados com solução descorante (metanol 25% e ácido acético 7%) para visualização da banda de 72 kDa da MMP-2. Dessa forma, foi observado a formação de bandas claras contra o fundo azul escuro do Coomassie (devido a degradação da gelatina incorporada ao gel). Para cada gel foi utilizado um controle positivo (soro fetal bovino). Por ele, é possível normalizar as quantidades de proteínas obtidas entre os géis, podendo compará-los entre si. A quantificação da banda de 72 kDa da MMP-2 foi feita por meio do software Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA).

4.5.2. Zimografia *in situ*

A zimografia *in situ* é uma técnica de fluorescência utilizada para avaliar atividade de gelatinases, utilizando o substrato DQ gelatina (#D12054, Invitrogen). Aortas foram incluídas em Tissue-Tek (O.C.T), cortadas no criostato em secções de 5 µm de espessura e incubadas com substrato fluorogênico DQ gelatina, em tampão Tris-CaCl₂ na estufa, à 37°C por 1 hora. Os cortes foram lavados em tampão salina fosfato (PBS) e fixados em formalina tamponada

4%. As imagens dos cortes foram fotografadas (400x) por microscópio de fluorescência (Leica CTR 6000 Fluorescence Microscope; em nm: excitação: 495, emissão: 515). O software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA) foi usado para quantificar a fluorescência. Na lâmina que representa o animal, foram fotografadas três áreas diferentes de um mesmo corte e em cada uma delas foi realizada a quantificação da intensidade da fluorescência verde através de 40 campos selecionados ao redor da circunferência do vaso. A intensidade de fluorescência desses campos foi usada para calcular a média aritmética da fluorescência de cada lâmina. Os resultados foram apresentados como a intensidade de fluorescência (Unidades arbitrárias).

4.6. Avaliação do Estresse Oxidativo

4.6.1. DHE *in situ*

Os tecidos aórticos foram previamente incluídos verticalmente em Tissue-Tek (O.C.T), congelados e cortados no criostato em seções de 5 µm. Após isto, as lâminas foram incubadas a 37°C durante 30 min com dihidroetídio (DHE; #D7008, Sigma-Aldrich) na concentração de 10 µM em uma câmara umidificada escura. Após a incubação, os cortes foram lavados com PBS e fotografados (400x) no microscópio de fluorescência (Leica CTR 6000 Fluorescence Microscope; nm: excitação 535, emissão 610). O estresse oxidativo foi medido pela fluorescência emitida pelos núcleos após a reação do etídio com ânion superóxido. O software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA) foi usado para quantificar a fluorescência. Na lâmina que representa o animal, foram fotografadas três áreas diferentes de um mesmo corte e em cada uma delas foi realizada a quantificação da intensidade da fluorescência vermelha emitida pelos núcleos, sendo esta intensidade usada para calcular a média aritmética da fluorescência de cada lâmina. Os resultados foram apresentados como intensidade de fluorescência (Unidades arbitrárias).

4.6.2. Quimioluminescência Derivada da Lucigenina

Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato pH 7,4 (20 mmol/L de KH_2PO_4 , 1 mmol/L de EGTA e 150 mmol/L de sacarose). A reação foi iniciada pela adição do substrato NADPH (0,1 mmol/L) a uma suspensão (com volume final de 250 µL) contendo amostra (50 µL), lucigenina (5 µmol/L) e tampão fosfato pH 7,4. Os valores de luminescência foram obtidos a partir da subtração do valor basal (obtido pela medida da amostra, tampão fosfato com lucigenina) pelo valor obtido após adição de NADPH. Foram realizados 30 ciclos de leitura em luminômetro Orion II (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemanha). Em todos protocolos experimentais, o conteúdo proteico das amostras foi analisado pelo método de

Lowry (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Os resultados foram normalizados pela concentração proteica de cada amostra e expressos em URL (unidades relativas de luz)/mg de proteína.

4.6.3. Imunohistoquímica (IHQ) para Nitrotirosina

Aortas previamente incluídas em parafina foram cortadas a 5 µm. Após recuperação antigênica com tampão citrato pH 6,0, os cortes foram bloqueados com H₂O₂ 3% e reagente de bloqueio do kit (IHC Select™ Immunoperoxidase Secondary Detection System; #DAB150, Millipore) e incubados com anticorpo primário para nitrotirosina (Anti-nitrotirosina; #06-284, Millipore, 10 µg/mL), e com o anticorpo biotilado secundário do kit (IgG de cabra anti-rato e IgG de cabra anti-coelho). As lâminas foram marcadas com estreptavidina e diaminobenzidina (DAB) e contra coradas com hematoxilina. Na presença de ONOO⁻, os resíduos de tirosina passam por nitração e formam nitrotirosina, cujos níveis foram medidos no microscópio de Microdissecção a Laser Leica LMD6500 pela marcação em marrom pelo DAB. A quantificação das imagens foi feita com ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA). Para avaliar a marcação para nitrotirosina, foram fotografadas cinco áreas diferentes de um mesmo corte na lâmina que representa o animal e em cada uma delas foi realizada a quantificação da intensidade de imunorreatividade de 40 campos selecionados ao redor da circunferência da artéria. A intensidade da imunorreatividade destes campos foi usada para calcular a média aritmética de cada lâmina. Os resultados foram apresentados em unidades arbitrárias.

4.7. Avaliação de Óxido Nítrico (NO) *in situ*

Tecidos aórticos foram previamente incluídos em O.C.T, congelados e cortados no criostato em secções de 5 µm. A visualização da geração de NO foi realizada *in situ* utilizando as sondas fluorescentes 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA, 10 µmol/L; #D2813, Sigma-Aldrich). Após a incubação por 30 min a 37°C em câmara úmida e escura, os cortes foram lavados com PBS. As imagens dos cortes foram fotografadas (400x) utilizando microscópio de fluorescência (Leica CTR 6000 Fluorescence Microscope; em nm: excitação: 495, emissão: 515). O software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA) foi usado para quantificar a fluorescência. Na lâmina que representa o animal, foram fotografadas três áreas diferentes de um mesmo corte e em cada uma delas foi realizada a quantificação da intensidade da fluorescência verde através de 40 campos selecionados ao redor da circunferência da artéria. A intensidade de fluorescência desses campos foi usada para calcular a média aritmética da fluorescência de cada lâmina. Os resultados foram apresentados como a intensidade de fluorescência (Unidades arbitrárias).

4.8. Análise Morfológicas das Aortas

A aorta torácica foi removida do animal, fixada em formalina tamponada a 10% (pH 7,0) por 24 horas, seguido por mais 24 horas em etanol 70%. Depois disso, os tecidos foram lavados numa sequência de álcool e xilol e incluídos em parafina. As aortas foram cortadas em uma espessura de 5 μm em micrótomo (Jung/Leica RM 2065) e coradas com hematoxilina e eosina. Os parâmetros morfológicos razão M/L e CSA foram quantificados pelo ImageJ. A razão M/L foi calculada como a divisão da camada média (M) pelo diâmetro interno (DI), onde M é representada pelo diâmetro externo (ED)-DI/2. DE e DI são representados como raiz quadrada de $4 \times \text{área externa}/\pi$ e a raiz quadrada de $4 \times \text{área interna}/\pi$, respectivamente. O CSA foi calculado subtraindo a área interna do lúmen da área externa, representado em μm^2 .

4.9. Avaliação dos Efeitos *in vitro* do Resveratrol na Atividade de MMP-2

Para investigar se o resveratrol inibe diretamente a MMP-2, foi realizada incubação dos géis de zimografia contendo MMP-2 recombinante humana (#PF037, Millipore) com diferentes concentrações de resveratrol. A MMP-2 (3 ng) foi aplicada em géis de poliacrilamida 8% em condições não redutoras. Após isto, os géis foram submetidos a dois banhos de Triton X-100 e incubados durante 16 horas com resveratrol a 30 μM , 60 μM e 1200 μM diluídos em etanol na solução de incubação Tris-HCl/CaCl₂/ NaCl (50 mM Tris, 5 mM CaCl₂.2H₂O, 150 mM NaCl, pH 7,6) a 37 C°. A maior concentração de etanol utilizada foi 6%. Posteriormente, os géis foram corados em solução Coomassie Blue (metanol 25%, ácido acético 10% e Coomassie Blue G-250 0,05%) e em seguida descorados com solução descorante (metanol 25% e ácido acético 7%) para visualização das bandas referentes a MMP-2. A albumina de soro fetal bovino foi o controle interno de cada gel. O inibidor de MMP-2, ARP-100, foi utilizado como controle positivo em uma concentração de 20 μM . As intensidades das bandas (72 e 64 kDa) foram quantificadas por ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA).

4.10. Análise Estatística

Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias ou One-Way ANOVA (Dunnett), seguido de pós-teste de Bonferroni usando GraphPad Prism Software, versão 6.01 (Califórnia, EUA). Considerou-se estatisticamente significativos valores com $p < 0,05$. Os gráficos foram representados como média \pm erro padrão da média.

5. RESULTADOS

5.1. Peso Corporal e Consumo diário de ração e resveratrol

O peso corporal da prole foi avaliado semanalmente da 8^a até a 12^a semana de idade, sendo que fêmeas e machos SHR apresentaram pesos diferentes de seus respectivos controles WKY (* $p < 0,05$; Fig. 7). Em resumo, fêmeas SHR apresentam peso corporal menor do que fêmeas WKY (Fig. 7A) e machos SHR apresentaram peso corporal maior do que machos WKY (Fig. 7B). Além disso, foi visto que o tratamento de ratas prenhas com resveratrol não alterou o peso da prole a longo prazo; assim sendo, não prejudicou o seu desenvolvimento. Em adição, não foram observadas anomalias físicas nos filhotes nascidos de casais SHR e casais WKY, assim como não foram observados natimortos. Nós não pesamos os filhotes ao nascer para evitar o estresse das mães e assim evitar com que elas comessem os filhotes. Mesmo assim, algumas ratas SHR praticaram canibalismo, já que foi observado o nascimento dos filhotes, entretanto, após alguns dias eles já não estavam mais na caixa.

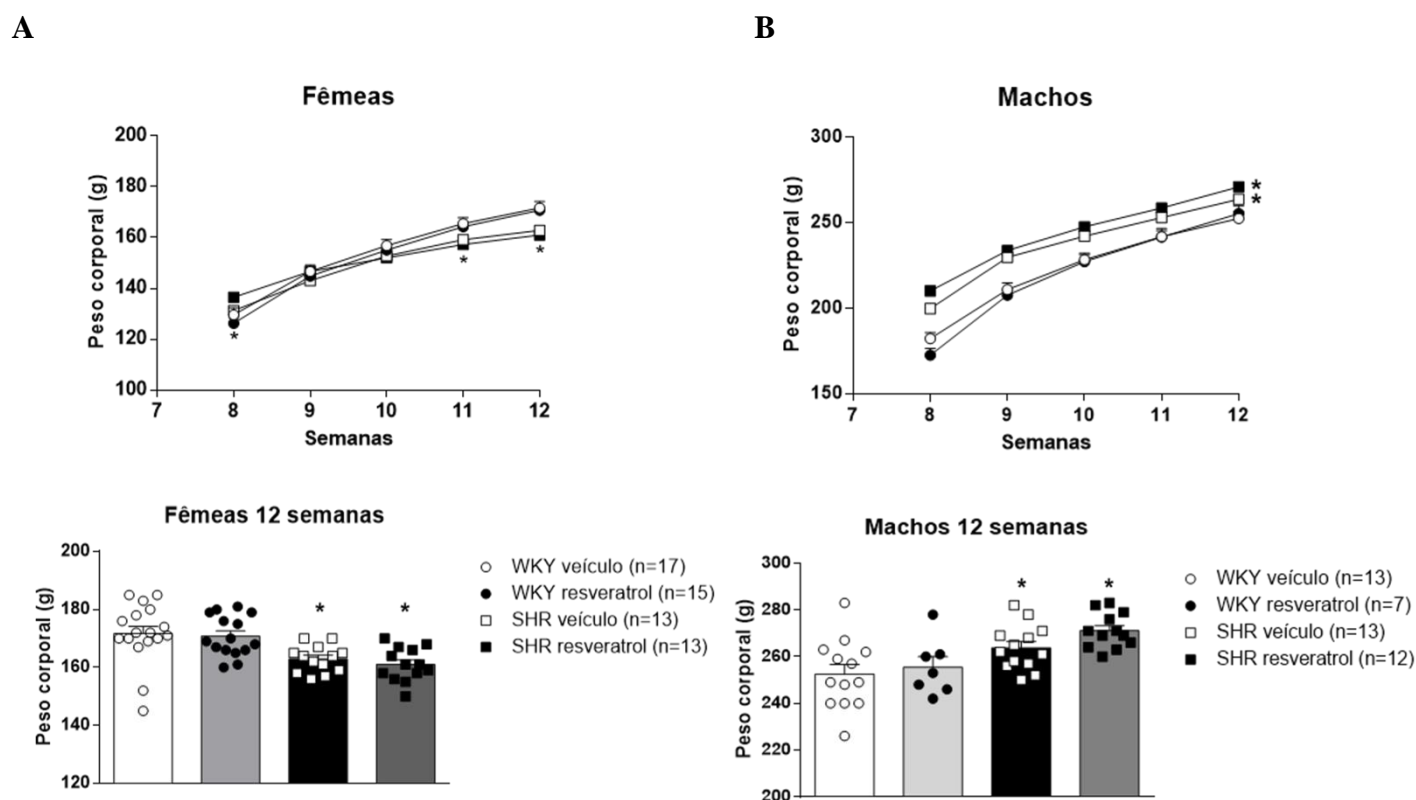


Figura 7 - Avaliação semanal do peso corporal de fêmeas (A) e machos (B) SHR nascidos de ratas tratadas ou não com resveratrol (durante gestação e amamentação). Valores expressos como média \pm erro padrão (* $p < 0,05$ versus grupos controles; $n = 7-17$).

