

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

Proteólise do Colágeno Tipo I pela Metaloproteinase de Matriz
(MMP) 2 Contribui para a Ativação da Quinase de Adesão Focal e
Proliferação das Células Musculares Lisas Vasculares na Aorta em
Estágios Iniciais da Hipertensão

Ribeirão Preto
2023

Viviano Gomes de Oliveira Neves

Proteólise do Colágeno Tipo I pela Metaloproteinase de Matriz
(MMP)2 Contribui para a Ativação da Quinase de Adesão Focal e
Proliferação das Células Musculares Lisas Vasculares na Aorta em
Estágios Iniciais da Hipertensão

Versão Original

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Professora Dr^a Michele Mazzaron de Castro

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

Neves, Viviano Gomes de Oliveira

Proteólise do Colágeno Tipo I pela Metaloproteinase de Matriz (MMP)2 Contribui para a Ativação da Quinase de Adesão Focal e Proliferação das Células Musculares Lisas Vasculares na Aorta em Estágios Iniciais da Hipertensão. Ribeirão Preto, 2023.

81 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Mazzaron Castro, Michele.

1. metaloproteinase de matriz-2. 2. colágeno. 3. células musculares lisas vasculares. 4. quinase de adesão focal. 5. hipertensão.

Folha de Aprovação

Neves, VGO. Proteólise do Colágeno Tipo I pela Metaloproteinase de Matriz (MMP)2 Contribui para a Ativação da Quinase de Adesão Focal e Proliferação das Células Musculares Lisas Vasculares na Aorta em Estágios Iniciais da Hipertensão [Tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2023

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a) Dr(a): _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof(a) Dr(a): _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof(a) Dr(a): _____

Instituição _____

Julgamento _____

Este trabalho é dedicado à minha família, que representa o meu alicerce.

Agradecimentos:

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a Deus por me proporcionar força e persistência ao longo dessa jornada de doutorado. Quero estender meu profundo agradecimento à minha querida mãe, Maria Ventura Gomes Neves, e ao meu amado pai, José de Oliveira Neves, pelo amor incondicional e apoio incansável.

Meus irmãos, José Maria Gomes Neves, sua inspiração foi fundamental, e a Deivisson Gomes Neves, seu apoio e ajuda foram inestimáveis. Aos meus adoráveis sobrinhos, Cecília e Lorenzo, minha gratidão por trazerem alegria à minha vida.

Agradeço também a todos os familiares e amigos de infância, cuja presença enriquece minha trajetória em especial a Thatiane e Alencar. Ao meu amigo Leonardo Machado, com quem compartilhei momentos desde os tempos do Arizona e agora em Ribeirão Preto, minha gratidão por sua amizade contínua.

À minha estimada orientadora, Michele de Castro, expresso minha profunda gratidão pelos preciosos ensinamentos, orientações e pela convivência enriquecedora que compartilhamos ao longo desta jornada.

Quero também estender meus sinceros cumprimentos aos valorosos colegas que trilharam conosco os caminhos do Laboratório. Não posso deixar de reconhecer e manifestar minha gratidão aos dedicados técnicos e funcionários da FMRP principalmente ao Departamento de Farmacologia, em especial a Laura, Giuliana, Gislaine, Eleni e Ramon bem como a todos os outros colaboradores, pelo inestimável empenho e contribuição que ofereceram.

Ao Departamento de Farmacologia da FMRP, expresso minha gratidão por proporcionar um ambiente de ensino e pesquisa de alta qualidade. Aos colaboradores do projeto, especialmente às professoras Rita Tostes e Eliane Arantes, agradeço por sua valiosa participação.

Ao professor Dr. Riccardo Lacchini, expresso minha profunda gratidão por permitir que realizasse o estágio acadêmico PAE na Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, e quero estender meu agradecimento aos professores que me acompanharam desde o ensino fundamental até o Doutorado, pois cada um deixou sua marca em minha formação.

À cidade de Ribeirão Preto, minha gratidão por acolher-me e proporcionar um lar durante esses anos de estudo.

Por fim, expresso minha profunda gratidão às agências de fomento, como a CAPES, que tornaram possível a realização deste doutorado, e às agências de pesquisa, como o CNPQ, FAEPA, e a FAPESP, pelo financiamento das minhas pesquisas.

Cada um de vocês desempenhou um papel significativo em minha jornada acadêmica e pessoal, e sou imensamente grato por todo o apoio e incentivo ao longo desses anos. Muito obrigado!

*Em um horizonte desconhecido me lancei,
No doutorado, um mundo novo desvendei.
Como Alice, curiosa e ousada,
Adentrei uma terra onde a lógica era traçada.*

*Aprendi a lidar com o desconhecido, inóspito,
E algumas belezas que surgiram, a floraram em meu espírito.
Caminhei por corredores de teorias,
Onde cada passo era uma nova descoberta, cheia de alegorias.*

*Assim como a personagem de Carroll, me vi em um País das Maravilhas,
Onde o conhecimento se entrelaça em tramas habilidosas.
Na toca do coelho, aprofundei-me sem temor,
Em estudos complexos, explorando com fervor.*

*Cada desafio, um gato risonho a me guiar,
Entre incertezas, minha determinação a brilhar.
E enfrentei a Rainha de Copas, senhora da dúvida,
Lidando com críticos, cujas palavras agudas, rápidas, são nítidas.*

*Mas, como Drummond, sigo firme em meu caminho,
Pois sei que cada pedra no percurso tem seu brilho.
Que a xícara da curiosidade nunca esfrie,
Enquanto na jornada do doutorado sorrio e me desafio*

RESUMO

Neves, VGO. Proteólise do Colágeno Tipo I pela Metaloproteinase de Matriz (MMP)2 Contribui para a Ativação da Quinase de Adesão Focal e Proliferação das Células Musculares Lisas Vasculares na Aorta em Estágios Iniciais da Hipertensão [Tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2023

Aumento da atividade da metaloproteinase de matriz (MMP)-2 contribui para aumentar a proliferação das células musculares lisas vasculares (CMLV) na aorta no início da hipertensão, ao clivar várias proteínas da matriz extracelular. Produtos da quebra do colágeno tipo I podem ativar as quinases de adesão focal (FAK), desencadeando sinais de migração e proliferação nas CMLV. Portanto, hipotetizamos que o aumento da atividade da MMP-2 induz a proteólise do colágeno tipo I nas aortas de ratos hipertensos e, assim, induz a ativação da FAK, levando ao aumento na proliferação das CMLV e remodelamento hipertrófico no início da hipertensão. Métodos: Ratos da linhagem Sprague-Dawley foram submetidos à hipertensão renovascular pelo modelo dois rins-um clipe (2R1C) e tratados com Doxíciclina (30 mg/kg/dia) por gavagem do terceiro ao sétimo dia após a cirurgia. Ratos controles foram submetidos a cirurgia simulada (Sham). A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida diariamente por pletismografia de manguito de cauda e as aortas foram processadas para zimografia e Western blot para MMP-2, pFAK/FAK, integrinas e colágeno tipo I. Espectrometria de massa, análise morfológica e imunofluorescência usando Ki67 também foram realizadas para identificar a estrutura do colágeno e a proliferação das CMLV. Células A7r5 foram estimuladas com colágeno e tratadas com inibidores de MMP (Doxiciclina ou ARP-100) e com o inibidor de FAK, PND1186, por 24 h. As células foram lisadas e avaliadas por Western blot para pFAK/FAK. Resultados: Ratos 2R1C desenvolveram PAS elevada na primeira semana, assim como aumento na expressão e atividade da MMP-2 na aorta ($p < 0,05$ em relação ao grupo Sham). O tratamento com Doxíciclina reduziu tanto a atividade da MMP-2 quanto a proteólise do colágeno tipo I nas aortas de ratos 2R1C ($p < 0,05$). Aumento de pFAK/FAK e aumento na proliferação das CMLV ocorreu no grupo hipertenso ($p < 0,05$ em relação aos grupos Sham) e a Doxíciclina reduziu ambos os parâmetros ($p < 0,05$). O aumento na proliferação

de CMLV contribuiu para o remodelamento hipertrófico, conforme visto pelo aumento na razão média/lúmen e área de secção transversal ($p < 0,05$ em relação aos grupos Sham). Em cultura de células, a MMP-2 cliva o colágeno, efeito revertido por inibidores de MMP ($p < 0,05$). Níveis aumentados de pFAK/FAK foram observados quando o colágeno foi adicionado ao meio de cultura ($p < 0,05$ em relação ao controle) e inibidores de MMP e FAK reduziram esse efeito. Conclusões: O aumento na atividade da MMP-2 induz a proteólises do colágeno tipo I nas aortas de ratos 2R1C e contribui para ativar FAK, induzindo a proliferação das CMLV durante a fase inicial da hipertensão.

Palavras-chave: metaloproteinase de matriz-2; colágeno; células musculares lisas vasculares; quinase de adesão focal; hipertensão

ABSTRACT

Neves, VGO. Type I collagen proteolysis by matrix metalloproteinase-2 contributes to focal adhesion kinase activation and vascular smooth muscle cell proliferation in the aorta in early hypertension [Thesis]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2023

Introduction: Increased matrix metalloproteinase (MMP)-2 activity contributes to increase vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation in the aorta in early hypertension by cleaving many proteins of the extracellular matrix. Cleaved products from type I collagen may activate focal adhesion kinases (FAK) that trigger migration and proliferation signals in VSMC. We therefore hypothesized that increased activity of MMP-2 proteolyzes type I collagen in aortas of hypertensive rats, and thereby, induces FAK activation, thus leading to increased VSMC proliferation and hypertrophic remodeling in early hypertension. Methods: Male Sprague-Dawley rats were submitted to renovascular hypertension by the two kidney-one clip (2K1C) model and treated with Doxycycline (30 mg/kg/day) by gavage from the third to seventh-day post-surgery. Controls were submitted to sham surgery. Systolic blood pressure (SBP) was measured daily by tail-cuff plethysmography and the aortas were processed for zymography and Western blot for MMP-2, pFAK/FAK, integrins and type I collagen. Mass spectrometry, morphological analysis and Ki67 immunofluorescence were also done to identify collagen changes and VSMC proliferation. A7r5 cells were stimulated with collagen and treated with the MMP inhibitors (Doxycycline or ARP-100), and with the FAK inhibitor PND1186 for 24 h. Cells were lysed and evaluated by Western blot for pFAK/FAK. Results: 2K1C rats developed elevated SBP in the first week as well as increased expression and activity of MMP-2 in the aorta ($p < 0.05$ vs. Sham). Treatment with Doxycycline reduced both MMP activity and type I collagen proteolysis in aortas of 2K1C rats ($p < 0.05$). Increased pFAK/FAK and increased VSMC proliferation ($p < 0.05$ vs. Sham groups) were also seen in the aortas of 2K1C and Doxycycline decreased both parameters ($p < 0.05$). Higher proliferation of VSMC contributed to hypertrophic remodeling as seen by increased media/lumen ratio and cross-sectional area ($p < 0.05$ vs Sham groups). In cell culture, MMP-2 cleaves collagen, an effect reversed by MMP inhibitors

($p < 0.05$). Increased levels of pFAK/FAK were observed when collagen was added in the culture medium ($p < 0.05$ vs control) and MMP and FAK inhibitors reduced this effect. Conclusions: Increase in MMP-2 activity proteolyzes type I collagen in the aortas of 2K1C rats and contributes to activate FAK and induces VSMC proliferation during the initial phase of hypertension.

Keyword: matrix metalloproteinase-2; collagen; vascular smooth muscle cells; focal adhesion kinase; hypertension.

Abreviação

- °C - Graus Celsius
- µg - Micrograma
- µm - Micrômetro
- π - Unidade Pi
- Ai - Área Interna do Lúmen
- Ae - Área Externa
- BSA - Albumina de Soro Bovino
- CSA - Área de Secção Transversal
- CONCEA - Controle de Experimentação Animal
- Da - Dalton
- DE - Diâmetros Externos
- DI - Diâmetros Internos
- Dox- Doxicilina
- DTT - Ditioneitol
- FAK - Cinase de Adesão Focal
- FERM - Ezrina, Radixina e Moesina
- g - Gramas
- H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio
- HCl - Ácido Clorídrico
- Hz - Hertz
- KDa - Kilodalton
- MALDI - Espectrometria de Massas por Ionização e Desorção Assistida por Matriz
- MEC - Matriz Extracelular
- M/L - Camada Média/Lúmen
- mg - Miligramas
- mmHg - Milímetros de Mercúrio
- MMP - Metaloproteinases de Matriz
- MMP-2 - Metaloproteinases de Matriz Tipo 2
- MMP-9 - Metaloproteinases de Matriz Tipo 9
- MMP-14 - Metaloproteinases de Membrana 14

- mM - Mili Mol
- ml - Mililitro
- NaF - Fluoreto de Sódio
- ONOO⁻ - Peroxinitrito
- PAS - Pressão Arterial Sistólica
- PVAT - Tecido Adiposo Perivascular
- RGD - Arginina-Glicina-Asparagina
- ROS - Espécies Reativas de Oxigênio
- SEM - Erro Padrão da Média
- Sham - Animal Submetido a Cirurgia Fictícias
- SFB - Soro Fetal Bovino
- SUS - Sistema Único de Saúde
- TBS-T - Solução de Salina Tamponada com Tris e Tween 20
- TIMP-2 - Inibidor Tecidual das Metaloproteinases de Matriz 2
- TOF - Espectrômetro de Massa Quadrupolo ou de Tempo de Voo
- 2R1C – Dois Rins e um clipe

Lista de Figuras

FIGURA 1- PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA APÓS PLETISMOGRAFIA CAUDA AO LONGO DE SETE DIAS DE HIPERTENSÃO 2R1C..	44
FIGURA 2- INTERAÇÃO HIPERTENSÃO E DOXICICLINA DIMINUIU O PESO DOS RATOS. .	45
FIGURA 3- GEL DE ZIMOGRÁFIA REPRESENTATIVO DA AORTA DE RATOS.....	45
FIGURA 4- A DOXICICLINA DIMINUI A ATIVIDADE GELATINOLÍTICA AUMENTADA DA MMP-2 NA AORTA DE RATOS COM 2R1C.	46
FIGURA 5- A DOXICICLINA DIMINUI A EXPRESSÃO PROTEÍCA DA MMP-2 AUMENTADA NA AORTA DE RATOS COM 2R1C.	46
FIGURA 6- TRATAMENTO COM A DOXICICLINA REDUZIU A EXPRESSÃO PROTEICA DA MMP-14 EM AORTA DE RATOS HIPERTENSOS.	47
FIGURA 7- AUMENTO DO TIMP-2 EM AORTA DE ANIMAIS HIPERTENSO.....	48
FIGURA 8- INIBIÇÃO DA MMP PELA DOXICICLINA PREVINE A PERDA DE COLÁGENO TIPO I NAS AORTAS DE RATOS 2R1C..	48
FIGURA 9- ANÁLISE DE MS/MS DE PEPTÍDEOS DE COLÁGENO TIPO I EXTRAÍDOS DE AORTAS DE RATOS APÓS SEPARAÇÃO POR ELETROFORESE.	49
FIGURA 10- AUMENTO DE HIDROXIPROLINA EM AORTAS DE RATOS HIPERTENSOS. ...	50
FIGURA 11- AUMENTO NO DE DEPÓSITO DE COLÁGENO TOTAL EM AORTA DE ANIMAIS HIPERTENSOS..	51
FIGURA 12- A INIBIÇÃO DA MMP PELA DOXICICLINA PREVINE A ATIVAÇÃO DE FAK NAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES NA AORTA DE RATOS 2R1C.	52
FIGURA 13- A INIBIÇÃO DA MMP PELA DOXICICLINA PREVINE A ATIVAÇÃO DE FAK NAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES NA AORTA DE RATOS 2R1C.	53
FIGURA 14- AUMENTO DA PRESSÃO ARTERIAL CONTRIBUI PARA O REMODELAMENTO ARTERIAL HIPERTRÓFICO. IMAGENS REPRESENTATIVAS DA AORTA DE RATOS CORADAS COM HEMATOXILINA E EOSINA.	54
FIGURA 15- ANÁLISE DIMENSÃO FRACTAL (D-FRACTAL)	55
FIGURA 16- AS CÉLULAS A7R5 FORAM EXPOSTAS AO COLÁGENO TIPO I NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE INIBIDORES DE MMP NO MEIO DE CULTURA.....	56
FIGURA 17 ATIVIDADE DA MMP-2 PROVENIENTE DO SOBRENADANTE DA CULTURA DE CÉLULAS A7R5.....	56
FIGURA 18 A INIBIÇÃO DAS MMPs PREVINE A ATIVAÇÃO DE FAK EM CÉLULAS A7R5.	57
FIGURA 19- A INIBIÇÃO DAS MMPs E FAK REDUZ A MIGRAÇÃO DE CÉLULAS A7R5..	58