A dose de resveratrol utilizada para o tratamento foi 4 g/kg de dieta. Artigos nos mostram que esta dose corresponde ao consumo de aproximadamente 0,15 g de

resveratrol/kg/dia, sendo que a concentração plasmática final alcançada está dentro de valores terapêuticos esperados (10-20 $\mu\text{mol/L}$)⁶⁴. Assim, com o intuito de sabermos o consumo aproximado de resveratrol pelos animais, medimos seu consumo diário de ração.

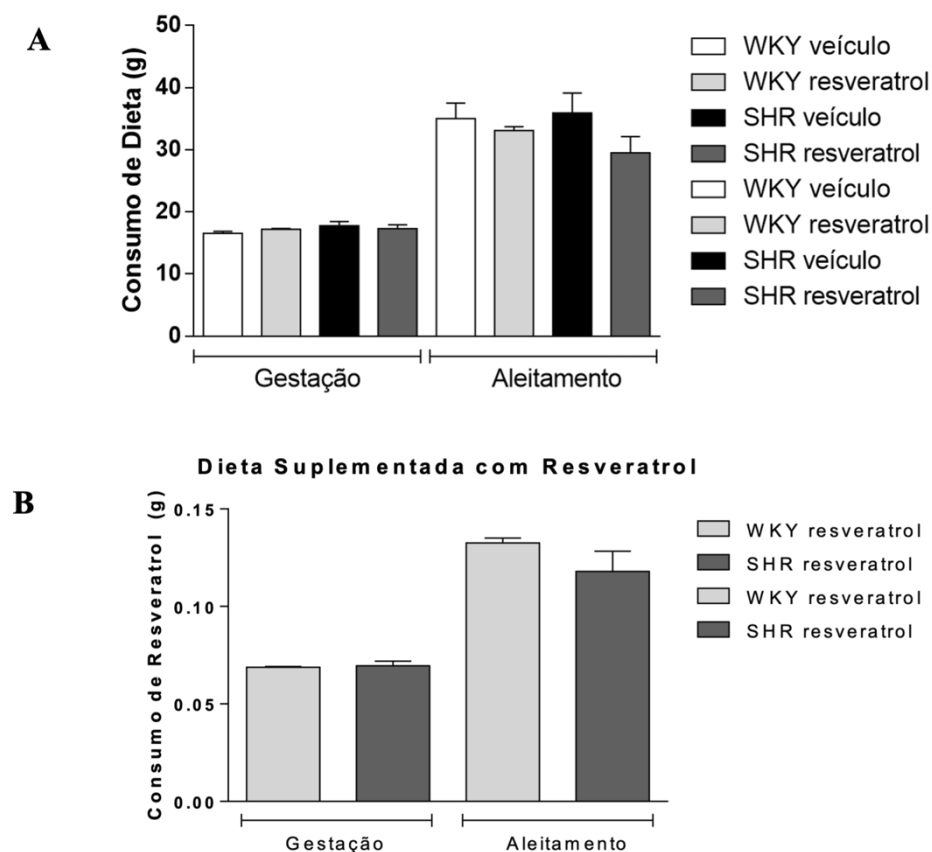


Figura 8 – O gráfico A representa a média de consumo de ração por dia e o gráfico B representa a média de consumo de resveratrol por dia. Os valores foram plotados de forma separada, levando em consideração os períodos de gestação e aleitamento.

A ninhada de cada casal colocado para cruzamento variou entre dois a dez filhotes. Foi observada a morte de três filhotes WKY provenientes de casais tratados com resveratrol no dia do desmame. E, após o desmame e separação dos filhos de acordo com gênero, mais três filhotes de casal WKY tratado com resveratrol foram encontrados mortos. Dessa forma, observamos seis mortes durante os protocolos realizados.

5.2. Resveratrol reduz a pressão arterial sistólica (PAS) da prole SHR adulta

O resultado mostra que a PAS de fêmeas e machos SHR foi significativamente mais alta que seus respectivos controles WKY da 8ª até 12ª semana (Fig. 9A, B; $p < 0,01$). O tratamento com resveratrol durante a gestação e aleitamento reduziu a PAS elevada da prole SHR fêmea na 10ª semana ($n=13$, 160.87 ± 2.82 vs. 180.57 ± 5.03 ; $n=10$, $p < 0,05$) e na 12ª semana ($n=13$, 165.35 ± 3.23 vs. 176.94 ± 2.47 ; $n=10$, $p < 0,05$; Fig. 9A). Esta redução da PAS elevada também parece ocorrer na 10ª semana ($n=12$, 188.9 ± 3.63 vs. 180.6 ± 3.78 ; $n=9$, $p=0,56$) e 12ª semana ($n=12$, 183.9 ± 3.69 vs. 199.3 ± 4.23 ; $n=9$, $p=0,07$; Fig. 9B) da prole SHR machos derivados dos casais tratados com resveratrol durante a gestação e aleitamento.

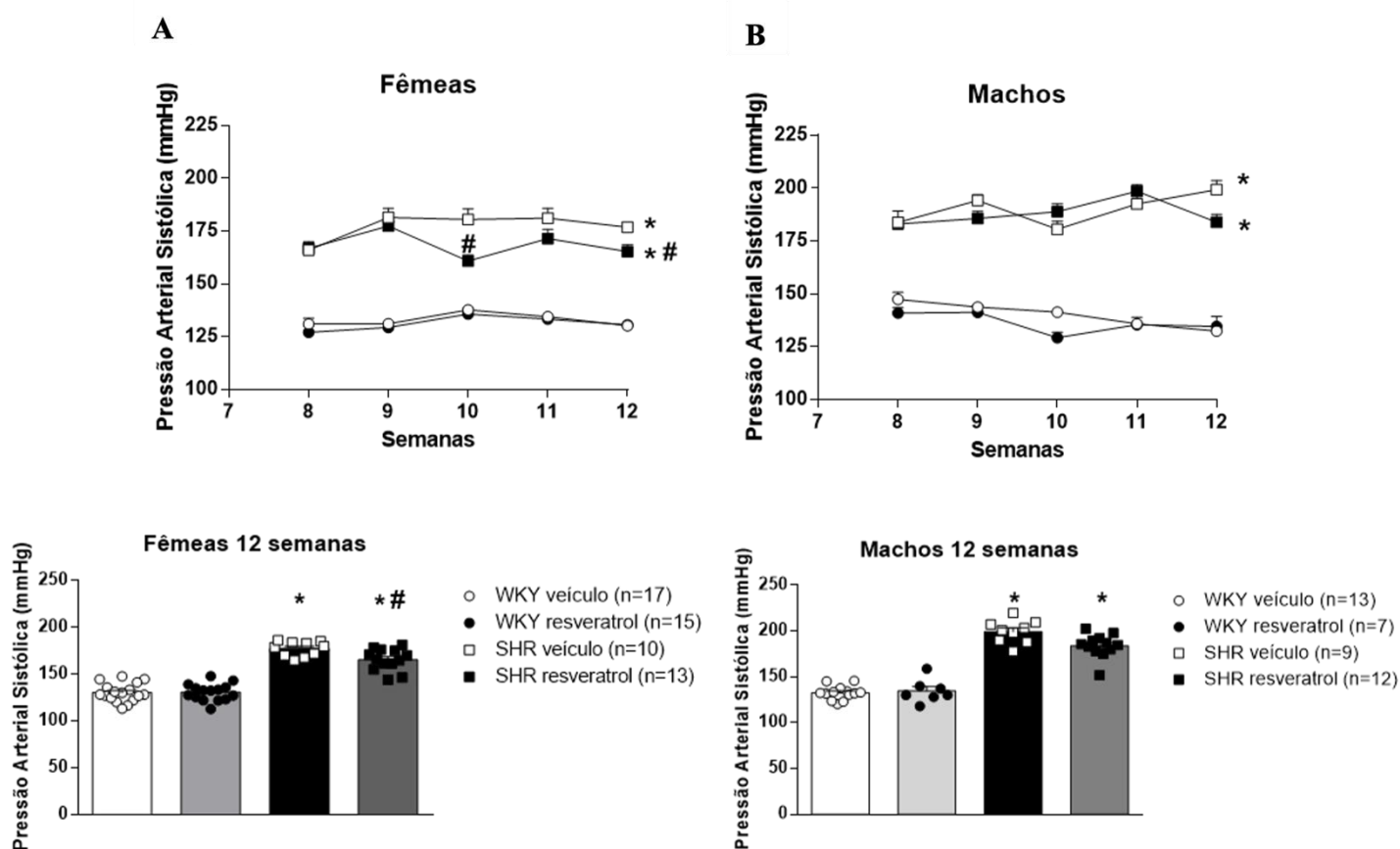


Figura 9 - Pletismografia de cauda em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) versus controles (WKY) separados por gênero, sendo demonstrado em (A) fêmeas e em (B) machos. Valores expressos como média \pm erro padrão ($*p < 0,05$ versus grupos controles; $\#p < 0,05$ versus grupos SHR; $n=7-17$).

Quando os dados foram plotados sem distinção de gênero, observamos redução da PAS nos animais hipertensos, cuja as mães receberam resveratrol na gestação e aleitamento, nas semanas 9, 10 e 12 (Fig. 10; $\#p < 0,05$ vs. SHR veículo).

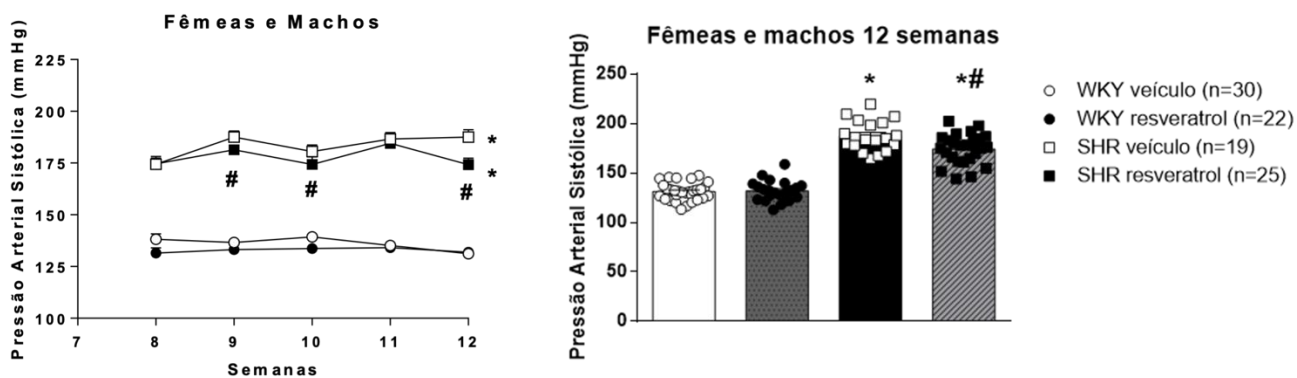
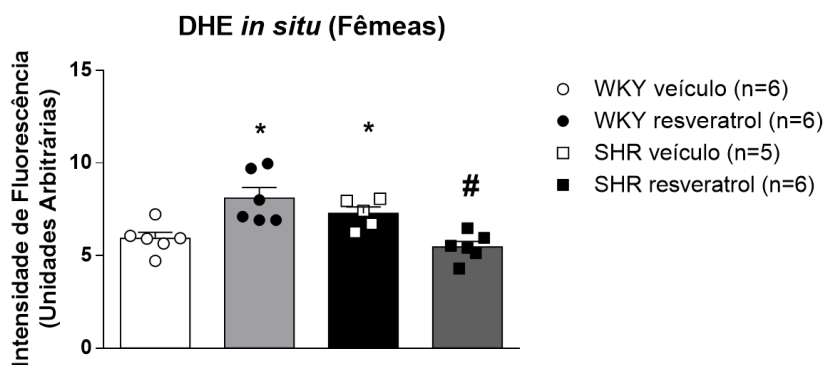
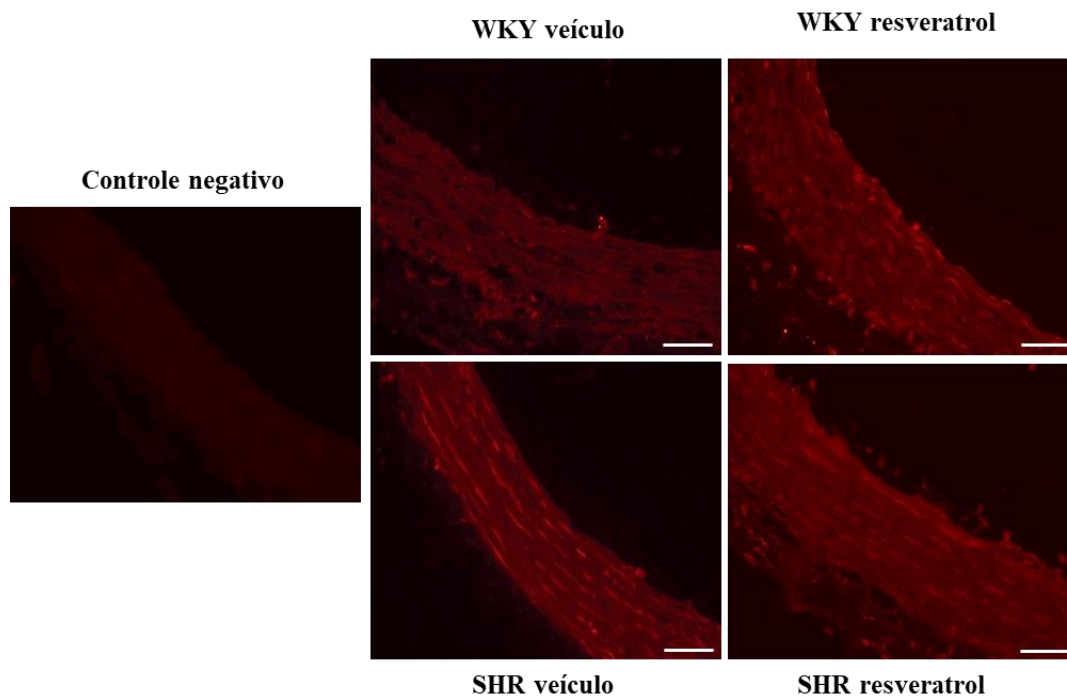


Figura 10 - Pletismografia de cauda em animais espontaneamente hipertensos (SHR) versus controles (WKY) sem distinção de gênero. Valores expressos como média \pm erro padrão (* $p < 0,05$ versus grupos controles; # $p < 0,05$ versus grupo SHR veiculo; $n = 19-30$).

5.3. Resveratrol diminui o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas aortas de ratas SHR, mas não em machos SHR

O estresse oxidativo foi avaliado nas aortas já que o excesso na produção de EROs é um dos mecanismos que contribui ao aumento da atividade de MMP-2, resultando na degradação exacerbada dos componentes da MEC e no remodelamento vascular mal adaptativo em animais hipertensos. Dessa forma, avaliamos a produção de EROs nas aortas da prole SHR adulta pela técnica de DHE *in situ* e quimiluminescência da lucigenina. A produção de EROs foi aumentada nas aortas de ratos e ratas SHR quando comparados aos seus controles (* $p < 0,05$; Figuras 11, 12). O resveratrol reduziu EROs apenas nas aortas das fêmeas SHR (# $p < 0,05$; Figura 11A). Por causa disto, e para complementar este resultado *in situ*, foi feito também a quimiluminescência da lucigenina nas aortas das fêmeas SHR adultas. Também observamos aumento de EROs em ratas SHR quando comparadas com seu controle WKY (* $p < 0,05$; Figura 11B), sendo que o tratamento com resveratrol levou à redução destas (# $p < 0,05$).

A



B

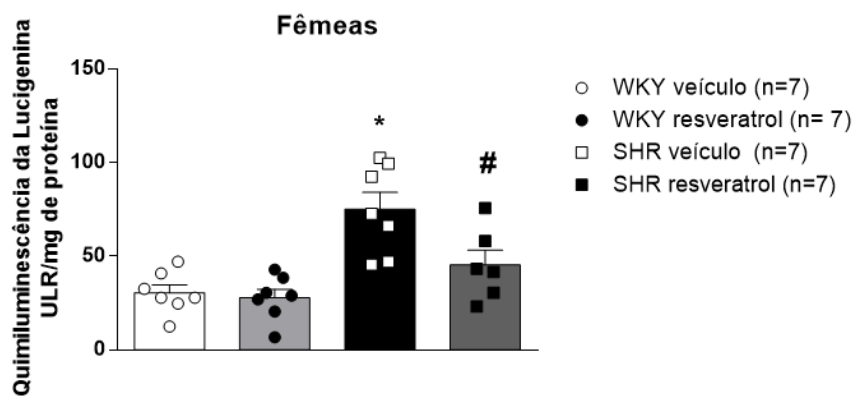


Figura 11 - Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela técnica de DHE (dihidroetídio) representada pela letra A e quimiluminescência de lucigenina representada pela letra B nas aortas de fêmeas SHR nascidas de ratas tratadas ou não com resveratrol. As fotografias são representativas de cada grupo (400x) e a barra de escala representa 50 μ m, seguidas dos resultados apresentados como a intensidade de fluorescência (Unidades arbitrárias) para DHE. Para lucigenina, os resultados são apresentados como ULR/ mg de proteína. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão (* $p < 0,05$ versus controles; # $p < 0,05$ versus grupo SHR veículo; $n = 5-7$).

Embora a quantidade de EROs aumentou nas aortas da prole SHR machos (* $p < 0,05$ vs. WKY; Figura 12), o tratamento das mães com resveratrol durante a gestação e o aleitamento não resultou em melhora deste parâmetro nestes animais quando adultos.

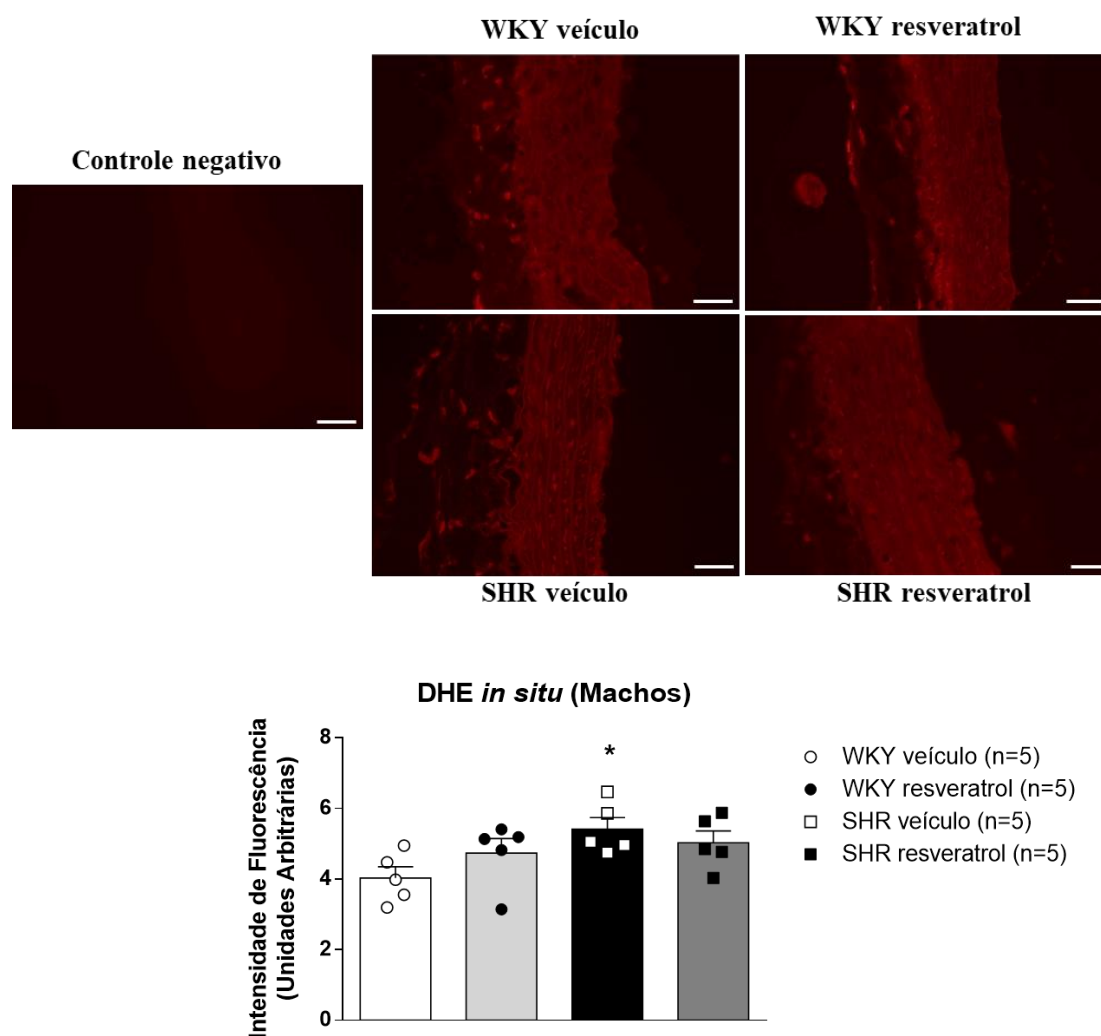


Figura 12 - Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela técnica de DHE (dihidroetídio) em aortas de machos SHR nascidos de ratas tratadas ou não com resveratrol (durante gestação e amamentação). As fotografias são representativas de cada grupo (400x) e a barra de escala

representa 50 μ m, seguidas dos resultados apresentados como a intensidade de fluorescência (Unidades arbitrárias). Os valores estão expressos como como média \pm erro padrão (* p <0,05 versus controles; $n=5$).

O excesso de EROs, tais como ânion superóxido, pode se combinar com o NO formando o peroxinitrito, que é uma das EROs mais prejudiciais ao tecido. O peroxinitrito pode aumentar a atividade da 72 kDa MMP-2 nas aortas de ratos hipertensos por S-glutatioilação¹⁸. Quanto maior a quantidade de peroxinitrito no tecido, maior a nitração proteica, resultando na formação de nitrotirosina. Por isso, a quantidade de nitrotirosina formada nas aortas de fêmeas SHR adultas foi avaliada por IHQ. Com isto, vimos que há aumento de nitrotirosina nas aortas de fêmeas SHR adultas quando comparadas com as aortas de fêmeas WKY (* p <0,05; Fig. 13). O tratamento das mães SHR com resveratrol na gestação e aleitamento reduziu as quantidades elevadas de nitrotirosina nas aortas da prole SHR fêmea (# p <0,05 vs. WKY; Fig. 13).

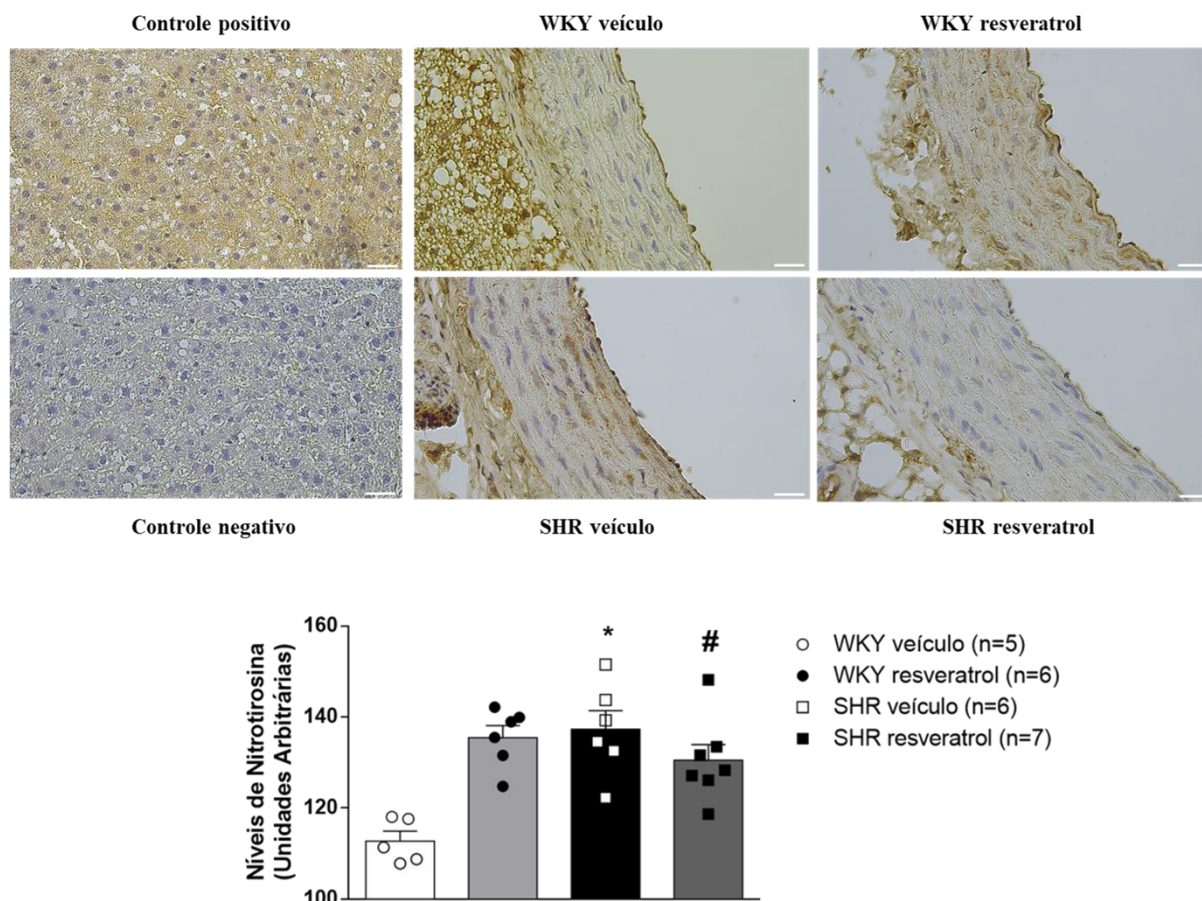


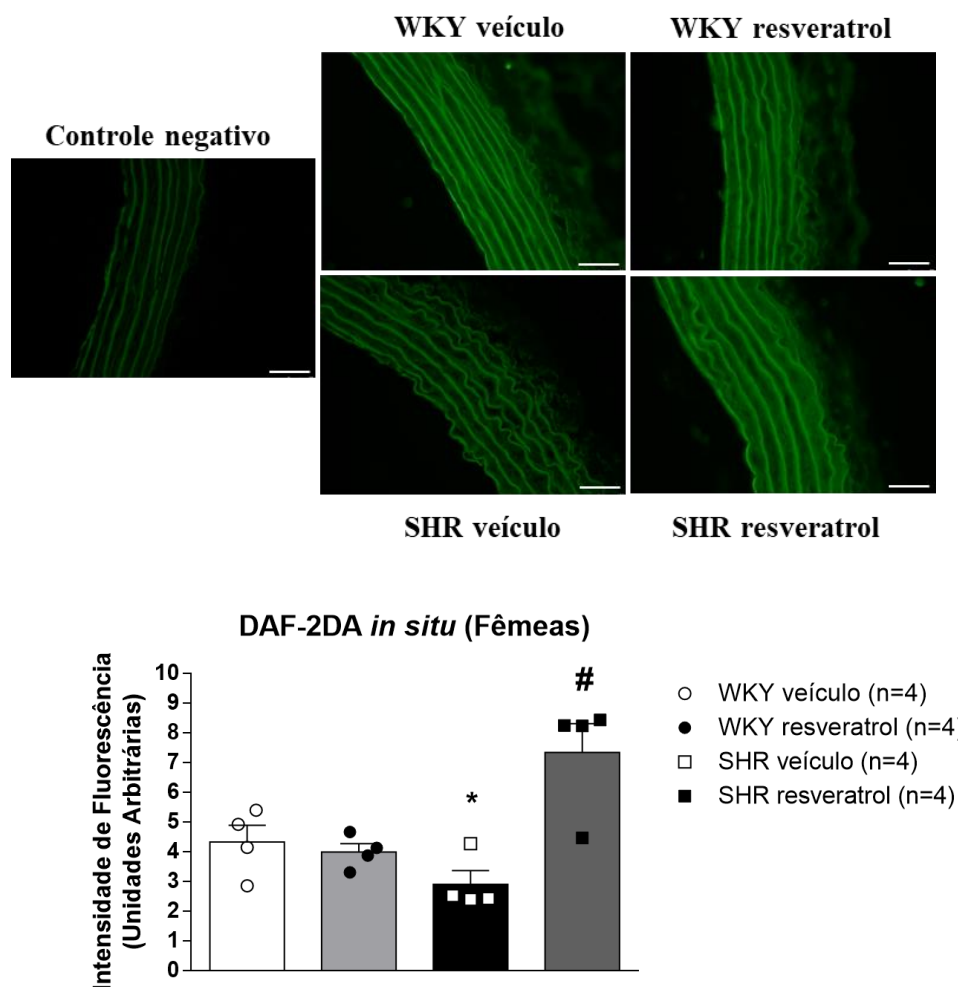
Figura 13 - Avaliação da presença de peroxinitrito pela técnica de imunohistoquímica para nitrotirosina em aortas de fêmeas SHR nascidas de ratas tratadas ou não com resveratrol (durante gestação e amamentação). As fotografias são representativas de cada grupo (400x) e a barra de escala representa

50 μm , seguidas dos resultados apresentados em unidades arbitrárias. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão (* $p < 0,05$ versus controles; # $p < 0,05$ versus SHR veículo, $n=5-7$).