Tabela

TABELA 1 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE PROTEÍNA DAS INTEGRINAS A2, AV, B1 E B3 NA AORTA DE RATOS POR WESTERN BLOT.....	52
---	----

Sumário

1	Introdução.....	17
1.1	Remodelamento Vascular.....	17
1.2	MEC e as MMPs.....	20
1.3	Integrinas e Sinalização Intracelular: Explorando as Conexões Moleculares.....	22
2	Justificativa.....	29
3	Hipóteses.....	31
4	Objetivo.....	32
4.1	Objetivos Secundários.....	32
5	Metodologia.....	33
5.1	Modelo de hipertensão 2R1C.....	33
5.2	Pletismografia de Cauda e Peso Corporal.....	34
5.3	Determinação da atividade das MMPs por zimografia em gel e <i>in situ</i>	35
5.4	Western blot para colágeno tipo I, FAK e integrinas nas aortas.....	37
5.5	Ensaio de hidroxiprolina para analisar produtos proteolíticos de colágeno nas aortas de ratos.....	38
5.6	Análise por espectrometria de massas para colágeno tipo I nas aortas de ratos separadas por SDS-PAGE.....	38
5.7	Avaliação da proliferação de células musculares lisas vasculares por imunofluorescência para Ki67, e expressão da MMP-14 e TIMP-2 em aortas de ratos.....	39
5.8	Análise morfométrica da aorta e deposição de colágeno.....	40
5.8.1	Análise Fractal da camada média da aorta.....	41
5.9	Cultura de células e ensaios de migração celular <i>in vitro</i>	42
5.10	Análises Estatísticas.....	43
6	Resultados.....	44
6.1	A atividade da MMP-2 contribui para a proteólise do colágeno tipo I em aortas de ratos hipertensos.....	44
6.2	A proteólise do colágeno contribui para a ativação de FAK, proliferação de células musculares lisas vasculares e hipertrofia aórtica na hipertensão.....	51
7	Discussão.....	59
8	Conclusão.....	64
	Bibliografia.....	65
	<u>ANEXOS</u>	72

1 Introdução

1.1 Remodelamento Vascular

A parede vascular é constituída por células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos camada adventícia e PVAT que interagem de maneira autócrina e parácrina no microambiente extracelular. Essa interação possibilita que a parede vascular identifique modificações na matriz extracelular (MEC), integre esses estímulos em sinais intracelulares e, por meio da produção local de mediadores, promova modificações na estrutura e função vascular. O processo de remodelamento vascular é, portanto, um fenômeno estrutural que engloba o crescimento, a morte e a migração celular, assim como a síntese ou degradação da MEC. Essas respostas são desencadeadas por diversos estímulos, tais como fatores de crescimento, substâncias vasoativas e alterações hemodinâmicas (RENNA; DE LAS HERAS; MIATELLO, 2013).

A hemodinâmica nos vasos sanguíneos é regida por princípios físicos, que incluem o número de Reynolds, a lei de Poiseuille e a lei de LaPlace. Essas leis estão fundamentadas na natureza do fluxo sanguíneo, nos parâmetros que o influenciam e nas forças que são exercidas sobre as paredes arteriais (KORSHUNOV; SCHWARTZ; BERK, 2007). Mudanças crônicas na hemodinâmica fisiológica, como aquelas observadas na hipertensão arterial sistêmica, têm o potencial de provocar adaptações que resultam no tipo de remodelamento verificado em diferentes tipos de leitos vasculares (AGBAJE, 2023a; KORSHUNOV; SCHWARTZ; BERK, 2007).

O padrão de remodelamento dos vasos sanguíneos na hipertensão arterial está intimamente relacionado com o diâmetro e a função da artéria sob análise. Isso pode, em parte, refletir a influência significativa exercida pelo fluxo sanguíneo na estrutura arterial. O fluxo exerce efeito sobre as artérias por meio da força friccional aplicada à parede, conhecida como estresse de cisalhamento. Esse estresse é percebido pelas células endoteliais que, como resposta, liberam uma variedade de fatores vasoativos. Esses fatores influenciam o tônus e o crescimento da parede arterial. Nas artérias elásticas e musculares observa-se um aumento no diâmetro e na espessura da parede; estas artérias não apenas contribuem indiretamente para a resistência vascular periférica, mas também impactam a complacência total e a reflexão das ondas de pulso (AGBAJE, 2023a, 2023b; MAYET; HUGHES, 2003).

No contexto do remodelamento arterial hipertrófico, a proliferação e a migração celular desempenham um papel crucial no aumento da espessura da camada média das artérias de condutância (M/L) e na ampliação da área de secção transversal (CSA). Essas mudanças são uma resposta à elevação da pressão arterial e culminam na intensificação da deposição de matriz extracelular (MEC) e no aumento da rigidez arterial. Por outro lado, sob os mesmos estímulos, ocorre um rearranjo e sobreposição das células musculares lisas vasculares na camada média das artérias de resistência no processo de remodelamento eutrófico. Esse rearranjo pode contribuir para a diminuição da função vasodilatadora nesses leitos vasculares (CASTRO et al., 2008; MARTINEZ-LEMUS et al., 2011).

As forças mecânicas que atuam sobre o tecido vascular são percebidas pelas células musculares lisas vasculares como estímulos, os quais são transmitidos aos componentes da MEC, aos receptores celulares e às estruturas intracelulares. Portanto, o estiramento mecânico, quando excede um determinado limiar fisiológico, desempenha um papel crucial na manutenção do fenótipo diferenciado, conhecido como fenótipo contrátil, das células musculares lisas (HUMPHREY; DUFRESNE; SCHWARTZ, 2014).

No entanto, em situações em que a pressão arterial está aumentada, ocorre uma mudança no fenótipo das células musculares lisas, passando do estado contrátil para o estado sintético. Experimentos que envolvem o estiramento de células musculares lisas em cultura demonstram essa transição de fenótipo. Isso ocorre devido à perda de algumas proteínas do citoesqueleto, ao aumento da síntese de proteínas, aumento na quantidade de MEC e um estado de proliferação significativo (ANWAR et al., 2012). Existem algumas explicações nas perdas de proteínas do citoesqueleto das células musculares lisas ao qual pode acarretar mudanças no fenótipo celular, como o aumento da atividade de metaloproteinases (MMPs) intracelular que podem degradar o citoesqueleto (BELO; GUIMARÃES; CASTRO, 2015; BELO et al., 2016; BLASCHE DE MELLO et al., 2019; PARENTE et al., 2021) assim como ativação de mecanismos epigenéticos que reduzem a produção dos constituintes de formação do citoesqueleto (JEONG et al., 2021; ZUREK et al., 2021).

Como mencionado anteriormente, tanto a síntese quanto a degradação dos componentes da MEC, juntamente com a proliferação e migração celulares, desempenham um papel fundamental na hipertrofia da parede arterial. A MEC é uma estrutura tridimensional dinâmica presente em todos os tecidos, passível de mudanças fisiológicas constantes para manter a homeostase tecidual. Portanto, as funções da MEC vão além da preservação da integridade e elasticidade dos tecidos. A desregulação em termos de composição, estrutura, espessura e quantidade da MEC contribui para diversas condições fisiopatológicas (BONNANS; CHOU; WERB, 2014).

1.2 MEC e as MMPs

A MEC é composta por macromoléculas como proteoglicanos, colágenos, elastina, fibronectina e laminina. Dentre essas, os colágenos se destacam como as proteínas fibrosas mais abundantes na MEC intersticial, representando cerca de 30% da massa proteica total em organismos multicelulares (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010). A estrutura básica dos colágenos consiste em três cadeias polipeptídicas que se organizam em uma tripla hélice. Essas cadeias apresentam regiões caracterizadas por repetições de aminoácidos no padrão Glicina-X-Y, em que X e Y podem ser qualquer aminoácido. Dentre os colágenos, os tipos mais prevalentes são o colágeno tipo I e o tipo III, que formam fibrilas. Estas fibrilas conferem resistência e suporte mecânico aos tecidos (HULMES, 2002).

Os colágenos estabelecem interações diretas com as células, seja por meio de receptores transmembranares ou por meio de moléculas intermediárias que reconhecem os receptores na superfície celular. A adesão celular estável ao colágeno desempenha um papel crucial em diversos processos fisiológicos, como ancoragem e diferenciação celular. Entre os receptores que se ligam diretamente à tripla hélice nativa do colágeno estão as integrinas, os receptores com domínios discoidinas, a glicoproteína VI e o receptor 1 semelhante a imunoglobulinas associado a leucócitos (LEITINGER, 2011). A clivagem de componentes da MEC, incluindo o colágeno, é um processo central no remodelamento vascular. Esse processo desempenha um papel crucial na regulação da abundância, composição e estrutura da matriz, além de liberar moléculas bioativas, como fatores de crescimento. Muitas proteases estão envolvidas nesse processo, incluindo as metaloproteinases de matriz (MMPs), as adamalinas e as meprininas (BONNANS; CHOU; WERB, 2014). Essas proteases desempenham um papel essencial na manutenção da dinâmica e da homeostase da MEC.

As MMPs são enzimas proteolíticas dependentes de zinco que desempenham papel fundamental na degradação de alvos tanto extracelulares quanto intracelulares em diversos tecidos. Elas contribuem para migração e proliferação celular durante a embriogênese e em situações fisiopatológicas, como a hipertensão. Especificamente, as MMP-2 e -9 têm papel significativo na hipertensão devido seu envolvimento no processo de remodelamento vascular crônico mal adaptativo. Esse processo é observado tanto em modelos animais de hipertensão arterial quanto na clínica (BELO; GUIMARÃES; CASTRO, 2015). A atividade dessas MMPs está relacionada à alteração da MEC e à modulação da estrutura da parede arterial, contribuindo para as mudanças hipertróficas em condições hipertensivas (BELO; GUIMARÃES; CASTRO, 2015).

A MMP-2 é sintetizada como pró-enzima, e esta é secretada e ativada por processos proteolíticos através da remoção do pró-peptídeo aminoterminal. O pró-peptídeo tem a função de manter a enzima na forma latente, devido à interação entre um resíduo de cisteína desse peptídeo e o sítio ativo, contendo zinco, na MMP-2. Quando ocorrem alterações nessa interação, a enzima é ativada (GALIS; KHATRI, 2002; SIMÕES; PEREIRA; CASEIRO, 2022). Uma das formas de ativação da MMP-2 pode ocorrer durante sua saída para o ambiente extracelular junto do seu principal inibidor tecidual, o TIMP-2, em um complexo que envolve a MMP-14. A porção N-terminal do TIMP-2 se liga ao sítio catalítico da MMP-14, formando o complexo TIMP-2-MMP-14. Ao mesmo tempo, a porção C-terminal do TIMP-2 age como um receptor para a região C-terminal da MMP-2, aumentando a interação com a MMP-14 e levando à ativação proteolítica da MMP-2 (RIBEIRO VITORINO et al., 2023). Outro mecanismo regulatório de modulação da atividade da MMP-2 ocorre por meio de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (BELO; GUIMARÃES; CASTRO, 2015; PARENTE et al., 2021; RIBEIRO VITORINO et al., 2023).

Estudos têm mostrado que o estresse mecânico imposto à parede vascular devido às mudanças hemodinâmicas provocadas pela hipertensão exerce um efeito regulatório positivo sobre a expressão e atividade da MMP-2 nas artérias. Isso resulta em um aumento da degradação de elementos da MEC, como colágeno e elastina (CHESLER; KU; GALIS, 1999). Esse processo de degradação proteica contribui para as alterações estruturais observadas nas paredes arteriais em resposta à hipertensão.

Para diversos tipos celulares, a clivagem dos colágenos tipo I e IV desempenha um papel crucial na migração através da MEC, por duas razões fundamentais: a proteólise promove o afrouxamento da estrutura da MEC, criando vias migratórias para as células, e expõe sítios específicos na estrutura dos colágenos que têm a capacidade de interagir com determinadas integrinas. Essas interações favorecem tanto a migração quanto a proliferação das células. Esses processos podem levar ao remodelamento da parede vascular, contribuindo para a hipertrofia observada na hipertensão (EGEBLAD; RASCH; WEAVER, 2010).

Esses sítios de interação, conhecidos como sequências RGD, estão presentes em diversas macromoléculas da MEC e são compostos por uma tríade de aminoácidos: arginina, glicina e asparagina. Esta sequência demonstrou desencadear respostas de ligação celular, tanto que peptídeos sintéticos que contêm essas sequências RGD têm a capacidade de mediar interações celulares de maneira semelhante às moléculas nativas (SCHAFFNER; DARD, 2003). As interações celulares dependentes das sequências RGD desempenham papel crucial na modulação e maturação de estruturas de adesão, tais como os complexos focais, as adesões focais e as adesões fibrilares. Portanto, a adesão mediada pela sequência RGD pode ser desdobrada em três componentes distintos: o substrato ou componente extracelular contendo a sequência RGD, o sensor ou receptor de superfície que reconhece a sequência RGD e o efetor ou molécula intracelular de sinalização. Cada um desses componentes age em colaboração com várias outras macromoléculas para modular a dinâmica das interações mediadas pela sequência RGD (BENOIT et al., 2012).

Além desse mecanismo, a proteólise do colágeno pelas MMPs também leva à formação de fragmentos característicos que possuem cerca de um a três quartos do tamanho da molécula nativa. Esses fragmentos têm a capacidade de atuar como antagonistas dos receptores do colágeno nativo, especificamente das integrinas $\alpha_2\beta_1$. Isso ocorre porque a ligação desses fragmentos aos receptores não é suficiente para ativá-los, impedindo a ligação do colágeno original. Contudo, esses mesmos fragmentos são capazes de interagir com as integrinas α_v , aumentando a superfície de contato dos domínios RGD, o que resulta na estimulação da migração e proliferação celular (MESSENT et al., 1998; PANG et al., 2023).

1.3 Integrinas e Sinalização Intracelular: Explorando as Conexões Moleculares

Os produtos resultantes da proteólise da MEC, como o colágeno tipo I, têm a capacidade de interagir com as integrinas, que desempenham um papel central na mediação de eventos de sinalização intracelular. Esses eventos culminam na indução de proliferação e migração celular. As integrinas são receptores glicoproteicos transmembranares do tipo I, compostos por subunidades alfa, com um peso molecular variando entre 120 e 180 kDa, e subunidades beta, com um peso molecular entre 90 e 110 kDa (ROSS; BORG, 2001).

As integrinas formam uma família diversificada de receptores de superfície celular, composta por mais de 18 subunidades alfa e 8 subunidades beta, resultando em cerca de 24 pares distintos identificados. Cada heterodímero de integrina é composto por um amplo domínio extracelular que interage com proteínas extracelulares, um domínio transmembranar que atravessa a membrana celular e um domínio intracitoplasmático curto na porção caudal. Esse último é responsável pelas interações com elementos do citoesqueleto, graças à mediação de proteínas adaptadoras (LI; FRANGOGIANNIS, 2022; ROSS; BORG, 2001).

A ligação específica das integrinas aos componentes da MEC, como lamininas, colágeno e fibronectina, é determinada pelos domínios extracelulares presentes nas várias subunidades alfa e beta que compõem o heterodímero. Isso resulta em diferentes integrinas especializadas para interagir com diferentes elementos da matriz. Por exemplo, as integrinas $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$ e $\alpha_{11}\beta_1$ são os principais receptores dos colágenos, enquanto as integrinas $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$ e $\alpha_7\beta_1$ são os principais receptores da laminina. Por fim, as integrinas $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_{11b}\beta_3$ e α_V interagem predominantemente com a fibronectina por meio dos sistemas de adesão dependentes da sequência RGD (SRICHAJ; ZENT; MANAKAN BETSY SRICHAJ AND ROY ZENT, 2010).

As integrinas desempenham um papel essencial na proliferação e migração celular, agindo diretamente como moléculas de ligação à MEC. Além disso, esses receptores também regulam vias de sinalização intracelular que controlam a reorganização do citoesqueleto, a geração de força e sobrevivência celular. A composição específica da MEC determina quais vias de sinalização serão ativadas pelas integrinas. Isso normalmente envolve a fosforilação da cinase de adesão focal (FAK), o recrutamento de proteínas adaptadoras, a ativação de GTPases e outras moléculas efetoras (HOOD; CHERESH, 2002).

Estudos indicam que as integrinas podem ser reguladas de forma positiva pela angiotensina II em fibroblastos cardíacos de ratos adultos e neonatos. Especificamente, a angiotensina II tem a capacidade de aumentar a expressão das subunidades α_V , β_1 , β_3 e β_5 , que desempenham um papel importante na interação dessas células com as proteínas da MEC. (GRAF et al., 2000; JIA et al., 2003; KAWANO et al., 2000) Isso resulta na fosforilação da FAK e na expressão de α -actinina (PANG et al., 2023). Modelos animais de hipertensão arterial também mostraram um aumento dessas proteínas em comparação com controles (GRAF et al., 2000; KAWANO et al., 2000).