5.4. Resveratrol aumentou a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) na prole hipertensa

Ratos SHR apresentam baixa biodisponibilidade de NO nas artérias e o resveratrol pode aumentar o NO por diversos mecanismos⁶⁵. Por conta disto, a produção de NO foi avaliada nas aortas da prole SHR adulta, fêmeas e machos. Observamos que tanto fêmeas quanto machos SHR adultos apresentaram menor produção de NO em comparação aos seus respectivos controles (* $p < 0,05$ vs. WKY veículo; Figuras 14 A, B). O tratamento das mães SHR com resveratrol na gestação e aleitamento foi capaz de aumentar novamente a biodisponibilidade de NO nas aortas de machos e fêmeas SHR (# $p < 0,05$ vs. SHR veículo).

A



B

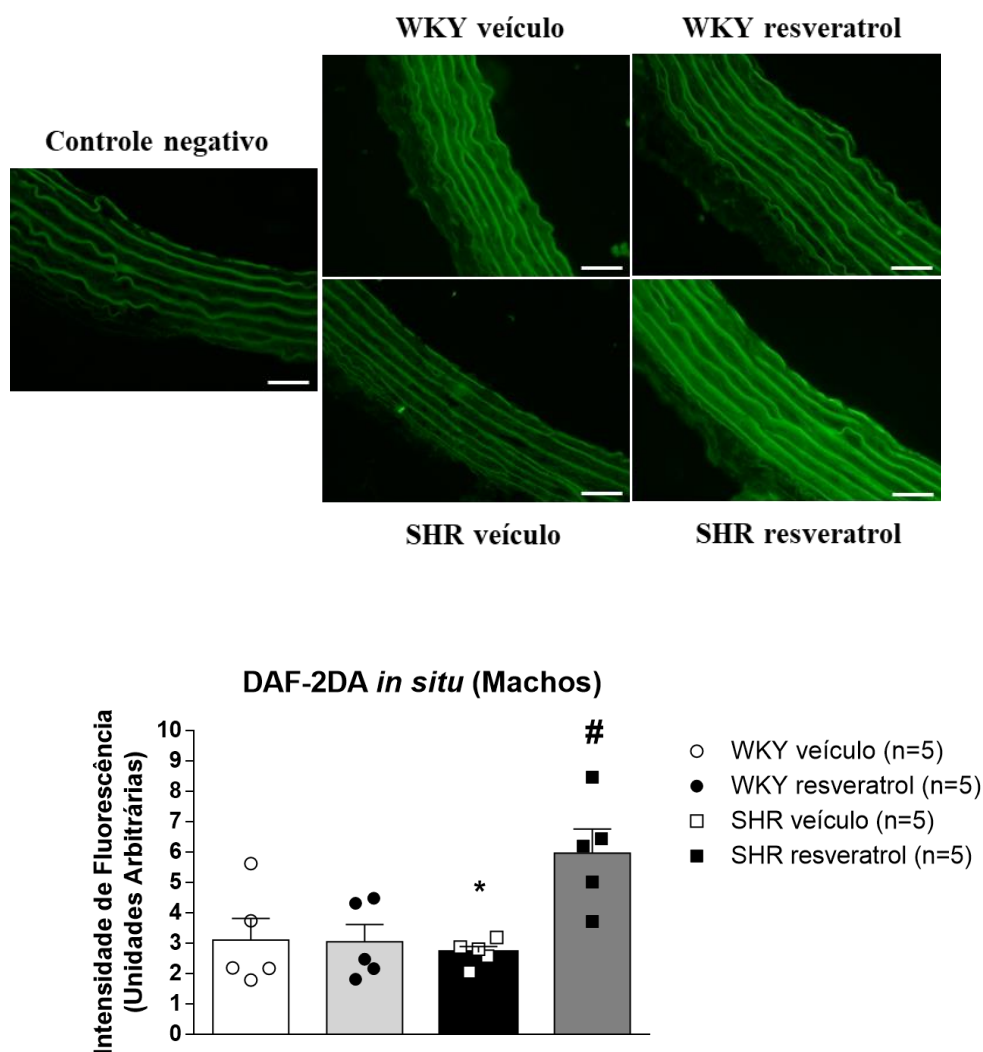


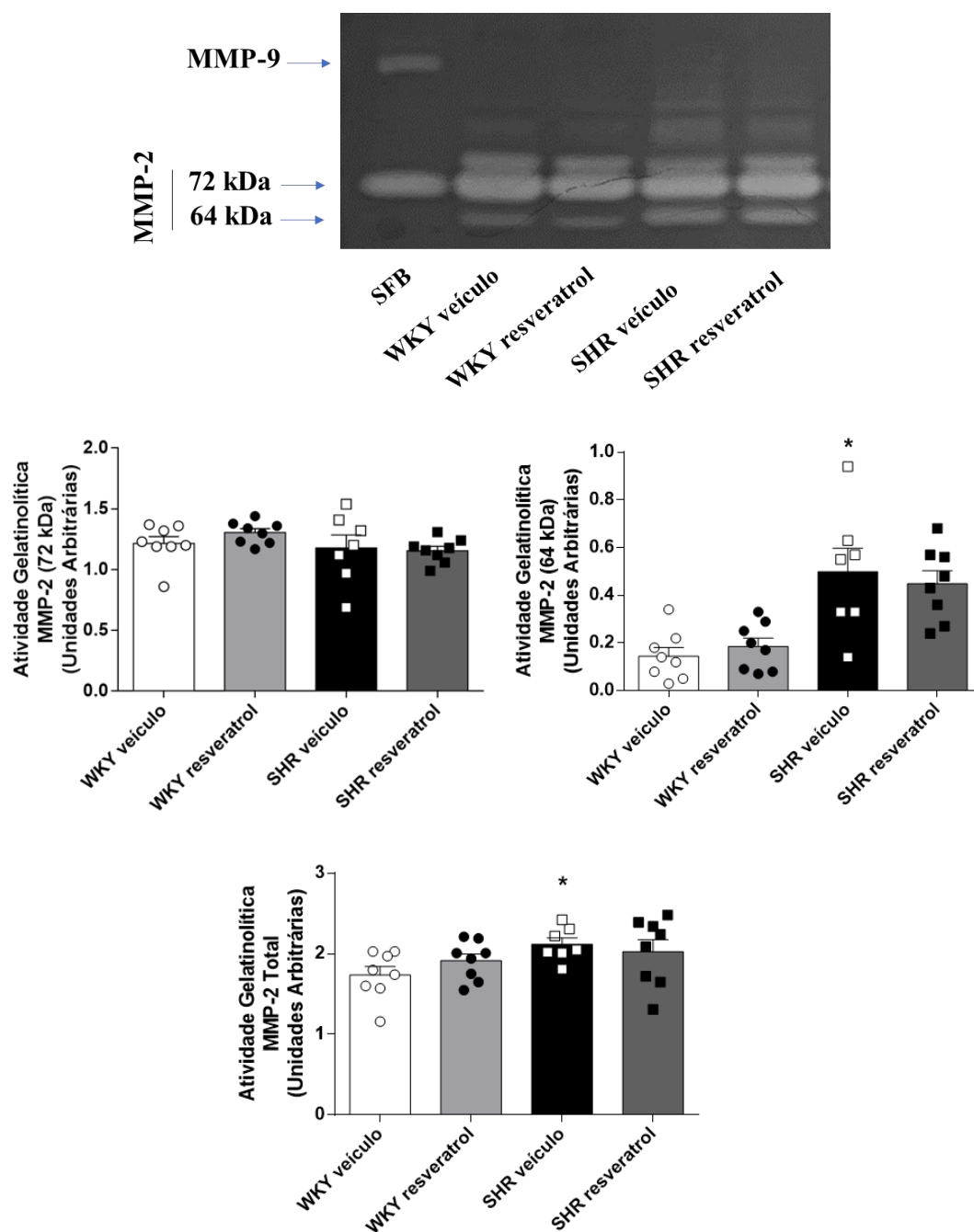
Figura 14 - Avaliação do efeito do resveratrol sobre a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) na prole de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) versus controle (WKY) separados de acordo com o gênero, sendo representado em (A) fêmeas e em (B) machos. As fotografias são representativas de cada grupo (400x) e a barra de escala representa 25 μ m, seguidos dos resultados apresentados como a intensidade de fluorescência (Unidades arbitrárias). Os valores estão expressos como média \pm erro padrão (* $p < 0,05$ versus grupos controles; # $p < 0,05$ versus grupo SHR veículo; $n = 4$).

5.5. Efeito do resveratrol sobre a atividade gelatinolítica de MMP-2 na prole hipertensa

A atividade de MMP-2 está aumentada nas artérias em vários modelos animais de hipertensão, inclusive em ratos SHR. Este aumento de atividade pode ser influenciado por fatores como estresse oxidativo^{19,38}. Por ser antioxidante, o resveratrol pode então diminuir a atividade da MMP-2. Dessa forma, avaliamos a atividade da MMP-2 por zimografia em gel em

aortas tanto da prole feminina (Fig. 15A) quanto masculina (Fig. 15B). Foi visto um aumento significativo da atividade gelatinolítica da MMP-2 de 64 kDa nas aortas das fêmeas e machos SHR quando comparados aos seus respectivos controles WKY (* $p < 0,05$; Fig. 15A e B). O tratamento com resveratrol não demonstrou efeito sobre a atividade gelatinolítica de nenhuma isoforma de MMP-2. Entretanto, o resveratrol pode ligar-se diretamente ao sítio catalítico da MMP-2, e esta ação pode fazer com que durante a eletroforese, o resveratrol se desligue da MMP-2 deixando de inibi-la durante a zimografia em gel. Por este motivo, também realizamos a zimografia *in situ* para responder aos efeitos do resveratrol sob a MMP-2.