Em culturas de células musculares lisas vasculares, a interação dos produtos de degradação do colágeno com as integrinas também desencadeia vias de sinalização que levam à ativação de alvos intracelulares, como paxilina, talina e p125 FAK. Essas proteínas são essenciais para a manutenção dos complexos focais e para a aderência das células à MEC. Esse processo contribui para as alterações observadas na migração e aderência celular em resposta à degradação da MEC (CARRAGHER et al., 1999).

Em modelos de roedores transgênicos com hipertensão, que exibem frequentemente um padrão de remodelamento arterial eutrófico, foi demonstrado que as integrinas do tipo β_1 e β_3 contribuem para causar mudanças estruturais hipertróficas nas artérias de resistência. Quando utilizou-se um peptídeo agonista análogo as sequências RGD foi observado remodelamento eutrófico, (HEERKENS et al., 2014). Além disso, nos animais hipertensos, observou-se fosforilação do resíduo de tirosina 397 da FAK e a ativação da via de sinalização c-Src. Esses processos foram associados principalmente à integrina β_1 (HEERKENS; IZZARD; HEAGERTY, 2007). Essas descobertas sugerem que as interações entre integrinas e a MEC, especialmente aquelas mediadas pelas sequências RGD, desempenham papel fundamental nas alterações estruturais vasculares observadas na hipertensão arterial. As mudanças na sinalização intracelular, incluindo a ativação da FAK e sinalização c-Src, destacam a importância das integrinas no processo de remodelamento vascular (ZHAO; REISKE; GUAN, 1998).

A FAK são enzimas tirosina-cinases de 125 kDa presentes em todos os tipos celulares. Elas possuem uma estrutura que inclui um domínio N-terminal homólogo às proteínas ezrina, radixina e moesina (FERM), um domínio cinase central, regiões ricas em aminoácidos prolina e um domínio C-terminal direcionado para a adesão focal (FAT). O domínio FERM da FAK facilita a sinalização intracelular a partir de receptores tirosina-cinase, como o receptor do fator de crescimento epidermal e o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas. Por sua vez, o domínio C-terminal contém sítios ricos em prolina que atuam como regiões de ligação para proteínas com domínios SH3, permitindo a interação com proteínas adaptadoras, como a p130Cas. Essa proteína promove a migração celular (ZHAO; REISKE; GUAN, 1998). Além disso, as proteínas GRAF e ASAP1 regulam a dinâmica do citoesqueleto e a formação das adesões focais. O domínio FAT promove a co-localização da FAK com as integrinas nas adesões focais, por meio de proteínas associadas às integrinas, como a paxilina e a talina.

Importante notar que o domínio FAT também é capaz de ativar a cascata de sinalização das proteínas Rho, um grupo de proteínas importantes na sinalização de eventos como proliferação e migração celular. Esse conjunto de interações e funções destaca a FAK como peça-chave na regulação das vias de sinalização intracelular relacionadas à adesão, migração e proliferação celular (LIM et al., 2008).

Estudos evidenciam que a FAK possui a capacidade de inativar a proteína p53 de maneira independente da sua atividade quinase, por meio dos domínios FERM. Esses domínios atuam como locais de ancoragem e promovem a ubiquitinação da p53, com dependência da proteína Mdm2. Esse processo requer a translocação nuclear da FAK e desempenha um papel significativo na promoção da proliferação e sobrevivência celular (LIM et al., 2008). Em experimentos de transfecção em células de fibroblastos NIH 3T3 em cultura, foi observado que a FAK age como mediador intracelular na regulação do ciclo celular via integrinas. Outras evidências sugerem que a formação do complexo FAK/Src nos contatos focais, a ativação da proteína ERK e o aumento das ciclinas D1 e p21 são eventos cruciais que contribuem para a regulação do ciclo celular. Esse conjunto de descobertas destaca o papel complexo e multifuncional da FAK nas vias de sinalização intracelular que regulam o ciclo e a proliferação celular (HEERKENS et al., 2014; ZHAO; REISKE; GUAN, 1998). Estudo realizado por Jeong *et al.* demonstrou a importância da ativação da FAK no processo de proliferação das células musculares lisas. Seus resultados mostraram que o enriquecimento nuclear da FAK, por meio da inibição da atividade catalítica da FAK durante a lesão vascular, bloqueia a proliferação das células musculares lisas e a hiperplasia neointimal, regulando a transcrição da ciclina D1 mediada por GATA4.

Em resumo, o aumento da tensão nas paredes arteriais decorrente do estresse mecânico induzido pela hipertensão arterial leva a alterações no comportamento das células musculares lisas vasculares e ao aumento da expressão e atividade da MMP-2. Uma vez ativada, a MMP-2 tem a capacidade de clivar os componentes da MEC, como o colágeno tipo I, resultando na formação de produtos de clivagem do colágeno e na exposição de sítios críticos na estrutura desse componente. Os produtos resultantes da degradação do colágeno podem ativar as integrinas da superfície celular, desencadeando uma cascata de eventos de sinalização intracelular. Isso inclui a fosforilação da FAK, que promove a ativação de vias sinalizadoras de proliferação e migração celulares. Esses processos contribuem ao remodelamento hipertrófico da hipertensão, incluindo a hipertrofia da camada média das artérias de grande calibre. Em conjunto, essas mudanças celulares e moleculares demonstram a complexa interação entre os componentes da MEC, as células musculares lisas vasculares e as vias de sinalização envolvidas no processo de remodelamento vascular em resposta à hipertensão arterial.

Apesar da ampla quantidade de literatura sobre o assunto, ainda há pouco conhecimento sobre o papel das MMPs no remodelamento dos vasos de condutância, como a aorta, durante a hipertensão renovascular, bem como sua interação com as vias de proliferação celular e sobrevivência que possivelmente conduziriam ao aumento da espessura da camada média nessas artérias.

2 Justificativa

Conforme a Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial de 2020 (BARROSO et al., 2021), a hipertensão é uma condição clínica de natureza multifatorial, caracterizada pela elevação sustentada dos níveis pressóricos ≥ 140 e/ou 90 mmHg. Essa condição está relacionada com distúrbios metabólicos, alterações funcionais e estruturais de órgãos, sendo agravada pela presença de diversos fatores de risco, tais como dislipidemia, obesidade abdominal, intolerância à glicose e diabetes melito. A hipertensão está associada a eventos como morte súbita, acidente vascular encefálico, infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca, doença arterial periférica e doença renal crônica. De acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde de 2013, 21,4% (IC 95%) dos adultos brasileiros auto relataram ter hipertensão arterial (BARROSO et al., 2021; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016). Entretanto, quando consideramos as medidas de pressão arterial aferidas e o uso de medicação anti-hipertensiva, o percentual de adultos com pressão arterial igual ou superior a 140 por 90 mmHg chega a 32,3% (IC 95%). Foi identificado que a prevalência de hipertensão arterial é maior entre homens e, como era esperado, aumenta com a idade, atingindo 71,7% para indivíduos acima de 70 anos. Em 2017, houve um total de 1.312.663 óbitos no Brasil, com 27,3% deles relacionados a doenças cardiovasculares (BARROSO et al., 2021; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016). Essas doenças representam 22,6% das mortes prematuras no Brasil, ocorridas entre pessoas com idade entre 30 e 69 anos. No período de uma década, de 2008 a 2017, foram estimadas 667.184 mortes atribuíveis à hipertensão arterial. Ao longo da última década, 77% dos custos com hospitalizações no Sistema Único de Saúde (SUS) relacionados à doença arterial coronariana foram decorrentes de doenças cardiovasculares associadas à hipertensão arterial. Esses custos aumentaram 32% em termos reais, passando de R\$ 1,6 bilhão para R\$ 2,2 bilhões no período de 2010 a 2019 (BARROSO et al., 2021).

O remodelamento cardiovascular resultante da hipertensão arterial desempenha um papel direto nas alterações morfofuncionais já mencionadas

anteriormente. Esse processo é ativo e envolve uma série de eventos celulares e teciduais, como o crescimento, a morte e a migração das células, bem como a síntese ou degradação da MEC em resposta às mudanças hemodinâmicas que afetam o coração e os vasos sanguíneos. Vários estudos têm apontado a participação das MMPs, incluindo a MMP-2, na origem dessas alterações cardiovasculares mal adaptativas. O aumento da atividade da MMP-2 contribui para a reorganização da MEC, pois promove proteólise de componentes como colágeno, estimulando vias de sinalização intracelulares, que desempenham papel importante nos eventos celulares e teciduais mencionados anteriormente.

3 Hipótese

O aumento na atividade da MMP-2 em aorta torácica de ratos hipertensos leva à proteólise do colágeno tipo I na MEC, contribuindo para a ativação da FAK via integrinas. Este processo, por sua vez, resulta no aumento da proliferação celular e desenvolvimento do remodelamento arterial hipertrófico da hipertensão.

4 Objetivo

Avaliar se a ativação da MMP-2 na fase aguda da hipertensão contribui para a proteólise do colágeno tipo I na MEC, e se os produtos resultantes dessa proteólise podem ativar vias de proliferação celular dependentes da FAK, possivelmente levando à hipertrofia das artérias de condutância.

4.1 Objetivos Secundários

- Avaliar se os inibidores de MMPs, Doxíciclina e ARP-100, previnem a proteólise do colágeno tipo I e inibem a proliferação acentuada das células musculares lisas vasculares na hipertensão.

- Avaliar se os inibidores de MMPs previnem o remodelamento arterial hipertrófico na fase inicial da hipertensão.

- Avaliar se a proteólise do colágeno pode ativar preferencialmente a via da FAK, na presença ou ausência do inibidor da FAK, PND 1186.

- Avaliar se, na presença de colágeno, o inibidor da FAK é capaz de bloquear a migração das células musculares lisas.

5 Metodologia

5.1 Modelo de hipertensão 2R1C

Em nosso protocolo experimental, empregamos ratos Sprague-Dawley (pesando 180 ± 20 g), obtidos do biotério da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto, para conduzir as investigações. Todos os procedimentos obedeceram estritamente às diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (165/2019).

Os ratos foram alojados em gaiolas coletivas, mantidos sob condições controladas, incluindo um ciclo de luz de 12/12 horas a temperatura de 24°C, com acesso ininterrupto a água e ração. A fim de realizar a cirurgia de hipertensão renovascular, conhecida como modelo 2R1C (GOLDBLATT, 1958), os ratos foram anestesiados com cetamina e xilazina (nas doses de 100 e 10 mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal). Nessa intervenção cirúrgica, um clipe de prata com uma abertura de 0,2 mm foi cuidadosamente posicionado na artéria renal esquerda, induzindo estenose. Os grupos controles, submetidos apenas à laparotomia, sem a aplicação do clipe, foram designados como Sham. Logo após a cirurgia, os ratos receberam uma única dose de flunixinina (1,0 ml/kg) e oxitetraciclina (1,0 ml/kg) por via subcutânea e intramuscular, respectivamente. Ao término do protocolo, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, intraperitonealmente) e posteriormente eutanasiados para a remoção da aorta torácica, com o objetivo de avaliar os parâmetros morfofuncionais e bioquímicos.

5.2 Pletismografia de Cauda e Peso Corporal

A pressão arterial sistólica (PAS) foi mensurada diariamente por pletismografia de cauda, enquanto o peso corporal foi medido diretamente na balança, ambos durante sete dias após a cirurgia. Os ratos foram considerados hipertensos quando a PAS aumentou até 25 mmHg após três dias da cirurgia, em comparação com o valor basal. Os ratos foram tratados com Doxiciclina (30 mg/kg/dia, #Sigma, D989) ou água (veículo) por gavagem por cinco dias. Para a pletismografia de cauda, os ratos foram contidos e mantidos em uma plataforma aquecida (37°C) para facilitar as medições. Os manguitos foram colocados na cauda e conectados a um sistema de aquisição de dados (sistema de pressão arterial não invasivo CODA, V.1.1, 2007, Kent Scientific Inc.). Pelo menos cinco medidas de PAS foram usadas para calcular a média. Ao final dos sete dias, os ratos foram anestesiados com cetamina e xilazina e eutanasiados por meio de incisões abdominais e torácicas para remover a aorta e avaliar os parâmetros morfofuncionais e bioquímicos.

5.3 Determinação da atividade das MMPs por zimografia em gel e *in situ*

As proteínas foram extraídas das aortas torácicas utilizando um pulverizador de vidro com solução RIPA contendo 200 mM de NaF e 1 mM de ortovanadato de sódio, além do coquetel de inibidores de proteínas em concentração 1x. A digestão ocorreu ao longo de 2 horas a 4°C e os sobrenadantes foram obtidos por centrifugação 12.000 rpm por 10 minutos. A concentração de proteínas foi medida utilizando o ensaio de Bradford (#B6916; Sigma-Aldrich, EUA). Homogeneizados aórticos (15 µg) foram misturados a um tampão não redutor (0,25 M de Tris-HCl pH 6,8, 30% de glicerol, 10% de lauril sulfato de sódio, 0,179 mM de azul de bromofenol) e carregados em um gel de poliacrilamida 8% copolimerizado com gelatina (1 mg/ml), sendo posteriormente submetidos à eletroforese a 80 Volts por cerca de 4 a 5 horas, ou até que a banda de interesse tenha percorrido completamente o gel. Os géis foram incubados duas vezes por 30 minutos cada com Triton X-100 a 2,5% v/v, à temperatura ambiente, e em seguida com um tampão ativador (150 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂.2H₂O, 50 mM de Tris, pH 7,6) durante 16 horas a 37°C. Os géis foram corados com 0,05% de Azul de Coomassie G-250 (diluído em 25% de metanol e 10% de ácido acético) e descorados com 30% de metanol e 10% de ácido acético. A atividade gelatinolítica foi detectada por meio de bandas descoradas em um fundo azul e quantificada utilizando o software ImageJ (Institutos Nacionais de Saúde, NIH).

Para analisar a atividade gelatinolítica *in situ*, as crio secções da aorta (5 μm), previamente incluídas em Tissue-Tek OCT, foram reidratadas em PBS por 10 minutos. As secções foram incubadas com gelatina marcada com corante (dye-quenched gelatin) (1 mg/mL, #D12054, ThermoFisher), diluída 1:10 em um tampão ativador (150 mM NaCl, 5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 mM Tris, pH 7.6), dentro de uma câmara escura e umedecida, por 1 hora a 37°C. Após essa etapa, as secções foram fixadas em formaldeído 4% por 20 minutos e lavadas com PBS. Para controle negativo, secções de aortas controles foram incubadas com PBS, não apresentando fluorescência. As imagens foram capturadas em aumento de 400x utilizando um microscópio de fluorescência (Carl Zeiss Microscopy, Cambridge). A fluorescência verde refletiu a atividade gelatinolítica e foi quantificada utilizando o software ImageJ. A imagem foi convertida para escala de cinza de 16 bits, e 40 pontos na fotografia foram quantificados dentro de uma área retangular de 4860 μm^2 . Para cada amostra, a média da intensidade fluorescente foi calculada a partir de três áreas distintas.

5.4 Western blot para colágeno tipo I, FAK e integrinas nas aortas

O homogeneizado aórtico (30 µg de proteína) foi misturado a um tampão redutor (0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 30% glicerol, 0,6 M DTT, 10% de lauril sulfato de sódio e 0,179 mM de azul de bromofenol) e aquecido a 70°C por 10 minutos. As amostras homogeneizadas foram carregadas em géis de poliácridamida a 10% ou 12%. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, Alemanha) utilizando um aparato de transferência úmido (#TE22 Mini Tank Transfer Unit, GE Healthcare, Alemanha) a 100 V por 1 hora e 15 minutos. As membranas foram bloqueadas por 1 hora com 5% de BSA diluído em TBS-T (solução salina tamponada com fosfato + tween 20 0,1%) e, em seguida, incubadas por 16 horas a 4°C com os seguintes anticorpos primários: anti-colágeno tipo I (ab 6308), anti-integrina α_v (ab179475), anti-integrina α_2 (ab 133557), anti-integrina β_1 (ab 183666) e β_3 (ab119992), anti-FAK (sc-558), pFAK (sc-11765) e MMP-2 (MAB 3308). Posteriormente, as membranas foram lavadas cinco vezes com TBS + Tween (0,1% v/v) para a incubação subsequente com anticorpos secundários policlonais de camundongo ou coelho anti-IgG conjugados a peroxidase (1:10.000, #12-349, #12-348, Millipore) por 1 hora. As bandas foram visualizadas pela quimioluminescência ECL (#32106, Thermo Fisher Scientific) com o uso do Amersham Imager 600 (GE Healthcare). As intensidades das bandas foram quantificadas pelo ImageJ. As bandas foram normalizadas por meio da actina de 43 kDa (MAB1501) ou Ponceau (#MKBT0397V).