A



B

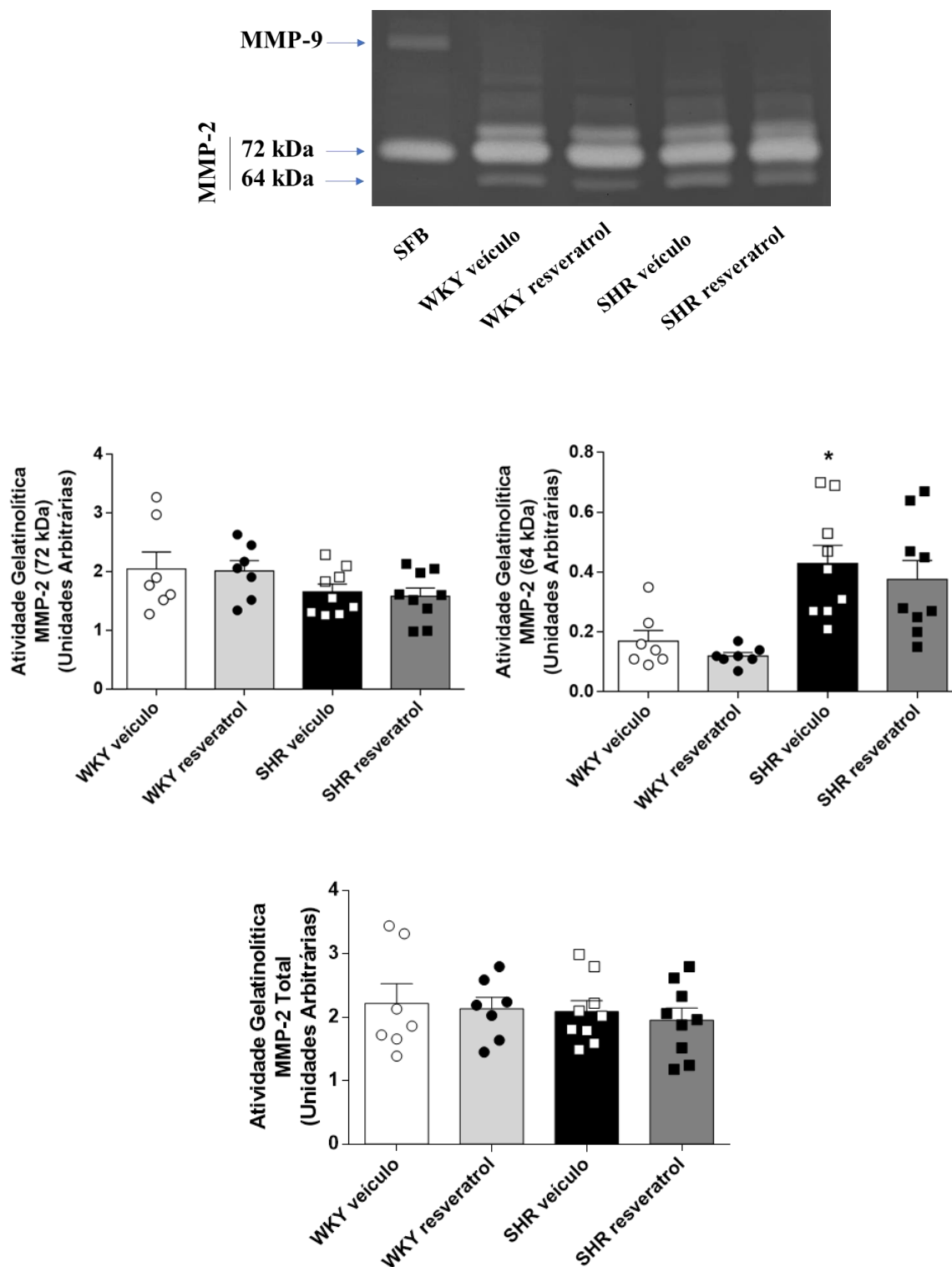
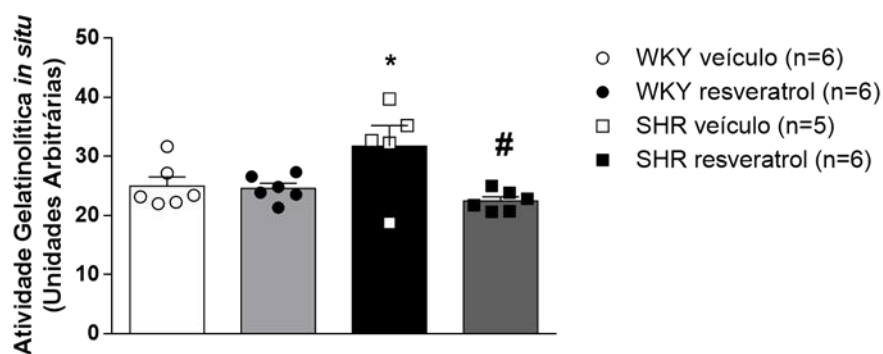
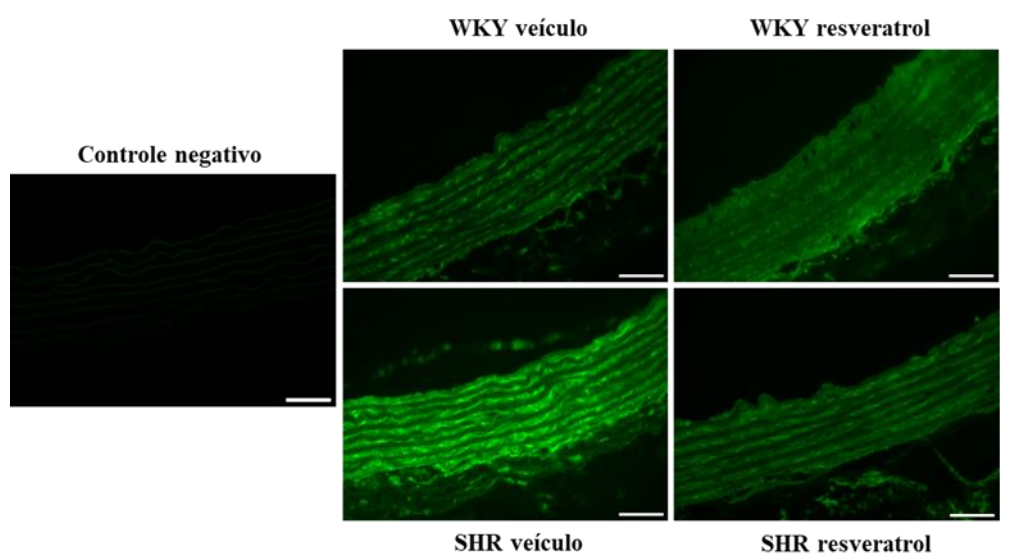


Figura 15 - Avaliação do efeito do resveratrol sobre a atividade de MMP-2 por zimografia em gel na prole de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) versus controles (WKY), separados de acordo com o gênero, sendo demonstrado em (A) fêmeas e em (B) machos. Os géis são representativos de cada

grupo, seguidos dos resultados apresentados em unidades arbitrárias. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão (* $p < 0,05$ versus grupos controles; $n = 7-8$).

A atividade desta protease foi avaliada então por zimografia *in situ* nas aortas da prole feminina e masculina (Fig. 16A, B). A aorta de ratas SHR apresentou aumento da atividade gelatinolítica (* $p < 0,05$ vs. WKY veículo) e o tratamento com resveratrol foi capaz de reverter esse aumento (# $p < 0,05$ vs. SHR veículo; Fig. 16A). Em adição, a atividade gelatinolítica na aorta de machos SHR também estava aumentada em relação aos controles (* $p < 0,05$ vs. WKY veículo) e o resveratrol reduziu este aumento (# $p < 0,05$ vs. SHR veículo; Fig. 16B).

A



B

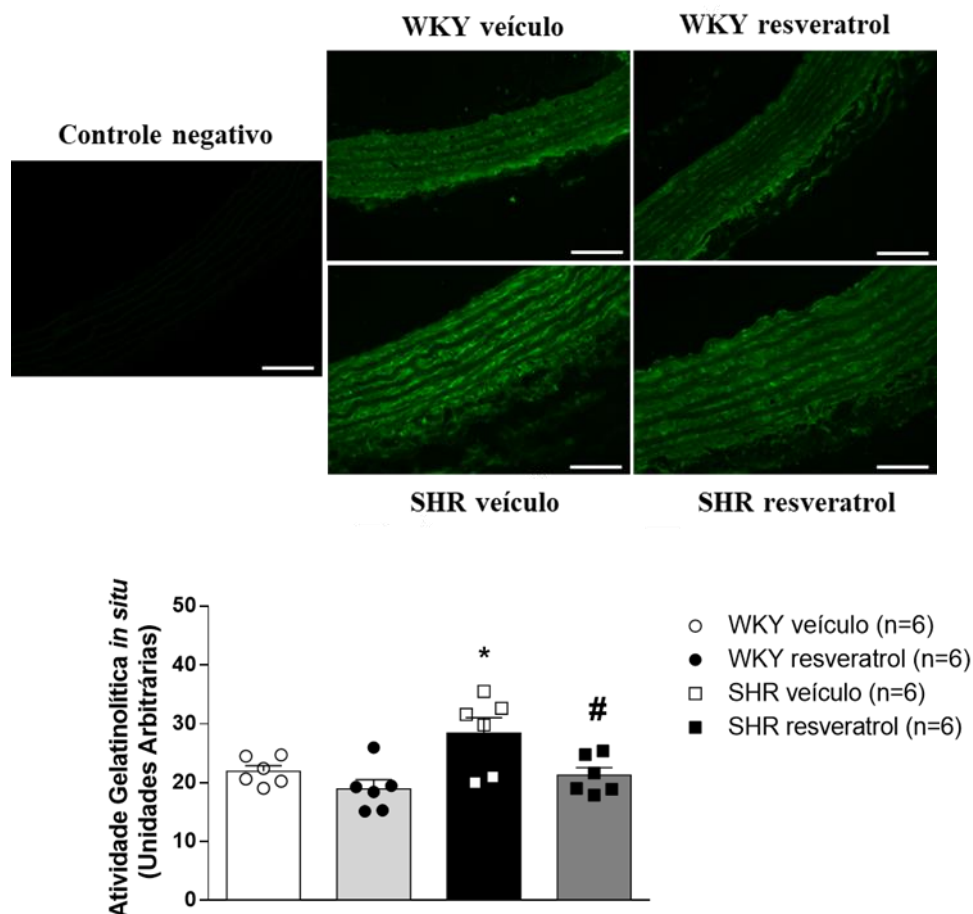


Figura 16 - Avaliação do efeito do resveratrol sobre a atividade gelatinolítica por zimografia *in situ* na aorta da prole de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) versus controle (WKY) separada de acordo com o gênero, sendo demonstrado em (A) fêmeas e em (B) machos. As fotografias são representativas de cada grupo (400x) e a barra de escala representa 25 μ m, seguidas dos resultados apresentados como a intensidade de fluorescência (Unidades arbitrárias). Os valores estão expressos como média \pm erro padrão (* $p < 0,05$ versus grupos controles; # $p < 0,05$ versus grupo SHR veículo; $n = 5-6$).

5.6. Efeito do resveratrol sobre a atividade gelatinolítica de MMP-2 *in vitro*

O tratamento com o resveratrol em ratas SHR prenhas atenuou o estresse oxidativo da prole feminina, mas não demonstrou este efeito na prole masculina. Apesar disto, a atividade gelatinolítica demonstrou estar diminuída em ambos os sexos. Assim vê-se que o estresse oxidativo não parece ser o único mecanismo responsável por influenciar a atividade de MMP-2. Através de estudos de docking molecular, o resveratrol mostrou atuar diretamente sobre o sítio ativo da MMP-2, inibindo sua atividade. A interação do resveratrol com o sítio ativo da MMP-2 ocorre via formação de ligações de hidrogênio com os aminoácidos Leu 164, Ala 165

e Thr 227, enquanto que resíduos Ala 217 e Ala 220 da MMP-2 interagem com o antioxidante através de ligações polares⁵³. Com isto, avaliamos a atividade da MMP-2 utilizando resveratrol nas concentrações de 30, 60 e 1200 μM *in vitro*. Observamos que todas as concentrações de resveratrol foram capazes de reduzir a atividade da MMP-2 de 72 kDa, 64 kDa e total quando comparadas com seu respectivo controle ($\#p < 0,05$ vs. Apenas Tris).

O etanol foi utilizado para diluir o resveratrol, sendo que para o experimento a maior concentração utilizada foi de 6%. Esta concentração de etanol não mostrou inibição da atividade de MMP-2 de 72 kDa e total quando comparadas com seu respectivo controle, mas mostrou na MMP-2 de 64 kDa ($\#p < 0,05$ vs. Apenas Tris; Fig. 17)

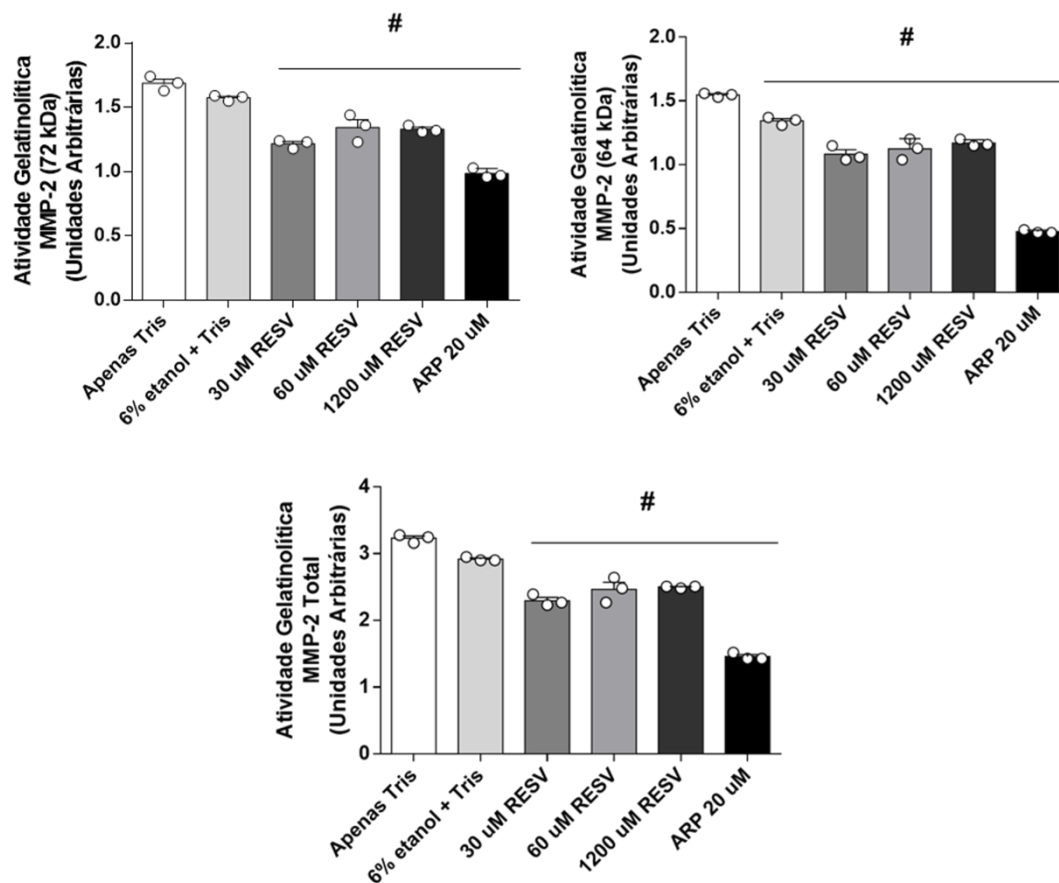
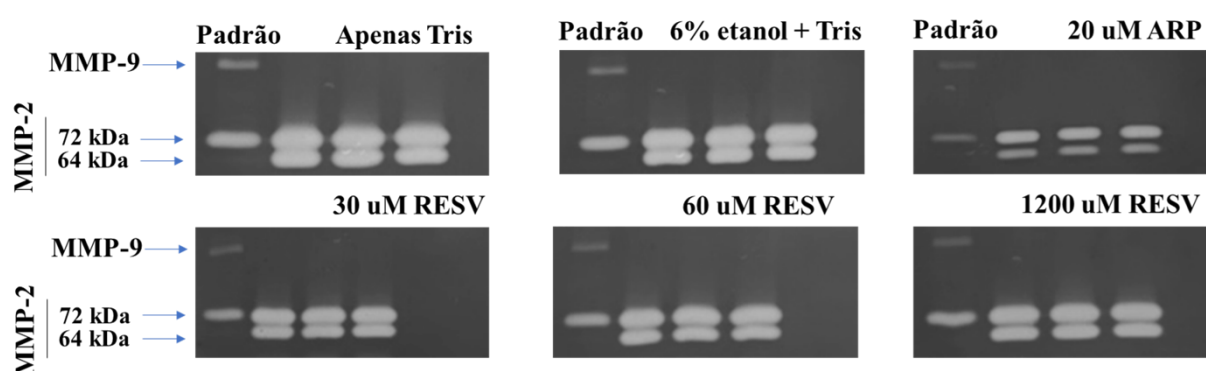


Figura 17 - Avaliação do efeito do resveratrol nas concentrações de 30, 60 e 1200 μM sobre a atividade gelatinolítica da MMP-2 *in vitro*. As fotografias dos géis são representativas de cada grupo, seguidas dos resultados em unidades arbitrárias. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão ($\#p < 0,05$ vs. Apenas Tris, One-Way ANOVA Dunnett; $n=3$).