5.5 Ensaio de hidroxiprolina para analisar produtos proteolíticos de colágeno nas aortas de ratos

Dez mg de aorta foram adicionados a tubos de polipropileno com água deionizada, seguidos por 12 M de HCl para acidificar as amostras. As amostras foram então incubadas a 120°C por 3 horas e centrifugadas a 10.000 g por 3 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados para quantificar a hidroxiprolina em uma placa de 96 poços utilizando o ensaio de hidroxiprolina (Sigma, MAK008). Os valores foram analisados por espectrofotômetro (Molecular Devices) a 560 nm e expressos em ng/ml.

5.6 Análise por espectrometria de massas para colágeno tipo I nas aortas de ratos separadas por SDS-PAGE

As bandas de interesse (130 kDa) foram excisadas do gel de proteínas SDS-PAGE, reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina de pâncreas de porco de grau de sequenciamento a uma concentração de 10 ng/μL (Promega), e posteriormente analisadas por espectrometria de massas por ionização e desorção assistida por matriz (MALDI) com Espectrômetro de massa quadrupolo ou de tempo de voo (TOF) (UltrafleXtreme, Bruker Corporation). O software FlexControl 4.0 (Bruker Corporation) foi utilizado para aquisição de dados. O espectrômetro de massas foi calibrado com o Padrão de Calibração de Peptídeos II (8222570). Os parâmetros utilizados foram 1500 disparos a laser por espectro, frequência do laser de 1000 Hz, e o instrumento operando no modo refletor positivo, em uma faixa de 900 a 4500 Da. Solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico preparada em acetonitrila, 0,1% de ácido trifluoroacético (v/v), na proporção de 1:1 (v/v), foi utilizada como matriz. Para análise de dados, foram empregados os softwares Flex Analysis 3.4, BioTools 3.2 e Sequence Editor 3.2 (todos da Bruker Corporation, EUA). Sequências de colágeno tipo I (P02454 e P02466 do UniprotKB) foram usadas para análise de dados com o mesmo software, utilizando os seguintes parâmetros: tolerância de erro MS/MS configurada para 0,8 Da cisteína carbamidometilada foi mantida fixa, oxidação de metionina e modificações variáveis, além de até três falhas de clivagem por peptídeo.

5.7 Avaliação da proliferação de células musculares lisas vasculares por imunofluorescência para Ki67, e expressão da MMP-14 e TIMP-2 em aortas de ratos

A imunofluorescência foi realizada nas aortas criopreservadas (5 µm) dos grupos experimentais utilizando o anticorpo antiKi67 (ab 16667), antiMMP-14 (ab51074) e antiTIMP-2 (MAB13446). As secções transversais da aorta foram lavadas com PBS por 5 minutos em uma câmara escura umedecida, seguido por fixação com formaldeído a 4% por 20 minutos à temperatura ambiente. Foi utilizado uma solução de bloqueio (1% de BSA, 0,3M de glicina, 0,1% de Tween-20, em PBS) por 1 hora a 37°C. Em seguida, as secções aórticas foram lavadas com PBS e incubadas na câmara umedecida com o anticorpo antiKi67 na diluição de 1:500 durante a noite. Para a MMP-14, a diluição foi 1:200 e para o TIMP-2 foi de 1:150, por uma hora. As secções foram então incubadas com o anticorpo secundário Texas Red (Vector Laboratory, Ti-1000) na diluição de 1:200 para o anticorpo antiKi67 e 1:150 para a marcação antiMMP-14, ambos por 1 hora, seguido pelo fluoroshield DAPI (Sigma) nas aortas marcadas com Ki67; na marcação do TIMP-2, o secundário usado foi o Alexa Fluor 488 (abcam). Para o controle negativo, as secções foram incubadas apenas com o anticorpo secundário e nenhuma fluorescência foi detectada. As secções foram examinadas por microscopia de fluorescência (Carl Zeiss Microscopy, Cambridge) e imagens foram capturadas em 400x. O Ki67 foi considerado positivo quando a fluorescência vermelha estava colocalizada com a fluorescência azul do DAPI nos núcleos das aortas (formando fluorescência roxa). A média aritmética de pelo menos três porcentagens obtidas a partir da relação entre os núcleos marcados com Ki67, em roxo, e o total de núcleos, em azul, foi calculada e expressa como a razão de núcleos Ki67/total de núcleos x 100. No ensaio para MMP-14, a fluorescência vermelha foi quantificada usando o software ImageJ. A imagem foi convertida em escala de cinza de 16 bits, e 40 pontos na fotografia foram submetidos à análise. Para cada amostra, a intensidade média da fluorescência foi calculada a partir de três áreas distintas.

5.8 Análise morfométrica da aorta e deposição de colágeno

Para avaliar se o aumento da proliferação de células musculares lisas vasculares contribuiu para o remodelamento arterial hipertrófico da hipertensão, as aortas foram fixadas em formaldeído tamponado a 10% por 24 horas, desidratadas em etanol a 70% e emblocadas em parafina. Secções de 4 μ m foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) ou picosirius red. As imagens foram obtidas por microscopia de luz em uma câmara de alta resolução (Leica LMD6500) e os parâmetros morfométricos foram analisados pelo ImageJ. Para analisar a área transversal da média (CSA) fez-se a subtração da área interna do lúmen (A_i) com a área externa (A_e), de acordo com a fórmula:

$$CSA = (A_e - A_i)$$

Em seguida, os diâmetros externos (DE) e interno (DI) foram calculados da seguinte maneira:

Para o diâmetro externo (DE), utilizou-se a fórmula:

$$DE = \sqrt{\frac{4A_e \cdot \pi}{\pi}}$$

Para o diâmetro interno (DI), a fórmula aplicada foi:

$$DI = \sqrt{\frac{4A_i \cdot \pi}{\pi}}$$

A espessura da média (M) foi obtida subtraindo o diâmetro interno (DI) do diâmetro externo (DE) e dividindo o resultado por 2:

$$M = \frac{DE - DI}{2}$$

Por fim, a relação entre a espessura da média (M) e o diâmetro do lúmen (L) (M/L) também foi calculada.

O corante picrossirius red (0,1g/100 ml) foi utilizado (incubação de 20 minutos) para avaliar o colágeno total na camada média das aortas. Em seguida, as secções foram fotografadas em microscópio de luz (Carl Zeiss Microscopy, Cambridge) com ampliação de 400X e analisadas pelo ImageJ usando a ferramenta de Limiarização de Cor. Primeiramente, selecionamos apenas a área correspondente à camada média do vaso. Em seguida, utilizamos a ferramenta de detecção de cor Threshold para isolar a coloração de colágeno Picrossirius Red no filtro vermelho. Isso nos permitiu quantificar a porcentagem de colágeno na área total da imagem, expressa em μm^2 .

5.8.1 Análise Fractal da camada média da aorta

Para a análise fractal, as amostras histológicas de aortas coradas com H&E foram fotografadas em 400X e foi selecionado a área correspondente a camada média de todas as imagens. Essas imagens foram convertidas para tons de cinza, e em seguida, calculamos sua dimensão fractal usando o plugin FracLac no ImageJ (LENNON et al., 2016). A dimensão fractal é uma medida da complexidade da intensidade dos pixels na imagem, isso permite avaliar e inferir complexidades e irregularidades de estrutura em cortes de tecidos histológico. Para esse cálculo, dividimos a imagem em caixas de diferentes tamanhos, variando de 2x2 pixels até 45% da área da imagem. Para cada tamanho de caixa, estimamos a dimensão fractal com base na diferença na intensidade dos pixels dentro de cada caixa. Calculamos a média dessas estimativas para obter a dimensão fractal final.

5.9 Cultura de células e ensaios de migração celular *in vitro*

A linhagem celular de músculo liso vascular de rato A7r5 (American Type Culture Collection - catálogo ATCC CRL-1444™) foi cultivada em placas de 6 poços, utilizando Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com alta concentração de glicose (4,5 g/L), penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 µg/mL), anfotericina B (250 mg/L) e gentamicina (50 mg/mL), mantidos no incubador a 37°C e 5% de CO₂. Quando as placas estavam com cerca de 80% de confluência, o soro fetal bovino (SFB) foi reduzido de 10% para 2% por 3 horas. O meio foi trocado por um novo e as células foram tratadas com colágeno tipo I (#C3867-1VL, 25 µg/cm²) com ou sem os inibidores de MMPs, Doxíciclina (#Sigma, D9891, 40 µg/mL) e ARP-100 (#Tocris2621, 100 µM), e o inibidor de FAK, PND1186 (#Tocris 6891/10, 2.5 µM) por 24 horas. Os inibidores foram adicionados 30 minutos antes da adição do colágeno tipo I. As células foram lisadas com tampão RIPA (#Sigma RO278), centrifugadas a 12000 rpm e o sobrenadante foi coletado. As células foram então coletadas em tampão de lise. O sobrenadante e os extratos celulares foram mantidos congelados. Western blot para pFAK (sc-11765)/FAK (sc-558) foi realizado nas células lisadas (30 µg) e colágeno tipo I (ab34710) foi realizado nos sobrenadantes. Para isso, os sobrenadantes foram lavados duas vezes por 1 hora com acetona fria, centrifugados a 12000 rpm e então ressuspensos em tampão RIPA. A zimografia em gel foi realizada para verificar a atividade da MMP-2 nos sobrenadantes.

Para avaliar a capacidade de migração celular após estimulação com o colágeno tipo I, as células A7r5 foram semeadas em placas de 6 poços até atingirem 100% de confluência. O meio de cultura foi substituído por um meio contendo 2% de FBS por 2 horas. Utilizando uma ponta de 200 µl, uma linha (“ou arranhão”) foi feita no centro do poço. Os detritos celulares foram removidos pela troca do meio de cultura e os tratamentos farmacológicos foram realizados da seguinte forma: colágeno tipo I sozinho, e Doxiciclina (ou PND1186 ou ARP-100) mais o colágeno tipo I. A capacidade de migração foi registrada tirando fotos em 0, 6 e 24 horas após o “arranhão” em modo de campo claro em um microscópio confocal (Leica Confocal 6000 Fluorescence Microscope). As imagens foram analisadas usando o ImageJ e um script de trabalho online (JONKMAN et al., 2014). Dessa forma, realizamos uma análise das cores usando a ferramenta Threshold, na qual tanto as células quanto o fundo da placa apresentam contrastes de cores distintas. Nesse processo, examinamos todas as partículas relacionadas à coloração ou ao contraste das células, o que nos permitiu quantificar a porcentagem da área total, expressa em micrômetros quadrados (μm^2), ocupada pelas células. Em seguida, comparamos a área de ocupação das células em diferentes momentos, ou seja, 0, 6 e 24 horas. A diferença entre a porcentagem de ocupação da área de células final em relação a área de células inicial nos forneceu uma estimativa de quanto ocorreu em termos de migração e crescimento celular.

5.10 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism, Versão 6.01 (Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos como valores médios \pm erro padrão da média (SEM). As comparações foram feitas utilizando ANOVA de duas vias ou ANOVA de uma via seguida pelo teste Tukey. Para a cultura de células, foi utilizado Teste T de Mann-Whitney não paramétrico. Valores estatisticamente significativos foram considerados quando $p < 0,05$.

6 Resultados

6.1 A atividade da MMP-2 contribui para a proteólise do colágeno tipo I em aortas de ratos hipertensos

Os ratos foram avaliados após uma semana de desenvolvimento de hipertensão, com o objetivo de investigar se os efeitos proteolíticos da MMP-2 sobre o colágeno desempenham um papel inicial na indução do remodelamento arterial hipertrófico. Observou-se um aumento significativo da PAS em sete dias de hipertensão (* $p < 0,05$ vs. Sham e Dox), embora o tratamento com a Doxiciclina não tenha reduzido a PAS nesse estágio (Figura 1).

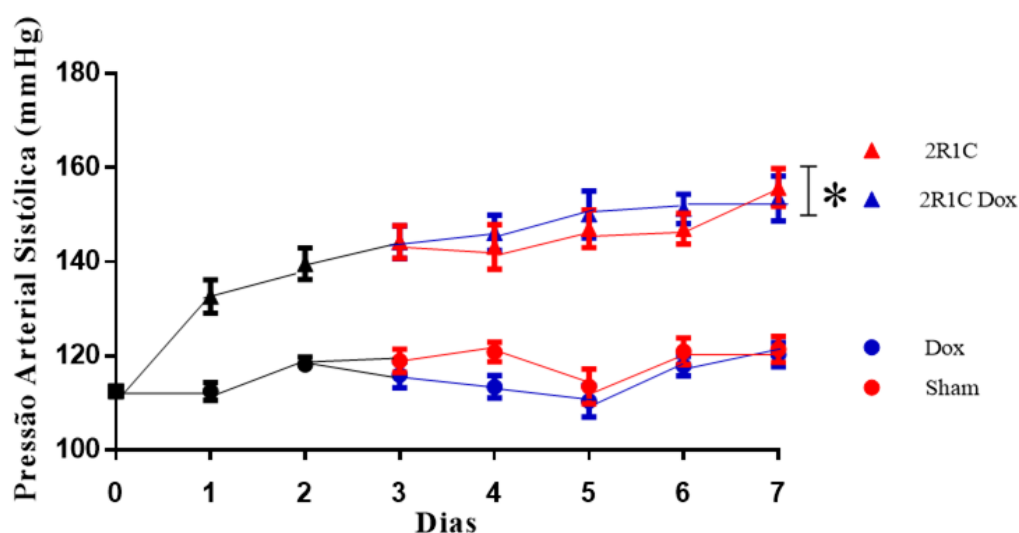


Figura 1- Pressão arterial sistólica após pletismografia cauda ao longo de sete dias de hipertensão 2R1C. Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média (* $p < 0,05$ vs. Sham e Dox, $n=12$). Os pontilhados pretos no gráfico representam os ratos antes de iniciar o tratamento com Doxiciclina no terceiro dia pós-cirurgia (Sham, $n=24$; 2R1C, $n=24$). Dox: Doxiciclina.

Notavelmente, o peso corporal dos ratos 2R1C tratados com Doxiciclina foi ligeiramente menor (Figura 2; # $p < 0,05$ vs. Sham).

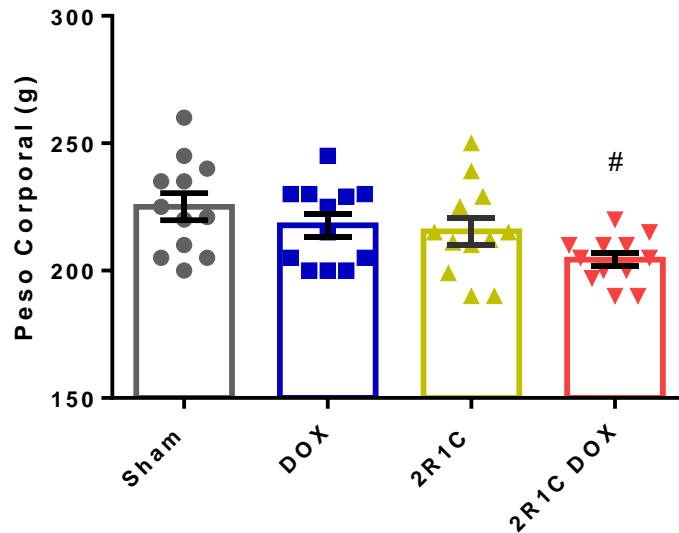


Figura 2- Interação Hipertensão e Doxíciclina diminuiu o peso dos ratos. Peso corporal (g) dos ratos. Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média (n=12); #p<0,05 vs. grupo Sham. Dox: Doxíciclina.

As aortas dos ratos 2R1C apresentaram um aumento significativo da atividade das MMP-2 de 72 e 64 kDa em comparação com os ratos Sham (*p<0,05, Figura 3), enquanto nenhuma banda correspondente à MMP-9 foi detectada na zimografia em gel.

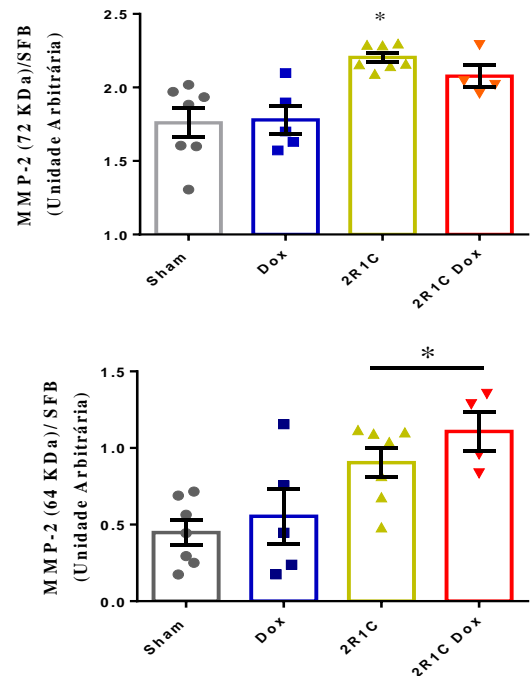
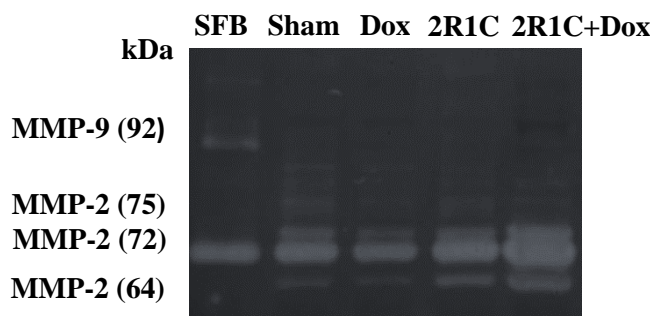


Figura 3- Gel de zimografia representativo da aorta de ratos. Os gráficos representam a quantificação das atividades da MMP-2 de 72 e 64 kDa nos homogeneizados aórticos. Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média (n=4-7); *p<0,05 vs. Sham e Dox. SFB: Soro Fetal Bovino; Dox: Doxíciclina.

É importante destacar que, durante o procedimento de eletroforese na zimografia em gel, o inibidor da MMP pode se dissociar do seu domínio catalítico, o que pode mascarar seu potencial efeito inibitório. Para superar essa limitação, também realizamos a zimografia *in situ* nas aortas. Observou-se um aumento na atividade gelatinolítica na camada média da aorta dos ratos 2R1C (* $p < 0,05$ vs. Sham e Dox), e a Doxiciclina reduziu significativamente essa atividade (# $p < 0,05$, Figura 4).

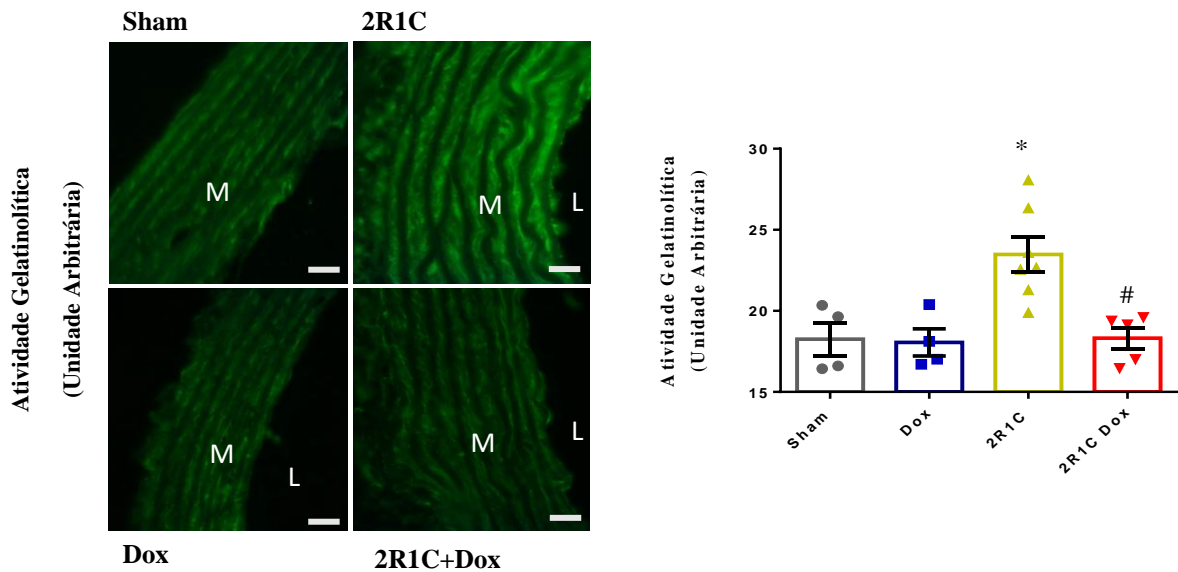


Figura 4- A Doxiciclina diminui a atividade gelatinolítica aumentada da MMP-2 na aorta de ratos com 2R1C. Micrografias representativas da atividade gelatinolítica na aorta de ratos hipertensos por zimografia *in situ* (400X). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média (n=4-7); * $p < 0,05$ vs. Sham e Dox e # $p < 0,05$ vs. 2R1C. M: média; L: lúmen. As barras medem 20 μ m. Dox: Doxiciclina

Além disso, as concentrações da MMP-2 de 72 kDa também foram reduzidas pela Doxiciclina nas aortas dos ratos 2R1C (# $p < 0,05$; Figura 5).

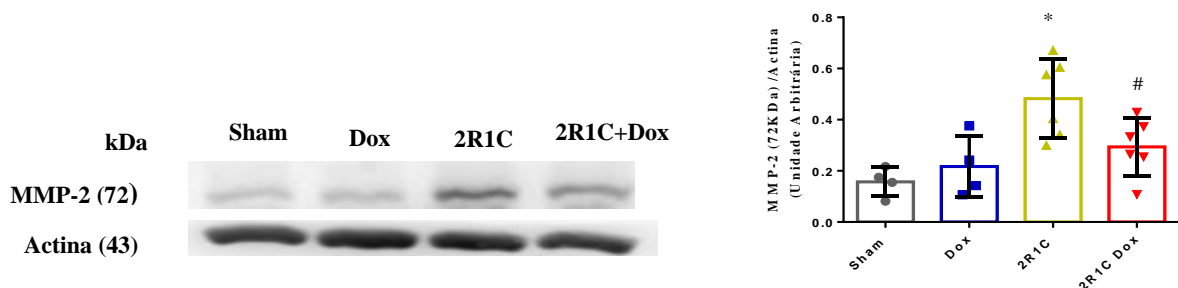


Figura 5- A Doxiciclina diminui a expressão proteica da MMP-2 aumentada na aorta de ratos com 2R1C. Imagens representativas do Western Blot da MMP-2 de 72 kDa e da actina de 43 kDa (como controle de carga) nas aortas de ratos. Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média (n=4-6); * $p < 0,05$ vs. Sham e Dox; # $p < 0,05$ vs. 2R1C.

Também é possível notar que a hipertensão resultou no aumento da MMP-14 (* $p < 0,05$ vs. Sham), que é uma MMP responsável pelo transporte e ativação da MMP-2. O tratamento com Doxiciclina também reduziu a expressão da MMP-14 nos ratos hipertensos (# $p < 0,05$; Figura 6).

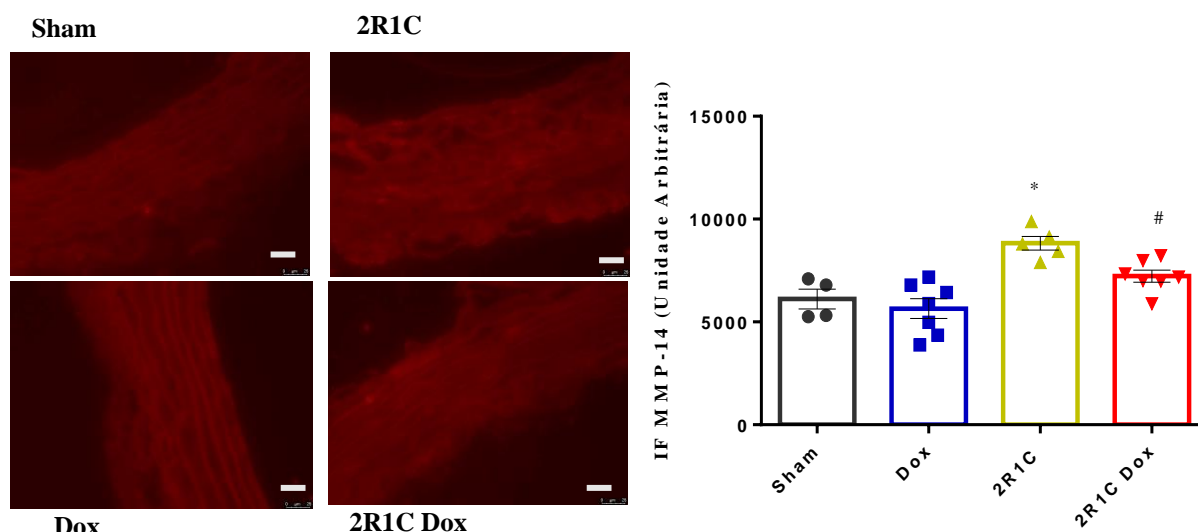


Figura 6- Tratamento com a Doxiciclina reduziu a expressão proteica da MMP-14 em aorta de ratos Hipertensos. Fotografias das aortas coradas com imunofluorescência para MMP-14 (400X). Os gráficos mostram a quantificação da MMP-14 na aorta. Os valores foram obtidos após quantificar a fluorescência de emissão cor vermelha. Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média (n=4-7). * $p < 0,05$ vs. Sham e Dox; # $p < 0,05$ vs. 2R1C. As barras medem 20 μ m.

O Tratamento com a Doxiciclina aumentou a expressão proteica de TIMP-2 nas aortas de ratos Sham (& $p < 0,05$) e 2R1C (# $p < 0,05$. Figura 7). O TIMP-2 tem um papel tanto no transporte da MMP-2 para fora da célula, quanto na sua inibição (RIBEIRO VITORINO et al., 2023; WANG; KHALIL, 2018). Segundo trabalhos clínicos, tem mostrado que a Doxiciclina pode elevar os níveis plasmático de TIMP-2, que acarretaria menor ativação da MMP-2,(CERISANO et al., 2015; ZHAO et al., 2023), o que corrobora com os nossos dados referente aos grupos tratados com Doxiciclina.

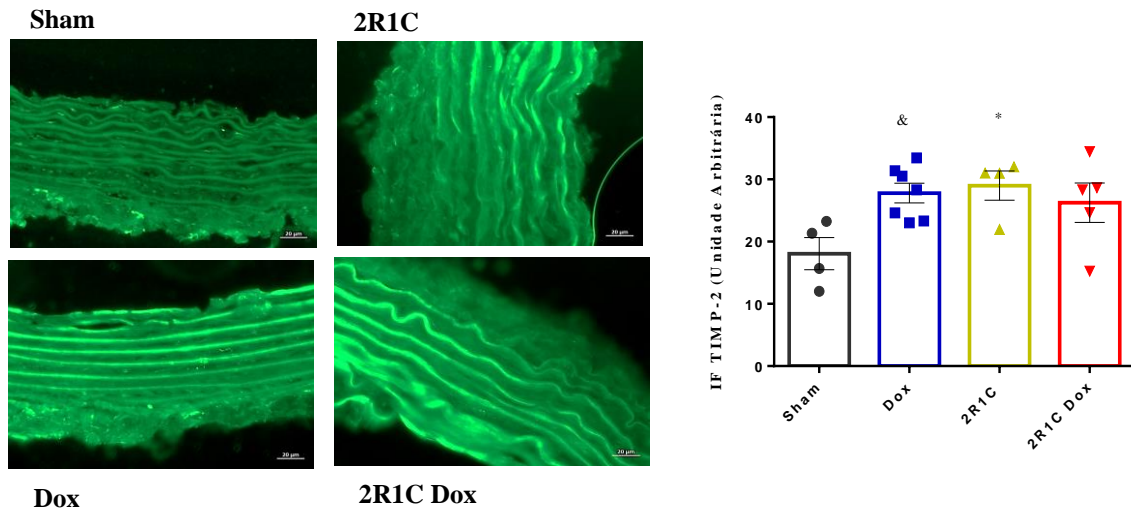


Figura 7- Aumento do TIMP-2 em aorta de animais Hipertenso. Fotografias das aortas coradas com imunofluorescência para TIMP-2 (400X). Os gráficos mostram a quantificação da TIMP-2 na aorta. Os valores foram obtidos após quantificar a fluorescência de emissão cor verde. Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média (n=4-7). *p<0,05 vs. Sham; &p<0,05 vs. Sham. As barras medem 20 μ m.

O colágeno é um dos alvos mais prováveis das MMPs na MEC em doenças cardiovasculares ou metabólicas. Além de conferir rigidez arterial, seus produtos proteolíticos podem estimular a migração e proliferação das células musculares lisas vasculares, levando ao remodelamento arterial hipertrófico (BELO; GUIMARÃES; CASTRO, 2015; NEWBY; PAUSCHINGER; SPINALE, 2006). A análise da aorta de ratos 2R1C por Western blot mostrou redução significativa no colágeno tipo I de 130 kDa em comparação com o grupo Sham (*p<0,05, Figura 8). O tratamento com Doxíciclina preveniu essa perda proteolítica nas aortas de ratos hipertensos (*p<0,05).

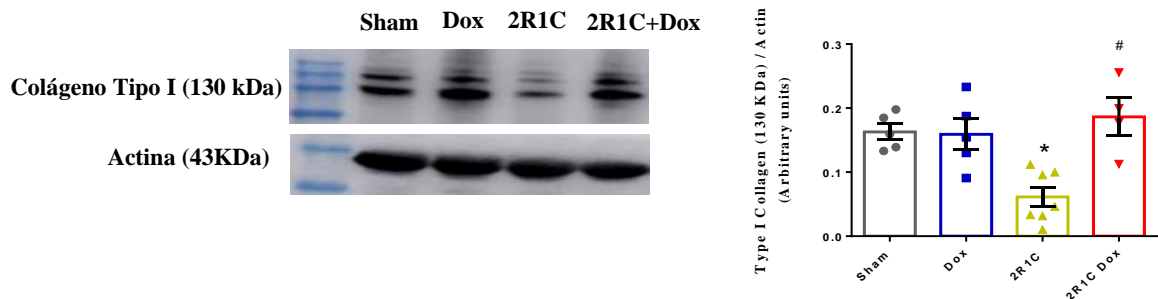


Figura 8- Inibição da MMP pela Doxíciclina previne a perda de colágeno tipo I nas aortas de ratos 2R1C. Blot representativo do colágeno tipo I de 130 kDa na aorta e sua respectiva quantificação (n=4-7). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média; *p<0,05 vs. Sham e #p<0,05 vs. 2R1C.

Na verdade, a espectrometria de massa confirmou que as bandas de 130 kDa continham colágeno tipo I (Figura 9). A cobertura reduzida para o colágeno tipo I foi consistente com o protocolo de extração e a baixa proporção de proteína presente no gel SDS-PAGE.

Colágeno Tipo I	Peso Molecular (KDa)	#Peptídeo	Cobertura %
Cadeia α1	130	14	13.3
Cadeia α2	130	8	7.9

Cadeia α1

1 MFSFVDLRLL LLLGATALLT HQEDIPEVS CIHNGLRVPN GETWKPDVCL ICICHNGTAV
61 CDGVLCKEDL DCPNPQKREG ECCPFCPEEY VSPDAEVIGV EGPKGDPGPQ GPRGPVGGPP
121 QDGIPOGPGI PGPPGPPGPP GPPGLGNFPA SQMSYGYDEK SAGVSVPGPM GSPGPRGLPG
181 PPGAPGQGF QGPPGEGEP GASGPMGPRG PPGPPKNGD **DGEAGKPRP** GERGPPGQGF
241 ARGLPGTAGL PGMKGRHGS GLDGAAGDTG PAGPKGEPGS PGENGAPQM GPRGLPGERG
301 RPPGPGSAGA RGNDAVGA A PPGPTGPTG PPGFPGAAGA KGEAGPQAR GSEGPQGVRG
361 EPGPPGAGA AGPAGNPGAD QOPGAKGANG APGIAGAPGF PGARGPSPGQ GSPGAPGPKG
421 NSGEPGAPGN KGDITGAK**EP** **GPAGVQPPG** **PAGEEGRGA** RGEVPSGLP GPPGERGGPP
481 SRGFPAGDV AGPKPAGER GSPGAPGPK SPGEAGRPE AGLPKAKGLT GSPGSPGPDG
541 KTGPPGAPG DGRPPGAPGF GARGQAGVMG FPGPK**GTAGE** **PGKAGERGV** **GPPGAVGPAG**
601 **KDGEAQAQA** **PPGAPAGER** GEQGPAGSPG **FGLG** GPAG PGEAGKPEQ GVPDLGAPG
661 PSGARGERGF PGERGVQPPP GPAGPRNNG APGNDGAKGD TGAPGAPGQ GAPGLQGMPP
721 **ERGAAGLPGP** **KGDRGDAGK** **GADGSPKDG** VRGLTGPIG PGPAGAPGDK GETGPPGAPG
781 PTGARGAPGD RGEPPGPPGA GFAGPPGADG QPAGKPEGD TVKGDAGPP GPAGPAGPPG
841 PIGNVGPAG KGSRAAGPP GATGFPGAAG RVGPPGSPGN AGPPGPPGPV GKEGKGPGR
901 ETGPAGR**PGE** **VGPPGPPGA** **GEKSPGADG** PAPSPTGPP **GSLG** **QQRGVV** **GLPQQRGERG**
961 FPLGPPSGE **PGKQPSGAS** **GERGPPGPMG** PPLAGPPGE SGREGSPGAE GSPGRDAGP
1021 AKGDRGETG AGPPGAPGAP GAPGPPGAPG **KNGDRGETG** **AGPAGPIGA** **GARGPAGPQ**
1081 PRGDKGETGE QGDRGIKGRH GFSGLQGGP SPGSPGEGP SGASGAPGPR GPPGAGSPG
1141 KDGLNGLPG IGPGRGRGT GDSGAPGPPG PPGPPGPPG PGGYDFSL PQQPKSQQ
1201 GGRYYR**ADDA** **NVVRDR**DLLEV DTTLKSLSQQ IENIRSPGSG **RKNPARTCRD** **LK**MCHSDWKS
1261 GEYWLDPNQG CNLDAIKVYC NMETGQTCVF PTQPSVPQKN WYISPNKKE KHVWFGESEMT
1321 DGFQFEYGE GSDPADVAIQ LTFRLRMSTE ASQNITYHCK NSVAYMDQQT GNLKKSLLLQ
1381 GSNEIELRGE GNSRFTYSTL VDGCTSHGTG **WGKTVIEYK**T TKTSLRPLID VAPLDIGAPD
1441 QEFQMDIGPA CFV