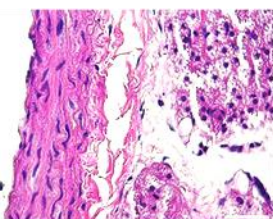
5.7. Tratamento com resveratrol durante gestação e amamentação parece melhorar o remodelamento hipertrófico da aorta da prole SHR masculina

O aumento de atividade da MMP-2 contribui ao remodelamento vascular mal adaptativo da hipertensão¹⁵. Dessa forma, avaliamos o remodelamento em aortas da prole proveniente de ratas SHR por histologia e coloração com HE, e quantificação dos parâmetros morfológicos CSA (área de secção transversal) e razão M/L (médula/lúmen). Observou-se que as aortas da prole SHR fêmea apresentou aumento de CSA, mas não de M/L quando comparadas com o grupo controle ($*p < 0,05$). Por não ter apresentado alterações hipertróficas significativas na aorta, o tratamento com resveratrol no período gestacional e amamentação não alterou o remodelamento vascular (Fig. 18A). Entretanto, as aortas da prole SHR macho apresentaram aumento significativo de CSA e M/L em comparação com seus controles ($*p < 0,05$) e o resveratrol reduziu este remodelamento arterial hipertrófico (Fig. 18B; $p=0,06$)

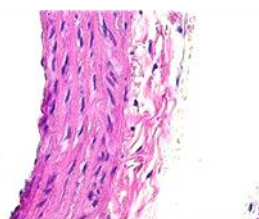
A

B

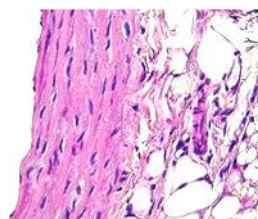
WKY veículo



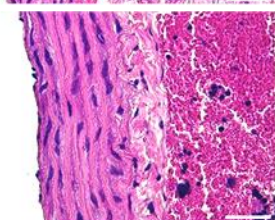
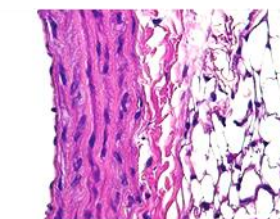
WKY resveratrol



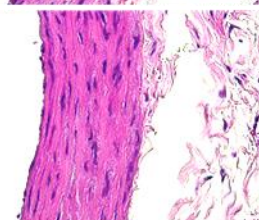
WKY veículo



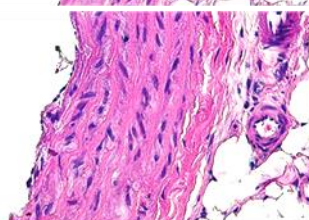
WKY resveratrol



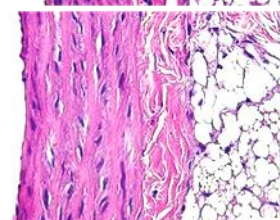
SHR veículo



SHR resveratrol



SHR veículo



SHR resveratrol

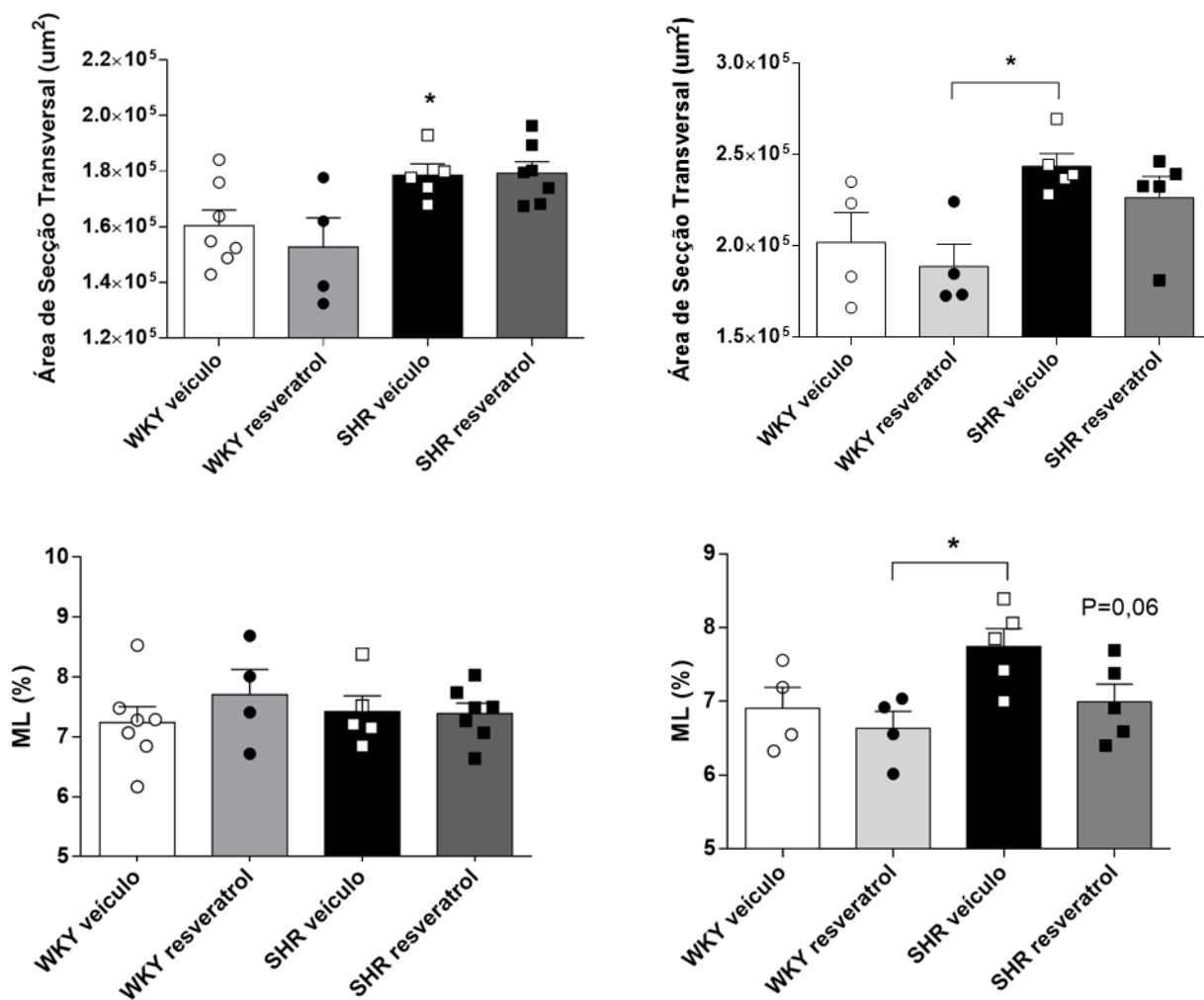


Figura 18 - Avaliação do efeito do resveratrol em parâmetros morfológicos na aorta da prole de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) versus controle (WKY) separados de acordo com o gênero, sendo demonstrado em (A) fêmeas e em (B) machos. As fotografias são representativas de cada grupo (400x) e a barra de escala representa 50 μ m. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão (* $p < 0,05$ versus grupos controles; $n = 4-7$).

6. DISCUSSÃO

Embora a hipertensão essencial seja tratável, ela não é curável. O objetivo do tratamento está na prevenção das principais consequências da pressão arterial elevada. Atualmente, existem vários medicamentos anti-hipertensivos eficazes, tais como diuréticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina/bloqueadores dos receptores da angiotensina II, β -bloqueadores e bloqueadores dos canais de cálcio. No entanto, estes requerem administração constante, ou seja, se forem retirados do tratamento, a pressão arterial volta a se elevar. Por esta

razão, é importante a descoberta de uma estratégia de prevenção precoce ⁶⁶. Neste contexto, os agentes anti-hipertensivos disponíveis são eficazes no controle da hipertensão em SHRs. No entanto, como a hipertensão é herdada geneticamente, a interrupção do tratamento resulta no reaparecimento da hipertensão arterial. Já está bem estabelecido que a pressão arterial na vida adulta pode ser programada não apenas pela herança genética, mas também pelos ambientes pré e pós-natais. O tratamento com resveratrol em ratas SHR prenhas proporcionou efeitos benéficos na prole adulta, logo isto mostra que a progressão da hipertensão no modelo SHR está relacionada à fatores genéticos, mas também ao ambiente pré-desmame ⁶⁶. Sendo assim, a intervenção terapêutica no período gestacional e pós-natal pode ser mais efetiva já que a interrupção do tratamento não reverteu o fenótipo adquirido nestes animais. Por este motivo, nosso trabalho teve como objetivo realizar o tratamento com resveratrol durante gestação e amamentação e avaliar alguns parâmetros bioquímicos ainda não estudados. Com isto, mostramos que mesmo após a interrupção do tratamento a prole adulta feminina e masculina apresentaram melhores respostas bioquímicas, tais como diminuição da atividade de MMP-2 e aumento de biodisponibilidade de NO nas aortas, o que pode ter acarretado na PAS mais baixa.

Outro estudo também mostrou diminuição da PAS na prole adulta de ratas SHR prenhas tratadas com resveratrol⁶. Entretanto, os autores não representaram se os efeitos benéficos do resveratrol na prole adulta foram dependentes do gênero. Nosso estudo é o primeiro a mostrar os efeitos exercidos pelo resveratrol entre os machos e fêmeas SHR, já que a diferença entre gêneros e os seus respectivos hormônios sexuais podem contribuir para diferentes respostas exercidas pelo resveratrol. Estudos mostram que o desenvolvimento da hipertensão é menos frequente em mulheres na pré-menopausa que homens da mesma idade⁶⁷. O mesmo foi encontrado em ratos SHR, já que o aparecimento da hipertensão é retardado e menos grave em fêmeas do que em machos ⁶⁸. O estrogênio promove vasodilatação, estimulando a produção de NO endotelial em vários modelos murinos. A sinalização vascular do estrogênio pode desencadear mecanismos anti-hipertensivos via ativação de receptores de estrogênio, sendo o ER α o principal mediador da produção de NO no endotélio vascular ⁶⁷. Desta maneira, levando-se em consideração este ambiente mais protetivo nas fêmeas, o tratamento com resveratrol pode ter sido mais promissor na redução da pressão arterial. Além disso, ao observar o desenvolvimento do remodelamento arterial mal adaptativo, vê-se que não houve aumento significativo da razão M/L nas fêmeas, como ocorreu para machos, o que também sugere as possíveis ações benéficas do estrogênio na supressão da proliferação e migração de células musculares lisas vasculares, mediado por seu receptor ER α ⁶⁹. O estradiol também diminui a deposição de colágeno e aumenta a produção de elastina em células musculares lisas da aorta

de humanos⁶⁹, por isto, sua redução na pós menopausa e no sexo masculino pode contribuir para o desenvolvimento da rigidez arterial e hipertensão. O aumento significativo da razão M/L e CSA em aortas de ratos machos SHR confirmam a presença do remodelamento vascular hipertrófico mal adaptativo, como já mostrado por outros grupos^{12,25} e em outros modelos de hipertensão^{28,40}. O tratamento com resveratrol parece melhorar o remodelamento hipertrófico nas aortas dos machos. Apesar destes estudos demonstrarem efeitos benéficos do hormônio estrogênio sobre a pressão arterial e remodelamento em fêmeas, é importante salientar que a falta de testosterona nas fêmeas também contribui para minimizar o aumento da PAS quando comparadas aos machos SHR⁷⁰. Por outro lado, em machos SHR jovens, o desenvolvimento da hipertensão também pode ser mediado por ação de andrógenos que ativam o receptor de melanocortina-4 MC4R presente no hipotálamo e o sistema nervoso simpático. Os andrógenos também contribuem para ativar o sistema renina, angiotensina, aumentando a expressão do angiotensinogênio e atividade da renina⁷¹. Nas fêmeas SHR jovens, não foi verificado ativação de MC4R e sua contribuição na hipertensão⁷¹.

Como já se sabe, o estresse oxidativo está aumentado nas aortas de ratos SHR³⁸ e o tratamento com resveratrol produz efeitos antioxidantes significativos em vários modelos de doenças cardiovasculares^{59,61,72,73}. Nossos resultados mostraram aumento na produção de EROs nas aortas de ratos hipertensos machos e fêmeas. Curiosamente, o tratamento com resveratrol reduziu o estresse oxidativo apenas nas aortas das fêmeas. Realizamos também o ensaio da quimioluminescência para lucigenina nas aortas da prole feminina e observamos redução da produção de superóxido na presença do resveratrol. Além disso, é bem descrito que o aumento de ânion superóxido leva à depleção de NO, pois pode se juntar à este formando ONOO⁻³⁹. Estes achados estão de acordo com o que demonstramos em nosso trabalho, já que há aumento na formação de ONOO⁻ na aorta de fêmeas SHR, com consequente diminuição de NO. O resveratrol foi capaz de reduzir a formação de ONOO⁻ e aumentar o NO disponível nas aortas das fêmeas. O resveratrol atua no sistema de defesa antioxidante endógeno, regulando a expressão e atividade de muitas enzimas antioxidantes⁶⁵, pelo fator de transcrição Nrf2, contribuindo para a eliminação das EROs. Além disso, a expressão e atividade da NADPH oxidase, principal enzima produtora de EROs na vasculatura também é reduzida pelo resveratrol⁶⁵. Entretanto, pode haver superexpressão de subunidades da NADPH oxidase em arteríolas mesentéricas e aortas de machos SHR, o que culmina em maior produção de ânion superóxido em condições basais^{74,75}. Este fenômeno foi associado à expressão aumentada de receptores AT1 nas artérias. Além disso, machos exibem níveis mais altos de produção de superóxido basal e estimulado por NADPH oxidase nas aortas quando comparado às fêmeas⁷⁶.

Ademais, Sullivan e seu grupo⁷⁷ descobriram que machos SHR excretavam níveis mais altos de peróxido de hidrogênio urinário do que as fêmeas SHR. Por outro lado, a literatura cita que a formação de estresse oxidativo pode variar de acordo com o tecido e o gênero. Foi visto aumento significativo da produção de superóxido estimulado por NADPH no córtex e medula renal de fêmeas SHR em maior proporção quando comparado aos machos⁷⁶. A testosterona pode causar seus efeitos através da ligação aos receptores de androgênios, podendo atuar por uma via genômica e uma via não genômica⁶⁷. A testosterona aumenta as EROs nas células musculares lisas por meio de diferentes fontes celulares, como a ativação da NAD(P)H oxidase, mitocôndrias, ciclooxigenase 2 (COX-2) e xantina oxidase. A ação genômica da testosterona induz as vias c-Src e PI3K/Akt que, por sua vez, ativam a NAD(P)H oxidase e a xantina oxidase, respectivamente. A testosterona também pode aumentar as EROs por meio de sua ação não genômica, por meio do receptor GPRC6A. O aumento da produção de EROs pode levar à migração, hipertrofia e inflamação, causando disfunção vascular. Dessa forma, a testosterona pode criar um ambiente oxidativo e induzir inflamação^{77,78}. Em machos SHR, trabalhos demonstram que os níveis plasmáticos de testosterona foram significativamente maiores do que em ratos WKY após a maturação sexual; estes efeitos foram atenuados após a castração dos animais, sugerindo uma relação neuroendócrina entre a pressão elevada no SHR^{79,80}. Ademais, foi visto que uma única dose supra fisiológica de testosterona diminui a expressão de superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase em células endoteliais humanas⁷⁸. Como os níveis de testosterona estão aumentados em machos SHR, talvez esta seja uma das explicações do porque o resveratrol não reduziu significativamente o estresse oxidativo vascular.

Uma das principais fontes de eROS no vaso é a NADPH oxidase, sendo sua atividade influenciada por fatores de crescimento, citocinas, agentes vasoativos e pela tensão na parede dos vasos, todas essas sendo características da hipertensão. Quando formadas, há atuação de enzimas que fazem parte do sistema antioxidante (AOX) do nosso organismo, tais como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase que transformam as EROs em espécies menos reativas, mantendo-as em concentrações fisiológicas para que não tragam malefícios. Entretanto, quando há desequilíbrio entre os níveis de EROs e o sistema antioxidante seja por excesso de eROS ou depleção do AOX, ocorre o estresse oxidativo. O ânion superóxido em excesso se combina com NO, o que diminui sua biodisponibilidade^{38,81}. No nosso estudo, observamos redução da produção de NO, por meio da sonda DAF, nas aortas das proles machos e fêmeas SHR. O tratamento com resveratrol reverteu esta produção baixa de NO em ambos os gêneros, independentemente de não ter reduzido a formação de estresse oxidativo nos machos.

Já foi mostrado que machos SHR tratados com resveratrol tiveram aumento da expressão de eNOS e de guanilato ciclase solúvel em aortas, sendo a guanilato ciclase responsável por converter GMP em GMP cíclico na via do NO⁸². Entretanto, ainda não avaliamos a expressão de eNOS ou guanilato ciclase nas aortas dos grupos tratados com resveratrol. Além disso, não avaliamos a reatividade vascular na presença de agonistas vasodilatadores para verificar se o resveratrol já estaria contribuindo para melhorar a disfunção endotelial da hipertensão em machos. Nas fêmeas, o estrogênio pode contribuir para aumentar a formação de NO arterial e moderar o aumento da resistência vascular periférica e pressão arterial⁸², o que pode facilitar a melhora observada na PAS⁶⁸. O resveratrol pode estimular a produção de NO vascular por aumento da expressão e atividade da eNOS via SIRT1 e/ou interação deste com o receptor de estrogênio, que leva à ativação de tirosina quinase c-Src e MAP quinase Erk1/2, que, fosforilam a eNOS via AMPK⁶⁵. O resveratrol também aumenta a biossíntese de BH4, aumentando a GTP ciclo-hidrolase 1 (por meio do FOXO) e isto previne o desacoplamento da eNOS⁶⁵.

Como mencionado anteriormente, o estresse oxidativo aumenta a atividade da MMP-2 nas artérias em algumas doenças cardiovasculares. O ONOO⁻ pode reagir com a cisteína presente na ligação entre o pró-peptídeo e sítio catalítico da MMP-2, deslocando o pró-peptídeo e conferindo atividade à protease¹⁹. Na presença do resveratrol, observamos que menores quantidades de ONOO⁻ foram produzidas nas aortas das fêmeas SHR e este efeito pode então ter resultado na menor atividade da MMP-2 vascular. Por outro lado, houve também redução da atividade gelatinolítica da MMP-2 nas aortas dos machos SHR quando tratados com resveratrol durante a gestação, mesmo que o resveratrol não tenha melhorado o estresse oxidativo nestes animais. Isto nos levou a questionar se o resveratrol não poderia atuar diretamente no sítio catalítico da MMP-2 inibindo-a, independentemente da redução de vias alternativas, como o estresse oxidativo. Para avaliar tal hipótese, realizamos um teste *in vitro* com diferentes concentrações de resveratrol e observamos inibição direta da atividade da MMP-2, independentemente da concentração de resveratrol utilizada. Isto sugere que talvez a redução da atividade gelatinolítica nas aortas possa ter sido decorrente da ação inibitória direta do resveratrol sob a MMP-2. Nossos achados estão de acordo com estudos que mostraram a capacidade do resveratrol de interagir com resíduos do sítio ativo da MMP-2 por ligações polares e ligações de hidrogênio⁵³. Animais com isquemia cerebral apresentaram aumento da atividade de MMP-2 e MMP-9 nas artérias cerebrais e o tratamento com resveratrol reduziu diretamente esta atividade⁵³. Outros estudos já mostraram que o tratamento de células de câncer de mama (MDA231) humana com resveratrol também reduziu a expressão proteica de MMP-2 e MMP-9⁸³. Dado estes efeitos em algumas condições patológicas, especula-se que a proteção

cardiovascular do resveratrol pode estar associada não só à sua capacidade antioxidante, mas também por inibir diretamente a ação de algumas MMPs. O efeito inibitório sobre as MMPs é importante, pois como citado anteriormente, durante a hipertensão há aumento da atividade da MMP-2 nas artérias, o que leva à degradação de componentes da matriz extracelular, tais como colágeno e a elastina. As MMPs podem degradar também as caderinas, que são proteínas que unem uma célula muscular lisa vascular a outra. Além disso, a ativação da MMP-2 dentro da célula permite degradação de componentes intracelulares, tais como a calponina-1. Esta é uma proteína que faz parte citoesqueleto das células musculares lisas e a degradação dela permite que haja mudança de um fenótipo contrátil para um fenótipo proliferativo¹⁵. Todos esses efeitos contribuem para o remodelamento vascular mal adaptativo da hipertensão, já que possibilita a migração e proliferação das células musculares lisas nas artérias. O remodelamento nada mais é que a reestruturação das artérias para se adequar ao aumento de pressão arterial, sendo uma das principais consequências da hipertensão. É o principal responsável pela mortalidade em indivíduos com hipertensão, pois esta reestruturação pode prejudicar o fluxo sanguíneo para diversos órgãos e levar à outras alterações, tais como: acidente vascular encefálico, infarto agudo do miocárdio ou insuficiência cardíaca e insuficiência renal^{14,15,84,85}.

Por fim, nosso trabalho demonstrou que não há interferência do resveratrol no peso corporal da prole. Este resultado é importante pois mostra que a suplementação materna com resveratrol não prejudica o desenvolvimento da prole na fase adulta. Outro estudo também mostrou que não houve diferença no peso corporal da prole adulta de ratas tratadas na gestação com resveratrol⁶. Além disso, o resveratrol foi seguro durante a gravidez, não sendo observado efeitos maléficis para a prole. Ademais, não há efeitos adversos sobre número de implantações, filhotes vivos ou perdas pré- e pós-implantação, além de não ter sido encontradas incidências de anormalidades fetais⁶¹.

A dose de 4 g de resveratrol/kg de dieta foi utilizada neste estudo com base em dados da literatura que discutem que a concentração plasmática final alcançada com a dose administrada está dentro de valores terapêuticos esperados (intervalo de 10-20 $\mu\text{mol/L}$), correspondendo a uma dosagem de aproximadamente 146 mg/kg/dia^{6,64,86,87}. De acordo com o nosso cálculo de consumo diário de ração, o consumo aproximado de resveratrol por dia é de aproximadamente 200 mg/kg levando em consideração o período gestacional e de aleitamento. Esta dose já foi utilizada em um estudo envolvendo modelo de ratos que apresentam cardiomiopatia diabética, com aumento de fibrose cardíaca, aumento na produção de eROS mitocondrial e acúmulo de lipídios. O tratamento com resveratrol nesta dose normalizou completamente quase todos estes distúrbios metabólicos⁸⁸.

Em relação à quantidade de resveratrol que precisa ser ingerida pelos humanos para atingir efeitos benéficos e reduzir malefícios cardiovasculares, tem-se que é difícil estimar com precisão a ingestão diária exata de resveratrol em produtos alimentícios. Dessa forma, uma alternativa é a suplementação. Levando em consideração extrapolações feitas com estudos em animais que precisam de dosagens diárias de 5-500 mg/kg para atingir um efeito biológico^{82,87,89,90}, a suplementação recomendada para humanos é de 12,5 mg/kg de peso corporal para um adulto de 80 kg⁹¹. Além disso, estudos de segurança em humanos mostraram que o resveratrol é seguro e bem tolerado em doses de até 5 g/ dia. Apesar de bem tolerada, esta dose pode levar à sintomas gastrointestinais como diarreia e vômito a partir de 2,5 g por dia⁹¹.

7. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados mostraram que o tratamento com resveratrol na gestação e amamentação de ratas SHR atenuou o estresse oxidativo, a atividade da MMP-2 e aumentou a disponibilidade de NO nas aortas da prole feminina hipertensas, o que pode ter contribuído para diminuição da pressão arterial. O tratamento com resveratrol também diminuiu a atividade acentuada da MMP-2 e aumentou a disponibilidade de NO nas aortas da prole hipertensa masculina. Estes efeitos contribuíram para melhorar o remodelamento hipertrófico e a pressão arterial elevada nestes animais. Em conclusão, a intervenção terapêutica durante gestação e amamentação parece ser mais efetiva para atenuar a progressão da hipertensão no modelo SHR, já que mesmo interrompendo o tratamento após o término destes períodos, a prole adulta demonstrou melhora de parâmetros bioquímicos e funcionais.

8. REFERÊNCIAS

1. Oparil, S. *et al.* Hypertension. *Nat Rev Dis Primers* **4**, (2018).
2. Poulter, N. R., Prabhakaran, D. & Caulfield, M. Hypertension. *The Lancet* **386**, 801–812 (2015).
3. Oscar A. Carretero, MD; Suzanne Oparil, M. Essential Hypertension Part I: Definition and Etiology. *Circulation* **101**, 329–335 (2000).
4. Raftopoulos, L. *et al.* Epigenetics, the missing link in hypertension. *Life Sci* **129**, 22–26 (2015).
5. Komolova, M., Friberg, P. & Adams, M. A. Altered vascular resistance properties and acute pressure-natriuresis mechanism in neonatal and weaning spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **59**, 979–984 (2012).

6. Care, A. S. *et al.* Perinatal resveratrol supplementation to spontaneously hypertensive rat dams mitigates the development of hypertension in adult offspring. *Hypertension* **67**, 1038–1044 (2016).
7. Kearney, P. M. *et al.* Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *The Lancet* **365**, 217–223 (2005).
8. Harvey, A., Montezano, A. C. & Touyz, R. M. Vascular biology of ageing-Implications in hypertension. *J Mol Cell Cardiol* **83**, 112–121 (2015).
9. Zorina S. Galis, J. J. K. Matrix Metalloproteinases in Vascular Remodeling and Atherogenesis The Good, the Bad, and the Ugly. *Circ Res* **90**, 251–262 (2002).
10. Intengan, H. D., Li, J. & Schiffrin, E. L. Resistance Artery Mechanics, Structure, and Extracellular Components in Spontaneously Hypertensive Rats. *Circulation* **100**, 2267–2275 (1999).
11. Renna, N. F., De Las Heras, N. & Miatello, R. M. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *Int J Hypertens* **2013**, 1-7 (2013).
12. DeBlois, D., Tea, B. S., Dam, T. V., Tremblay, J. & Hamet, P. Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **29**, 340–349 (1997).
13. Rensen, S. S. M., Doevendans, P. A. F. M. & van Eys, G. J. J. M. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands Heart Journal* **15**, 100–108 (2007).
14. Belo, V. de A., Parente, J. M., Tanus-Santos, J. E. & Castro, M. M. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 decreases calponin-1 levels and contributes to arterial remodeling in early hypertension. *Biochem Pharmacol* **118**, 50–58 (2016).
15. Danielle, V. A. B., Michele, A. G. & Castro, M. Matrix Metalloproteinase 2 as a Potential Mediator of Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Chronic Vascular Remodeling in Hypertension. *Journal of Vascular Research* **52**, 221–231 (2016)
16. Wang, X. & Khalil, R. A. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Advances in Pharmacology* **81**, 241-330 (2018).
17. Halper, J. Basic Components of Vascular Connective Tissue and Extracellular Matrix. *Adv Pharmacol* **81**, 95–127 (2018).
18. Kandasamy, A. D., Chow, A. K., Ali, M. A. M. & Schulz, R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: Beyond the matrix. *Cardiovascular Research* **85**, 413–423 (2010).