Cadeia α2

1 MFSFVDTRL LLLAVTSCLA TCQSLQMGVS RKGPTGDRGP RQGRGPAGPR GRDGDGPPV
61 PPGPPGAPG PGPPGPPGLT GNFAAQYSDK GVSAGPGPMG LMGPRGPPGA VGAPGQGFQ
121 GPAGEPGEPC QTGPAGSRGP AGPPGKAGED GHPGKPRGP ERGVVGPQA **RGFPTGLP**
181 **GFKGIR**HNG LDGLKGPQA QGVKGPAGP GENGTPOAG ARGLPGERGR VGAPGAGAR
241 GSDGSVGFVG PAGFIGSAGP PGFPAGPKP GELGVPVNGP PAGPAGPRGE AGLPGLSPV
301 GPPGNPGANG LTGAKGATGL PGVAGAPGLP GPRGIPGVP AAGATGPRGL VGEPPGAGK
361 GETGNK**EPG** **SAGAQQPPP** **SGEGRKRS** GEPGSAAGP PGLRSGSPG RGLPGLADRA
421 GVMGPPNNG STGPAGVRGP NDAAGRPEP GLMGRPLPG SPGNVGPAG EGVPGLPID
481 GRPPIGPAG PRGEAGNIGF PGPKGSPGD GPKPEKHPG LAGARGAPG DGNNGAQGP
541 GQQVQGGK EQGPAGPPGF **GSLG** GPGTA GEVKGPERG LPPEFGLPG APRGERGPP
601 GESGAAGPSG FIGIRGPPGA PGPDNKGAE GAVGAPGAG ASGPGGLPGE RGAAGIPGK
661 **GEKGETGLR** EIGNPGRDGA RGAPGAIAP GPAGASDRG EAGAAGPSG APRGSPGER
721 GEVGPAGPNG FAGPAGSAGQ PKAKGKGTG GPKGENIVG PTGPVGAAG SPNGPPGPA
781 **GSRGDGPPG** **MTGFPGAAGR** TGPPGSPGT GPPGPPGAG KEGIRGPRGD QGVPRTGEI
841 GASGPPGAG EKGPSGEPGT TGPPGATGQ GLLGAPGI **GSLG** **SRGERGQ** PGIAGALGEP
901 **GPGLG** PPG ARGPPGAVS PGVNGAPGAE GRDGNPSSDG PPRDQPPGH KGERGYPNI
961 GPTGAAGAPG PHGSVGPAGK HGNRGEPPGA GSVGPPGAVG PRGSPGPGI RGDKEGEPDK
1021 GARGLPGLK HNL**GSLG**GL AGLHGDQAP GPVGPAGPR PAGSPGIGK **DGRSGHPGV**
1081 **GPAGVRSQG** SQGPAGPPGP PGPPGPPVS GGGYDFGEG GFYRADQPRS QPSLRPK**DYE**
1141 **VDATLKLNN** **QIETLLTPEG** **SRKNPARTCR** DLRLSHPEWK SDYYWIDPNQ GCTMDAIKVY
1201 CDFSTGETCI QAQPVNTPAK NAYSRAQANK HVWLGETING GSQFEYNAEG VSSKEMATQL
1261 AFMRLLANRA SQNITYHCKN SIAYLDEETG RLKNAVILQG SNDVELVAEG NSRFTYTVLV
1321 DGCSKKTNEW **DKTVIEYK**TN KPSRLPFLDI APLDIGGNTQ EFRVEVGPVC FK

Figura 9- Análise de MS/MS de peptídeos de colágeno tipo I extraídos de aortas de ratos após separação por eletroforese. A tabela mostra o número de peptídeos e a porcentagem da sequência de colágeno tipo I detectada para as cadeias α1 e α2. As sequências do colágeno tipo I de rato com peptídeos detectados da banda correspondente a 130 kDa para ambas as cadeias α1 (esquerda) e α2 (direita) estão destacadas em vermelho. Os sítios de clivagem da MMP-2 no colágeno estão indicados em verde

Por fim, o ensaio de hidroxiprolina mostrou que os produtos de proteólise do colágeno estavam aumentados nas aortas de ratos 2R1C (* $p < 0,05$ vs. Sham e Dox) e a Doxiciclina preveniu esse aumento (* $p < 0,05$, Figura 10).

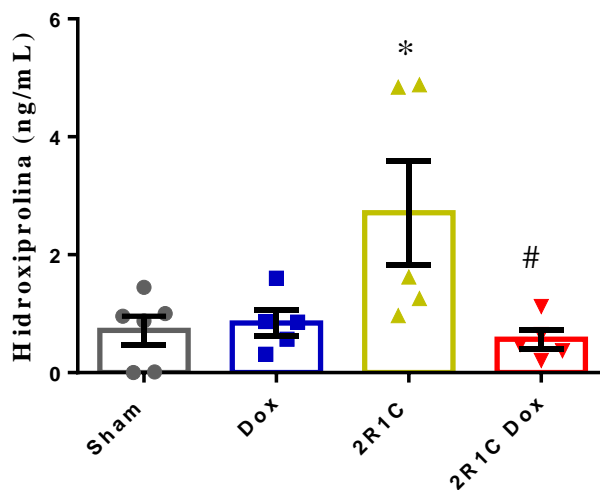


Figura 10- Aumento de Hidroxiprolina em aortas de ratos Hipertensos. O gráfico mostra a quantificação dos níveis de hidroxiprolina em ng/ml na aorta de ratos. Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média (n=4-6). * $p < 0,05$ vs. Sham e Dox e # $p < 0,05$ vs. 2R1C. Dox: Doxiciclina.

Quando o colágeno total foi analisado por picrossirius red na camada média aórtica, ele aparentemente aumentou nos ratos 2R1C em comparação aos controles ($p = 0,058$; Figura 11). No entanto, é importante observar que o picrossirius red cora todas as formas de colágeno, incluindo seus produtos proteolíticos.

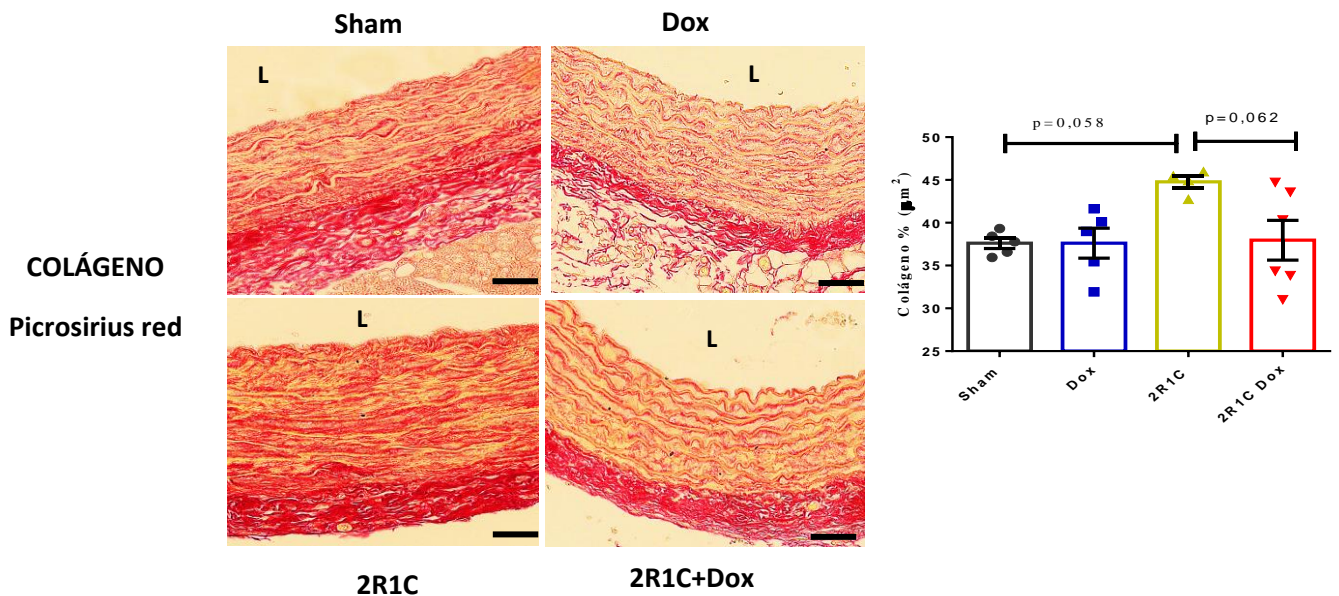


Figura 11- Aumento no depósito de colágeno total nas aortas de animais hipertensos. Imagens representativas de aortas de ratos coradas com picosirius red (400X). O gráfico mostra a quantificação do colágeno total (coloração vermelha) na aorta. Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média (n=4-6). M: média; L: lúmen. As barras são 50 μ m. Dox: Doxiciclina.

6.2 A proteólise do colágeno contribui para a ativação de FAK, proliferação de células musculares lisas vasculares e hipertrofia aórtica na hipertensão

A clivagem do colágeno tipo I expõe sítios críticos de ligação à integrina que contribuem para a ativação de FAK e aumento da proliferação celular em diferentes processos patológicos (NEWBY; PAUSCHINGER; SPINALE, 2006). Observamos aumento na forma fosforilada da FAK na aorta de ratos 2R1C (* $p < 0,05$ vs. Sham e Dox; Figura 12) e a Doxiciclina reduziu significativamente esse aumento (* $p < 0,05$ vs. 2R1C).

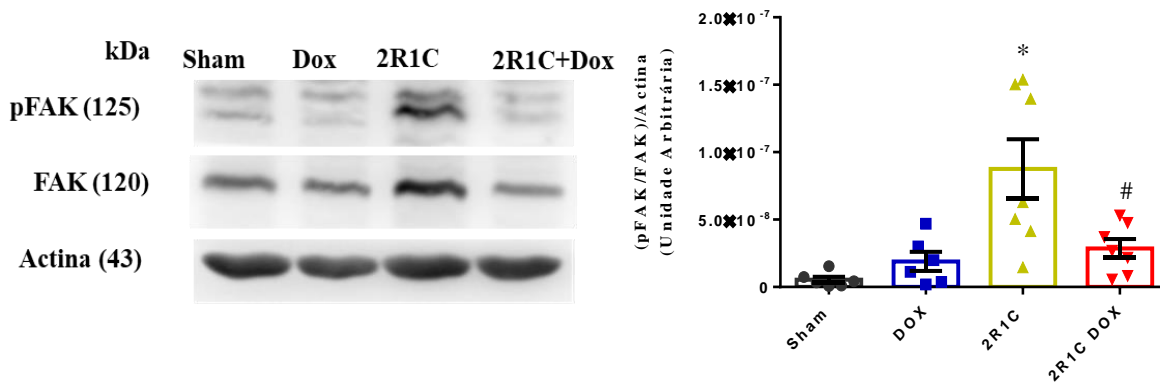


Figura 12-A inibição da MMP pela Doxíciclina previne a ativação de FAK nas células musculares lisas vasculares na aorta de ratos 2R1C. Blot representativo de pFAK/FAK de 125 kDa, com actina de 43 kDa como controle de carga, na aorta dos grupos experimentais. Os gráficos mostram a quantificação de pFAK/FAK/actina. Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média (n=6-7). *p<0,05 vs. Sham e Dox; #p<0,05 vs. 2R1C. Dox: Doxíciclina

Não houve alterações significativas da quantidade de integrinas α_2 , α_v e β_1 na aorta dos animais; no entanto, observou-se redução de β_3 na aorta dos ratos 2R1C (*p<0,05 vs. Sham e Dox; Tabela 1). Embora não detectamos diferenças nas quantidades proteicas da maioria das integrinas avaliadas, suas atividades podem estar aumentadas, já que a FAK encontra-se mais ativada na vasculatura dos ratos 2R1C (Figura 12).

Tabela 1 Quantificação dos níveis de proteína das integrinas α_2 , α_v , β_1 e β_3 na aorta de ratos por Western Blot.

Integrina	Sham	N	Dox	N	2R1C	N	2R1C+Dox	N
α_2	0,21 \pm 0,16	3	0,32 \pm 0,16	2	0,37 \pm 0,03	3	0,19 \pm 0,08	4
α_v	0,45 \pm 0,03	4	0,38 \pm 0,04	4	0,35 \pm 0,04	6	0,30 \pm 0,03	6
β_3	1,77 \pm 0,14	4	2,15 \pm 0,17	4	0,34 \pm 0,08*	6	1,12 \pm 0,29 [#]	6
β_1	0,63 \pm 0,08	4	0,66 \pm 0,17	4	0,57 \pm 0,10	6	0,65 \pm 0,25	6

Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média. *p<0,05 vs. Sham e #p<0,05 vs. 2R1C

Além disso, também observamos aumento significativo na proliferação das células musculares lisas vasculares na aorta de ratos 2R1C, conforme determinado pela marcação de núcleos com Ki67 (* $p < 0,05$ vs. Sham e Dox; Figura 13). A Doxíciclina preveniu a proliferação destas células na aorta dos ratos 2R1C (* $p < 0,05$).

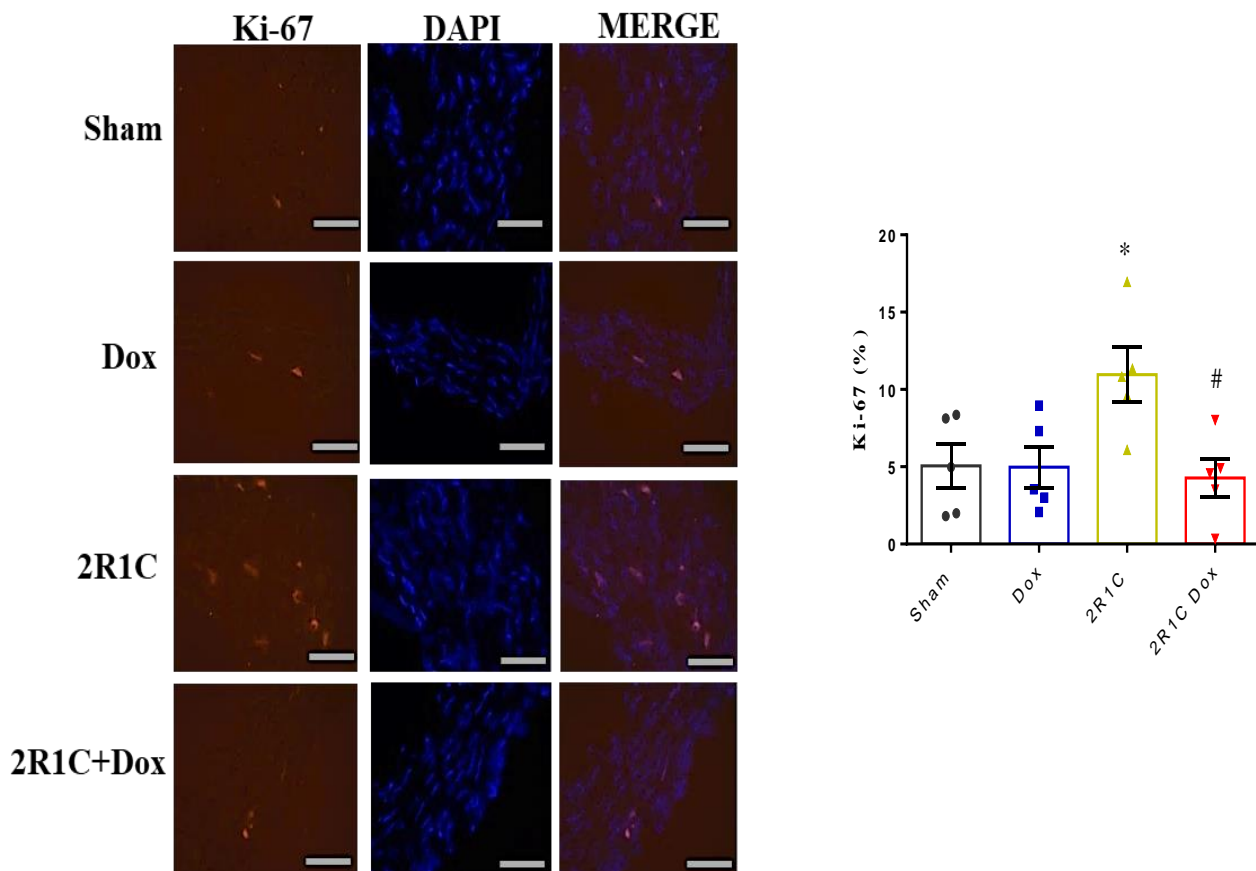


Figura 13- A inibição da MMP pela Doxíciclina previne a ativação de FAK nas células musculares lisas vasculares na aorta de ratos 2R1C. Fotografias das aortas coradas com imunofluorescência Ki-67 (400X). Os gráficos mostram a quantificação do Ki-67 na aorta. Os valores foram obtidos após quantificar a fluorescência roxa das imagens mescladas (Ki-67 mais DAPI). Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média ($n=5$). * $p < 0,05$ vs. Sham e Dox; # $p < 0,05$ vs. 2R1C. As barras medem 20 μm .