19. Chow, A. K., Cena, J. & Schulz, R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol* **152**, 189–205 (2007).
20. Roberts, C. K., Vaziri, N. D. & Barnard, R. J. Effect of diet and exercise intervention on blood pressure, insulin, oxidative stress, and nitric oxide availability. *Circulation* **106**, 2530–2532 (2002).
21. Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* **69**, 562–573 (2006).
22. Spinale, F. G., Coker, M. L., Bond, B. R. & Zellner, J. L. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovasc Res* **46**, 225–238 (2000).
23. Spinale, F. G. Matrix metalloproteinases: Regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* **90**, 520–530 (2002).
24. Creemers, E. E. J. M. *et al.* Deficiency of TIMP-1 exacerbates LV remodeling after myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**, 364–371 (2003).
25. Antonio, R. C. *et al.* Antioxidant effect of doxycycline decreases MMP activity and blood pressure in SHR. *Mol Cell Biochem* **386**, 99–105 (2014).
26. Yasmin *et al.* Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 372–378 (2005).
27. Johnson, C. & Galis, Z. S. Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Differentially Regulate Smooth Muscle Cell Migration and Cell-Mediated Collagen Organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 54–60 (2004).
28. Castro, M. M. *et al.* Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis* **198**, 320–331 (2008).
29. Castro, M. M. *et al.* Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling. *Matrix Biology* **29**, 194–201 (2010).
30. Cui, N., Hu, M. & Khalil, R. A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* **147**, 1-73 (2017).
31. Metalloproteinases, M. & Inhibitors, T. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Circ Res* **92**, 827-839 (2003)

32. Grote, K. *et al.* Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase - Derived reactive oxygen species. *Circulation* **92**, e80–e86 (2003).
33. Blascke de Mello, M. M., Parente, J. M., Schulz, R. & Castro, M. M. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation by oxidative stress decreases aortic calponin-1 levels during hypertrophic remodeling in early hypertension. *Vascul Pharmacol* **116**, 36–44 (2019).
34. Briones, A. M. & Touyz, R. M. Oxidative stress and hypertension: Current concepts. *Curr Hypertens Rep* **12**, 135–142 (2010).
35. Elahi, M. M., Kong, Y. X. & Matata, B. M. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Longev* **2**, 259–269 (2009).
36. Ahmad, K. A. *et al.* Antioxidant therapy for management of oxidative stress induced hypertension. *Free Radic Res* **51**, 428–438 (2017).
37. Vaziri, N. D. Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **13**, 93–99 (2004).
38. Touyz, R. M. & Schiffrin, E. L. Reactive oxygen species in vascular biology: Implications in hypertension. *Histochemistry and Cell Biology* **122**, 339–352 (2004).
39. Schulz, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: Rationale and therapeutic approaches. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**, 211–242 (2007).
40. Castro, M. M. *et al.* Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. *Free Radic Biol Med* **46**, 1298–1307 (2009).
41. Pereira, S. C. *et al.* Quercetin decreases the activity of matrix metalloproteinase-2 and ameliorates vascular remodeling in renovascular hypertension. *Atherosclerosis* **270**, 146–153 (2018).
42. Szeto, Y. T., Kwok, T. C. Y. & Benzie, I. F. F. Effects of a long-term vegetarian diet on biomarkers of antioxidant status and cardiovascular disease risk. *Nutrition* **20**, 863–866 (2004).
43. Navarro, J. A. *et al.* Reduced levels of potential circulating biomarkers of cardiovascular diseases in apparently healthy vegetarian men. *Clinica Chimica Acta* **461**, 110–113 (2016).
44. Breuss, J. M., Atanasov, A. G. & Uhrin, P. Resveratrol and its effects on the vascular system. *Int J Mol Sci* **20**, 1–18 (2019).

45. Renaud, S. & Lorgeuil, M. De. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet* **339**, 1523–1526 (1992).
46. Liberale, L., Bonaventura, A., Montecucco, F., Dallegri, F. & Carbone, F. Impact of Red Wine Consumption on Cardiovascular Health. *Curr Med Chem* **26**, 3542–3566 (2017).
47. Weiskirchen, S. & Weiskirchen, R. Resveratrol: How much wine do you have to drink to stay healthy? *Advances in Nutrition* **7**, 706–718 (2016).
48. Stervbo, U., Vang, O. & Bonnesen, C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chem* **101**, 449–457 (2007).
49. Almajdoob, S., Hossain, E. & Anand-Srivastava, M. B. Resveratrol attenuates hyperproliferation of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats: Role of ROS and ROS-mediated cell signaling. *Vascul Pharmacol* **101**, 48–56 (2018).
50. Park, J. H. *et al.* Far-infrared radiation acutely increases nitric oxide production by increasing Ca²⁺ mobilization and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-mediated phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at serine 1179. *Biochem Biophys Res Commun* **436**, 601–606 (2013).
51. Li, X. *et al.* Resveratrol lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via calcium-dependent endothelial NO production. *Clin Exp Hypertens* **38**, 287–293 (2016).
52. Wang, S. *et al.* Acute inhibition of guanosine triphosphate cyclohydrolase 1 uncouples endothelial nitric oxide synthase and elevates blood pressure. *Hypertension* **52**, 484–490 (2008).
53. Pandey, A. K., Bhattacharya, P., Shukla, S. C., Paul, S. & Patnaik, R. Resveratrol inhibits matrix metalloproteinases to attenuate neuronal damage in cerebral ischemia: A molecular docking study exploring possible neuroprotection. *Neural Regen Res* **10**, 568–575 (2015).
54. Oak, M. H., el Bedoui, J., Anglard, P. & Schini-Kerth, V. B. Red wine polyphenolic compounds strongly inhibit pro-matrix metalloproteinase-2 expression and its activation in response to thrombin via direct inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase in vascular smooth muscle cells. *Circulation* **110**, 1861–1867 (2004).
55. Farrokhi, E., Ghatreh-Samani, K., Salehi-Vanani, N. & Mahmoodi, A. The effect of resveratrol on expression of matrix metalloproteinase 9 and its tissue inhibitors in vascular smooth muscle cells. *ARYA Atheroscler* **14**, 157–162 (2018).

56. Dolinsky, V. W. *et al.* Resveratrol prevents hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats and mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1832**, 1723–1733 (2013).
57. Hsu, C. N., Hung, C. H., Hou, C. Y., Chang, C. I. & Tain, Y. L. Perinatal resveratrol therapy to dioxin-exposed dams prevents the programming of hypertension in adult rat offspring. *Antioxidants* **10**, 1-11 (2021).
58. Hsu, C. N., Lin, Y. J., Lu, P. C. & Tain, Y. L. Maternal resveratrol therapy protects male rat offspring against programmed hypertension induced by TCDD and dexamethasone exposures: Is it relevant to aryl hydrocarbon receptor? *Int J Mol Sci* **19**, 1-12 (2018).
59. Vega, C. C. *et al.* Resveratrol partially prevents oxidative stress and metabolic dysfunction in pregnant rats fed a low protein diet and their offspring Key points. **5**, 1483–1499 (2016).
60. Caldeira-Dias, M. *et al.* Resveratrol and grape juice: Effects on redox status and nitric oxide production of endothelial cells in in vitro preeclampsia model. *Pregnancy Hypertens* **23**, 205–210 (2021).
61. Bourque, S. L., Dolinsky, V. W., Dyck, J. R. B. & Davidge, S. T. Maternal resveratrol treatment during pregnancy improves adverse fetal outcomes in a rat model of severe hypoxia. *Placenta* **33**, 449–452 (2012).
62. Williams, L. D., Burdock, G. A., Edwards, J. A., Beck, M. & Bausch, J. Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. *Food and Chemical Toxicology* **47**, 2170–2182 (2009).
63. Bourque, S. L., Dolinsky, V. W., Dyck, J. R. B. & Davidge, S. T. Maternal resveratrol treatment during pregnancy improves adverse fetal outcomes in a rat model of severe hypoxia. *Placenta* **33**, 449–452 (2012).
64. Dolinsky, V. W. *et al.* Improvements in skeletal muscle strength and cardiac function induced by resveratrol during exercise training contribute to enhanced exercise performance in rats. *Journal of Physiology* **590**, 2783–2799 (2012).
65. Li, H., Xia, N., Hasselwander, S. & Daiber, A. Resveratrol and vascular function. *Int J Mol Sci* **20**, 1–16 (2019).
66. Intapad, S. Reprogramming Essential Hypertension. *Hypertension* **67**, 829–830 (2016).
67. Boese, A. C., Kim, S. C., Yin, K. J., Lee, J. P. & Hamblin, M. H. Sex differences in vascular physiology and pathophysiology: Estrogen and androgen signaling in health and disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **313**, H524–H545 (2017).

68. Huang, A., Sun, D., Kaley, G. & Koller, A. Estrogen maintains nitric oxide synthesis in arterioles of female hypertensive rats. *Hypertension* **29**, 1351–1356 (1997).
69. Sabbatini, A. R. & Kararigas, G. Estrogen-related mechanisms in sex differences of hypertension and target organ damage. *Biology of Sex Differences* **11**, 1-17 (2020).
70. Reckelhoff, J. F. Gender Differences in the Regulation of Blood Pressure. *Hypertension* **37**, 1199–1208 (2001).
71. Reckelhoff, J. F. Sex differences in regulation of blood pressure. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1065**, 139–151 (2018).
72. Thandapilly, S. J. *et al.* Resveratrol Prevents the Development of Pathological Cardiac Hypertrophy and Contractile Dysfunction in the SHR Without Lowering Blood Pressure. *Am J Hypertens* **23**, 192–196 (2009).
73. Xia, N., Daiber, A., Förstermann, U. & Li, H. Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* **174**, 1633–1646 (2017).
74. Dantas, A. P. V. *et al.* Gender differences in superoxide generation in microvessels of hypertensive rats: Role of NAD(P)H-oxidase. *Cardiovascular Research* **61**, 22-29 (2004).
75. Brandes, R. P. & Mügge, A. Gender differences in the generation of superoxide anions in the rat aorta. *Life Sci* **60**, 391-396 (1997).
76. Lopez-Ruiz, A. *et al.* Sex differences in control of blood pressure: role of oxidative stress in hypertension in females. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**, 466–474 (2008).
77. Cruz-Topete, D., Dominic, P. & Stokes, K. Y. Uncovering sex-specific mechanisms of action of testosterone and redox balance. *Redox Biology* **31**, 1-8 (2020).
78. Tostes, R. C., Carneiro, F. S., Carvalho, M. H. C. & Reckelhoff, J. F. Reactive oxygen species: players in the cardiovascular effects of testosterone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **310**, 1–14 (2016).
79. Magnusson, K., Wall, A., Meyerson I, B. J., Wall, A. & Meyerson, B. J. Difference in Testosterone Sensitivity in Male Spontaneously Hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto Rats (WKY). *Physiology & Behavior* **60**, 907-912 (1996).
80. Wall, A., Magnusson, S. M., Meyerson, B. J., Magnusson, A. M. & Meyerson, B. J. The Influences of Androgen on Sociosexual Behavior: A Comparison Between the Spontaneously Hypertensive (SHR) and the Wistar-Kyoto Rat (WKY). *Physiology & Behavior* **54**, 1041-1046 (1993).

81. Incalza, M. A. *et al.* Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol* **100**, 1–19 (2018).
82. Bhatt, S. R., Lokhandwala, M. F. & Banday, A. A. Resveratrol prevents endothelial nitric oxide synthase uncoupling and attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* **667**, 258-264 (2011).
83. Sun, Y. *et al.* Resveratrol inhibits the migration and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer by reversing TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Molecules* **24**, 1-16 (2019).
84. Castro, M. M., Cena, J., Cho, W. J., Walsh, M. P. & Schulz, R. Matrix metalloproteinase-2 proteolysis of calponin-1 contributes to vascular hypocontractility in endotoxemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 662–668 (2012).
85. Danielle, V. A. B., Michele, A. G. & Castro, M. Matrix Metalloproteinase 2 as a Potential Mediator of Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Chronic Vascular Remodeling in Hypertension. *J Vasc Res* **52**, 221–231 (2015).
86. Dolinsky, V. W., Rueda-Clausen, C. F., Morton, J. S., Davidge, S. T. & Dyck, J. R. B. Continued postnatal administration of resveratrol prevents diet-induced metabolic syndrome in rat offspring born growth restricted. *Diabetes* **60**, 2274–2284 (2011).
87. Dolinsky, V. W. *et al.* Resveratrol prevents hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats and mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1832**, 1723–1733 (2013).
88. Beaudoin, M. S. *et al.* Impairments in mitochondrial palmitoyl-CoA respiratory kinetics that precede development of diabetic cardiomyopathy are prevented by resveratrol in ZDF rats. *Journal of Physiology* **592**, 2519–2533 (2014).
89. Mizutani, K., Ikeda, K., Kawai, Y. & Yamori, Y. Resveratrol Attenuates Ovariectomy-Induced Hypertension and Bone Loss in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *J Nutr Sci Vitaminol* **46**, 78-83 (2000).
90. Babacanoglu, C., Yildirim, N., Sadi, G., Pektas, M. B. & Akar, F. Resveratrol prevents high-fructose corn syrup-induced vascular insulin resistance and dysfunction in rats. *Food and Chemical Toxicology* **60**, 160–167 (2013).
91. Weiskirchen, S. & Weiskirchen, R. Resveratrol: How much wine do you have to drink to stay healthy? *Advances in Nutrition* **7**, 706–718 (2016).