Como resultado, observou-se remodelamento arterial hipertrófico (identificado pelo aumento do CSA e M/L) nas aortas de ratos 2R1C (* $p < 0,05$ vs. Sham e Dox; Figura 14). O tratamento com Doxiciclina por sete dias não melhorou o remodelamento arterial hipertrófico nos ratos 2R1C; entretanto, demonstramos anteriormente que o tratamento diário com Doxiciclina por oito semanas reduziu notavelmente a atividade aumentada da MMP-2 e a remodelamento hipertrófico da aorta em ratos 2R1C (CASTRO et al., 2008).

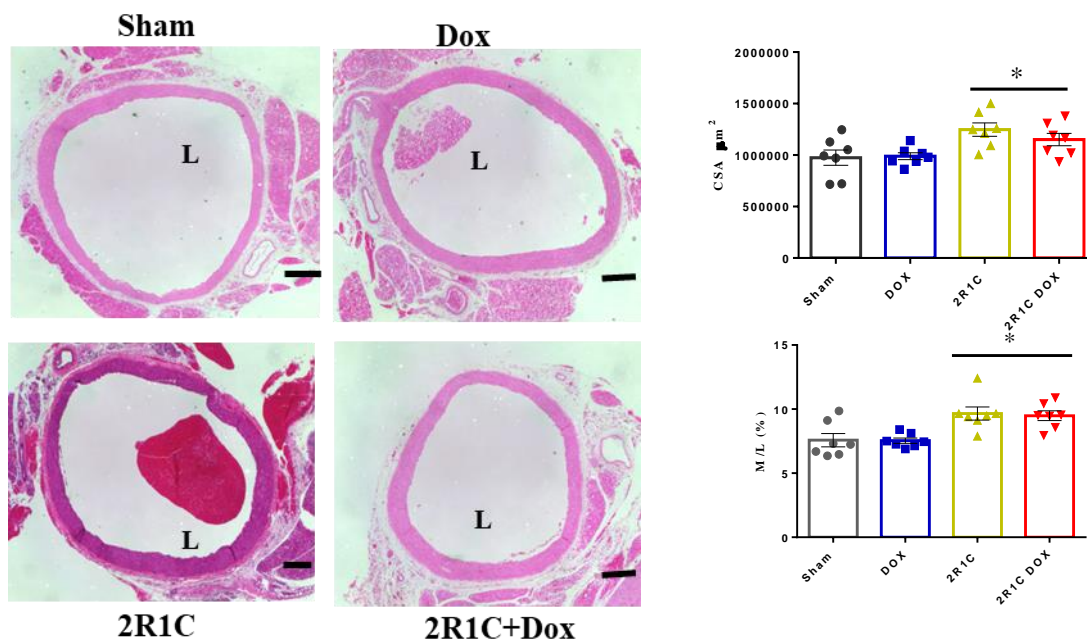


Figura 14-Aumento da pressão arterial contribui para o remodelamento arterial hipertrófico. Imagens representativas da aorta de ratos coradas com hematoxilina e eosina. Os gráficos mostram a quantificação dos parâmetros estruturais da aorta da seguinte forma: área transversal (CSA), em μm^2 , e relação média por lúmen (M/L), em porcentagem. Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média ($n=7$). * $p < 0,05$ vs. grupos Sham. M: média; L: lúmen. As barras medem 200 μm . Dox: Doxiciclina.

Na análise fractal da histologia de aorta, observamos uma diminuição no valor na dimensão fractal no grupo 2R1C ($p < 0,05$ vs. Sham) e o tratamento com Doxiciclina reverteu esse efeito ($p < 0,05$ vs. 2R1C; Figura 15). Segundo *Lennon et al*, mostraram que tecidos mesotelioma malignos apresentaram baixa dimensão fractal e aumento de lacunas teciduais devido ao alto processo migratório celular. Por esse método conseguimos inferir que ocorre uma desorganização na camada média do tecido aórtico nos ratos hipertensos, sendo que o aumento da atividade das MMPs e a degradação de colágeno poderiam aumentar a lacuna tecidual favorecendo o processo migratório celular.

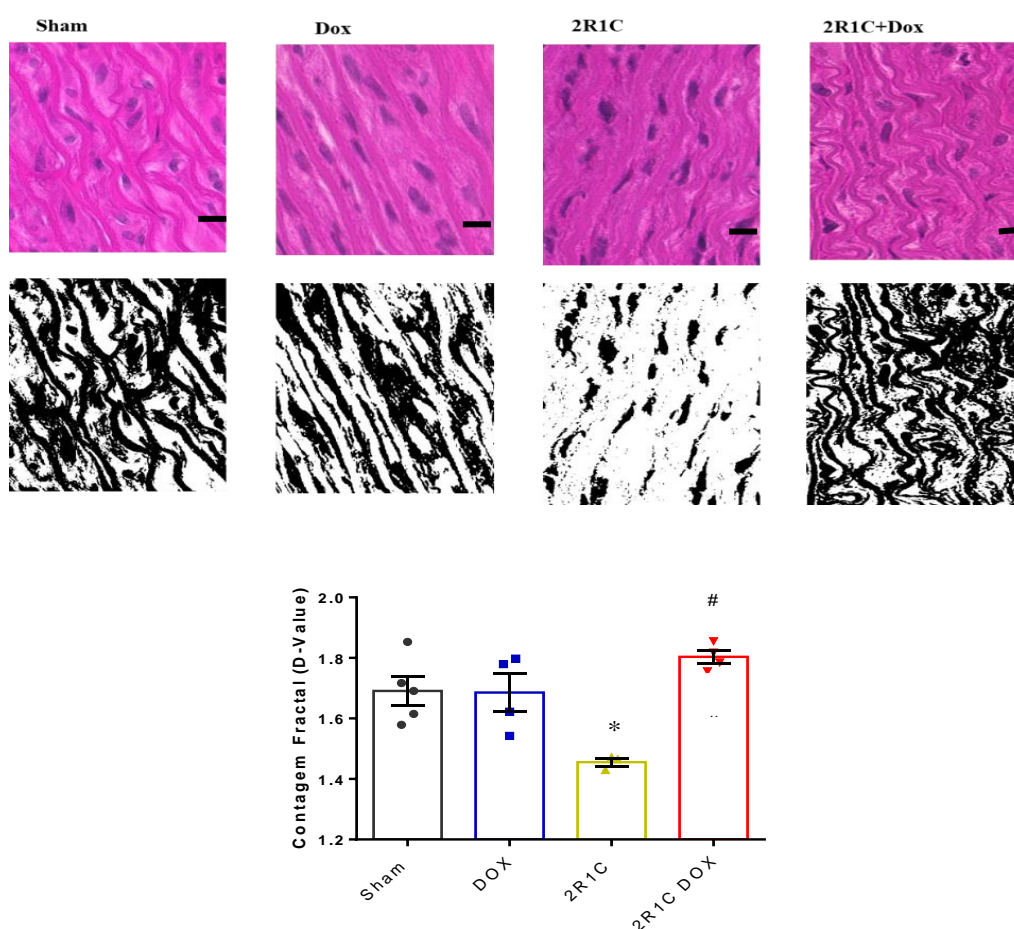


Figura 15- Análise Dimensão Fractal (D-fractal). Foto representativa de corte histológico de aorta corado com Hematoxilina e eosina. Gráfico representa contagem Fractal D-Value. Dox= Doxiciclina. Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média ($n=5-3$). * $p < 0,05$ vs. Sham, # $p < 0,05$ vs. 2R1C. As barras medem 20 μ m.

Para confirmar que a FAK é uma das vias de sinalização que contribui para a migração das células musculares lisas vasculares após proteólise do colágeno, inibimos sua atividade *in vitro*. A Figura 16 mostra que, quando células A7r5 são incubadas com colágeno tipo I no meio de cultura, a quantidade de colágeno de 130 kDa diminui; este efeito é evitado na presença dos inibidores da MMPs, ARP-100 ou Doxíciclina (* $p < 0,05$).

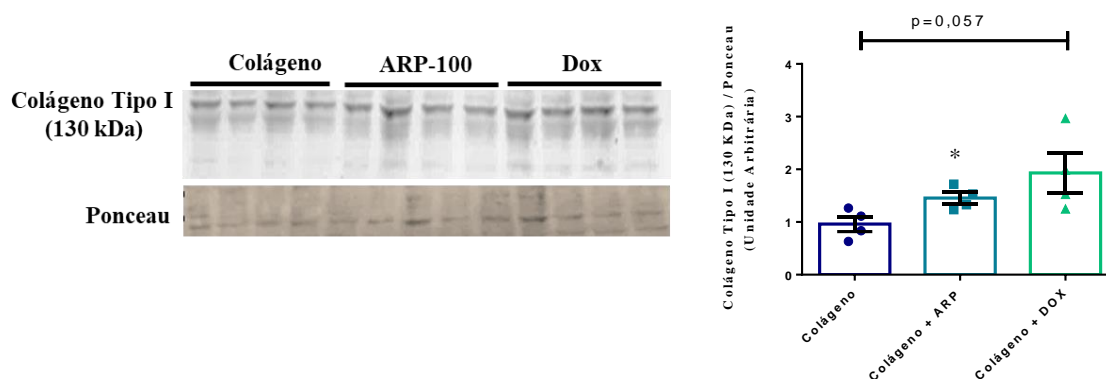


Figura 16- As células A7r5 foram expostas ao colágeno tipo I na presença ou ausência de inibidores de MMP no meio de cultura. A) Blot representativo de colágeno tipo I de 130 kDa. Quando o meio de cultura é incubado com colágeno tipo I nas células A7r5, a quantidade de colágeno foi reduzida em comparação com a presença de ARP-100 e Doxíciclina. Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média (n=4). * $p < 0,05$ vs. Controle

Para mostrar que a MMP-2 está presente no meio de cultura, realizamos zimografia em gel. A atividade da MMP-2 de 72 kDa foi observada e esse efeito foi reduzido pelo ARP-100 (* $p < 0,05$; Figura 17).

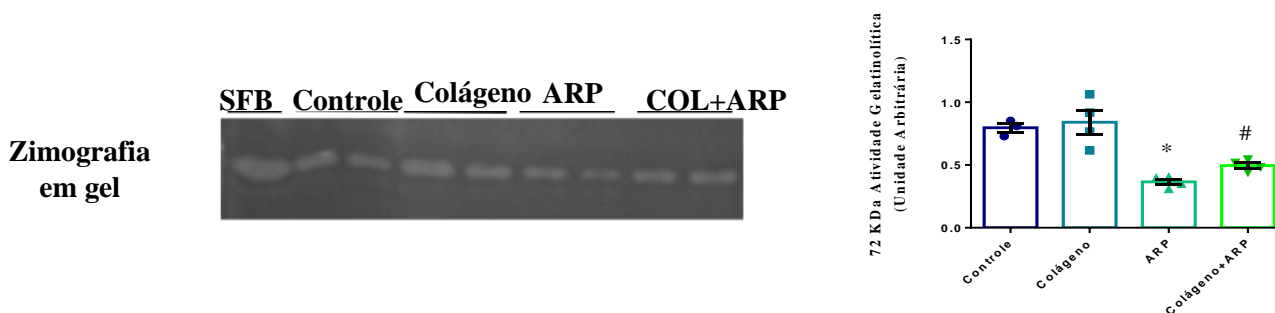


Figura 17 Atividade da MMP-2 proveniente do sobrenadante da cultura de células A7r5. Gel de zimografia da MMP-2 de 72 kDa no meio condicionado das células A7r5 estimuladas com colágeno tipo I e ARP-100. A atividade da MMP-2 foi reduzida pelo ARP-100. Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média (n=3-4). * $p < 0,05$ vs. Controle e # $p < 0,05$ vs. colágeno tipo I. SFB: Soro Fetal Bovino

Observamos aumento significativo na pFAK nas células A7r5 quando o colágeno foi adicionado ao meio de cultura (* $p < 0,05$) e esse efeito foi revertido pelos inibidores da MMP ou FAK (# $p < 0,05$; Figura 18).

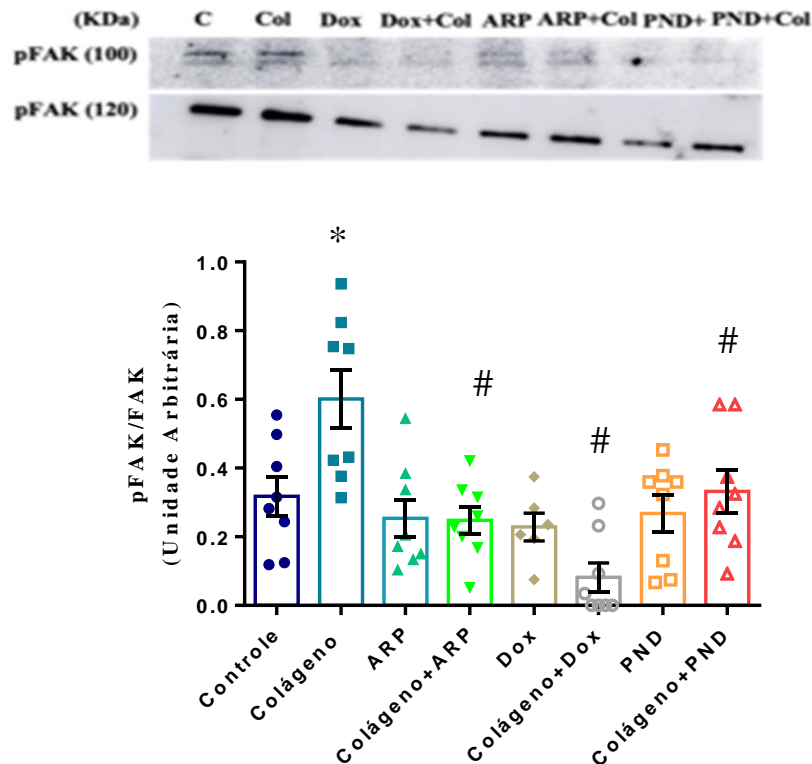


Figura 18 A inibição das MMPs previne a ativação de FAK em células A7r5. Blot representativo de pFAK/FAK de células A7r5 estimuladas com colágeno tipo I, inibidores de MMP (Doxiciclina ou ARP-100) e o inibidor de FAK, PND1186. O gráfico mostra os valores de pFAK/FAK quantificados. Os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média ($n=6-8$). * $p < 0,05$ vs. Controle; # $p < 0,05$ vs. colágeno tipo I. C: controle; Col: colágeno; Dox: Doxiciclina.

O aumento da pFAK pode contribuir para a migração das células musculares lisas vasculares após lesão arterial. Após 24 horas do riscado nas células A7r5, houve aumento significativo na migração quando o colágeno estava presente no meio de cultura (* $p < 0,05$ vs. controle, $\Delta=24$ horas; Figura 19). Os inibidores da MMP e da FAK preveniram a migração das células musculares lisas vasculares na presença de colágeno tipo I em 24 horas (# $p < 0,05$).

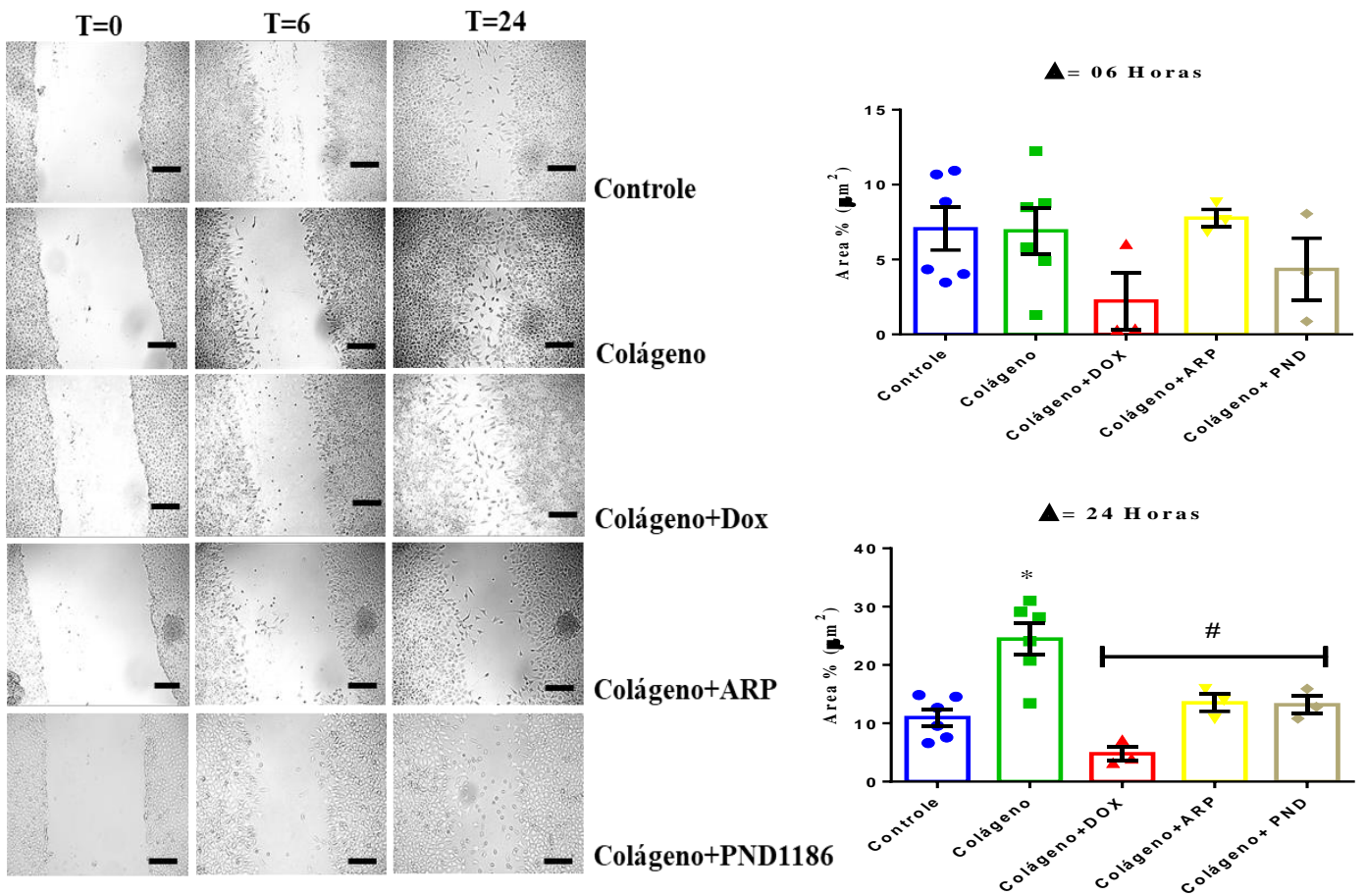


Figura 19- A inibição das MMPs e FAK reduz a migração de células A7r5. Imagens da migração de células A7r5 no ensaio de "arranhão" feito com a ponteira de 200 µl. As células foram estimuladas com colágeno tipo I na presença de inibidores de MMP e FAK, e os valores foram quantificados 6 e 24 horas após o riscado. Os dados são representados como médias ± erro padrão da média da porcentagem de migração de células por tempo (ΔT = 6 e 24 horas). *p<0,05 vs. Controle e #p<0,05 vs. colágeno tipo I. As barras medem 200 µm (10x).

7 Discussão

Neste estudo, mostramos que a atividade da MMP-2 está aumentada na fase inicial da hipertensão e contribui para a proteólise do colágeno tipo I na aorta, induzindo a ativação da FAK e a proliferação de células musculares lisas vasculares. Esses mecanismos podem contribuir para o desenvolvimento do remodelamento arterial hipertrófico na hipertensão, o que é um fator preditivo para o desenvolvimento de outras doenças cardiovasculares. Assim, um tratamento farmacológico adequado capaz de prevenir a progressão desses elementos mal adaptativos da hipertensão é necessário. As MMPs são uma das proteases que poderiam desencadear a proteólise do colágeno, o que pode levar a ativação da via de sinalização da FAK resultando na proliferação das células musculares lisas vasculares no início da hipertensão renovascular.

O remodelamento arterial hipertrófico é uma resposta mal adaptativa à hipertensão para compensar o aumento do estresse de tração nas artérias. Geralmente, é descrito como um aumento no CSA e M/L e aumento nos componentes da MEC, como o colágeno tipo I. Além disso, as células musculares lisas vasculares proliferam e migram da camada média para as áreas luminais, contribuindo assim para a parede arterial hipertrofiada (BELO; GUIMARÃES; CASTRO, 2015; HUMPHREY, 2021).

O aumento de atividade da MMP-2 induz tanto a migração quanto a proliferação das células musculares lisas vasculares na hipertensão (BELO et al., 2016; PFISTERER et al., 2012). Nosso grupo demonstrou que a MMP-2 clivou a calponina-1 e estimulou a proliferação das células musculares lisas vasculares nas aortas de ratos Wistar 2R1C durante a primeira semana de hipertensão, efeitos que antecederam o remodelamento hipertrófico (BELO et al., 2016). Quando os ratos hipertensos foram tratados com Doxíciclina, houve redução da atividade da MMP-2 e não houve mais proteólise significativa da calponina-1. Neste presente trabalho, também observamos que o tratamento por sete dias com a Doxíciclina reduziu significativamente a atividade aumentada da MMP-2.

O tratamento com Doxíciclina também reduziu a proliferação acentuada das células musculares lisas vasculares na aorta de ratos hipertensos. Esse efeito pode contribuir para a capacidade da Doxíciclina de reduzir a remodelamento hipertrófico em fases crônicas da hipertensão (CASTRO et al., 2008; GUIMARAES et al., 2011). Entretanto, como a Doxíciclina mostrou apenas tendência em reduzir o CSA arterial aumentado no início da hipertensão, é necessário levar em consideração que também outros mecanismos além da MMP-2, que contribuem para a hipertrofia arterial, como por exemplo, o estresse oxidativo e outras vias de sinalização ativada pela angiotensina II.(BLASCHE DE MELLO et al., 2019; MATSUBARA, 1998; UNGER, 2002).

Para estimular a migração ou proliferação das células musculares lisas vasculares, a MMP-2 precisa clivar alguns componentes da MEC para abrir espaço para as células se moverem. O colágeno tipo I é abundante na camada média aórtica e um dos principais alvos da MMP-2. De fato, a ativação da MMP-2 em modelos animais hipertensos mostrou sua capacidade de degradar o colágeno na aorta, contribuindo para o remodelamento hipertrófico (CASTRO et al., 2008, 2010; PIRES et al., 2011). Neste estudo, a Doxíciclina evitou a perda de colágeno tipo I nas aortas hipertensas, além de reduzir a formação de seus produtos de proteólise, mostrando assim os efeitos proteolíticos da MMP-2 nas fases iniciais da hipertensão. Achados semelhantes foram observados com células A7r5, onde o ARP-100 foi capaz de preservar o colágeno do meio condicionado. Consideramos então que esse mecanismo é um dos gatilhos iniciais da proliferação e migração das células musculares lisas vasculares, que podem ser seguidos pela ressíntese de colágeno para manter a estrutura aórtica firme na hipertensão crônica. De acordo com CERON et al., 2012, o colágeno já aumenta (ou é ressintetizado) na aorta de ratos 2R1C na segunda semana de hipertensão. Como o colágeno tipo I é uma proteína rígida, sua ressíntese pode aumentar a rigidez vascular. Esse aumento na rigidez arterial dos vasos sanguíneos, por sua vez, pode resultar em uma transmissão inadequada das pressões sanguíneas para as pequenas artérias periféricas e para a microcirculação, que em última análise, essa rigidez vascular excessiva contribui para a deterioração da função cardiovascular, amplificando os efeitos prejudiciais da hipertensão.(NICHOLS et al., 2008; PARK et al., 2023).

A proteólise do colágeno também é um dos principais processos que causam o remodelamento arterial hipertrófico na hipertensão. A clivagem do colágeno tipo I pode contribuir para expor sítios de ligação deste à integrina, que facilitando a ativação da FAK e aumentando a migração e proliferação celular (NEWBY; PAUSCHINGER; SPINALE, 2006). De fato, os produtos proteolíticos do colágeno aumentam a migração das células musculares lisas vasculares mediada pelo fator de crescimento derivado de plaquetas por meio da integrina $\alpha_v\beta_3$ (STRINGA et al., 2000). Além disso, a superexpressão de um inibidor da atividade de FAK em células musculares lisas vasculares de ratos inibiu a migração na presença do fator de crescimento derivado de plaquetas (TAYLOR et al., 2001). Como a MMP-2 está aumentada na aorta de ratos 2R1C e induz a proteólise do colágeno tipo I, ela pode desencadear uma via de sinalização matriz extracelular-integrina para mediar a migração e proliferação das células musculares lisas vasculares. Demonstramos que inibidores de MMPs reduziram significativamente a migração de células A7r5 na presença de colágeno e a proliferação das células musculares lisas vasculares nas aortas de ratos 2R1C, conforme observado pela marcação Ki67. Embora não tenhamos observado alterações nas integrinas α_2 , α_v e β_1 em aortas, sua atividade provavelmente estava aumentada nos animais hipertensos, já que FAK estava mais ativada.

As integrinas são receptores de adesão transmembrana para proteínas da MEC, que usam moléculas adaptadoras, como a FAK autofosforilada em Tyr 397, para transmitir sinais bioquímicos (KECHAGIA; IVASKA; ROCA-CUSACHS, 2019). Neste trabalho, inibidores de MMPs reduziram notavelmente essa forma fosforilada de FAK nas células A7r5 e na aorta de ratos hipertensos. Especulamos que esse efeito ocorreu porque os inibidores de MMPs impediram a proteólise do colágeno, contribuindo para reduzir os peptídeos contendo Arg-Gly-Asp (RGD) e a ativação de FAK, já que estes produtos de proteólise do colágeno são ligantes das integrinas. Por outro lado, a MMP-2 estimula a fosforilação de FAK e induz a expressão de colágeno de maneira dependente do tempo em fibroblastos cardíacos de ratos, efeito que é abolido por siRNA de MMP-2 e inibidores de FAK (HORI et al., 2012). Em relação à redução da integrina β_3 que observamos nas aortas de ratos 2R1C, HEERKENS et al., mostraram que, quando o receptor β_3 é inibido em artérias de resistência de ratos hipertensos, eles desenvolvem hipertrofia vascular em resposta à ativação da β_1 via FAK. Além disso, foi demonstrado que a MMP-14 participa da clivagem proteolítica da β_3 em células tumorais, contribuindo para sua ativação para modular a adesão e migração de células (YOSEF; ARKADASH; PAPO, 2018). Curiosamente, já mostramos anteriormente que as quantidades proteicas de MMP-14 estavam aumentadas na aorta de ratos 2R1C (CASTRO et al., 2010). Mostramos neste trabalho, que as concentrações proteicas de MMP-14 também estão aumentadas nas aortas dos ratos 2R1C, podendo contribuir para a redução da integrina β_3 . Por fim, existe a possibilidade de que outros receptores de adesão, como as caderinas, possam ser ativados pelas MMPs para mediar a migração das células musculares lisas vasculares em doenças cardiovasculares (BELO; GUIMARÃES; CASTRO, 2015). O receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas também pode ser ativado pelo colágeno nas células musculares lisas vasculares como alternativa para a ativação de FAK e precisa de investigação adicional (JEONG et al., 2019). Por outro lado, além da FAK, as quinases Ras/MAP e tirosina quinases Src aumentam a migração das células musculares lisas vasculares após a interação entre fatores da MEC e integrinas (HUVENEERS; DANEN, 2009).

Uma limitação deste estudo é o uso da Doxíciclina como o único inibidor de MMPs *in vivo*, já que ela pode inibir várias MMPs. No entanto, outros inibidores de MMP de administração oral, como o ONO-4817, também inibem diferentes MMPs e são definitivamente caros para uso *in vivo*. O uso de camundongos knockout para MMP-2 também é desafiador, pois os animais podem desenvolver graves defeitos vasculares, além de serem letais na fase embriológica quando a MMP-2 é deletada junto com a MMP-14 (OH et al., 2004; PAGE-MCCAIG; EWALD; WERB, 2007). Finalmente, a MMP-14 é um dos ativadores da MMP-2 na membrana plasmática das células musculares lisas vasculares, contribuindo assim para os efeitos proteolíticos da MMP-2 no colágeno da aorta de ratos 2R1C. A MMP-14 por si só também estimula a migração e proliferação das células musculares lisas vasculares em artérias de camundongos, aumentando a formação de neointima (FILIPPOV et al., 2005). Portanto, não podemos excluir a possibilidade de que a MMP-14 também contribua para a proliferação das células musculares lisas vasculares e hipertrofia aórtica em nosso estudo atual. A dose de 30 mg/kg/dia de Doxíciclina foi usada em outros estudos e melhorou o remodelamento arterial hipertrófico e eutrófico induzido pela hipertensão (BOUVET et al., 2005; CASTRO et al., 2008). Essa dose também foi escolhida porque doses mais baixas não melhoraram as alterações estruturais aórticas induzidas por hipertensão em ratos 2R1C (GUIMARAES et al., 2011).

8 Conclusão

O tratamento com Doxíciclina reduziu a atividade aumentada da MMP-2 na aorta de ratos 2R1C e ajudou a prevenir a proteólise do colágeno tipo I. Esse efeito inibitório reduziu a ativação da FAK e, conseqüentemente, a proliferação das células musculares lisas vasculares no início da hipertensão. Além disso, a inibição da MMP-2 em células A7r5 diminuiu a ativação da FAK e impediu sua migração *in vitro*. O efeito proteolítico da MMP-2 sobre o colágeno tipo I pode ser um dos pontos de partida para o desenvolvimento do remodelamento arterial hipertrófico nas fases crônicas da hipertensão.

Bibliografia

- AGBAJE, Andrew O. Arterial stiffness preceding metabolic syndrome in 3,862 adolescents: a mediation and temporal causal longitudinal birth cohort study. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [S. l.], v. 324, n. 6, p. H905–H911, 2023. a. DOI: 10.1152/AJPHEART.00126.2023/ASSET/IMAGES/LARGE/AJPHEART.00126.2023_F002.JPEG.
- AGBAJE, Andrew O. Elevated Blood Pressure and Worsening Cardiac Damage During Adolescence. **The Journal of Pediatrics**, [S. l.], v. 257, p. 113374, 2023. b. DOI: 10.1016/J.JPEDI.2023.02.018.
- ANWAR, M. A.; SHALHOUB, J.; LIM, C. S.; GOHEL, M. S.; DAVIES, A. H. The Effect of Pressure-Induced Mechanical Stretch on Vascular Wall Differential Gene Expression. **Journal of Vascular Research**, [S. l.], v. 49, n. 6, p. 463–478, 2012. DOI: 10.1159/000339151.
- BARROSO, Weimar Kunz Sebba et al. Brazilian guidelines of hypertension - 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S. l.], v. 116, n. 3, p. 516–658, 2021. DOI: 10.36660/ABC.20201238.
- BELO, V. A.; GUIMARÃES, Danielle A.; CASTRO, Michele Mazzaron. Matrix Metalloproteinase 2 as a Potential Mediator of Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Chronic Vascular Remodeling in Hypertension. **Journal of Vascular Research**, [S. l.], v. 52, n. 4, p. 221–231, 2015. DOI: 10.1159/000441621.
- BELO, Vanessa de Almeida; PARENTE, Juliana Montenegro; TANUS-SANTOS, José Eduardo; CASTRO, Michele M. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 decreases calponin-1 levels and contributes to arterial remodeling in early hypertension. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 118, p. 50–58, 2016. DOI: 10.1016/j.bcp.2016.08.012.
- BENOIT, Yannick D.; GROULX, Jean-François; GAGNÉ, David; BEAULIEU, Jean-François. RGD-Dependent Epithelial Cell-Matrix Interactions in the Human Intestinal Crypt. **Journal of Signal Transduction**, [S. l.], v. 2012, p. 1–10, 2012. DOI: 10.1155/2012/248759.
- BLASCHE DE MELLO, Marcela M.; PARENTE, Juliana M.; SCHULZ, Richard; CASTRO, Michele M. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation by oxidative stress decreases aortic calponin-1 levels during hypertrophic remodeling in early hypertension. **Vascular Pharmacology**, [S. l.], v. 116, p. 36–44, 2019. DOI: 10.1016/J.VPH.2018.10.002.
- BONNANS, Caroline; CHOU, Jonathan; WERB, Zena. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 15, n. 12, p. 786–801, 2014. DOI: 10.1038/nrm3904.
- BOUVET, Céline; GILBERT, Liz Ann; GIRARDOT, Daphné; DEBLOIS, Denis; MOREAU, Pierre. Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition. **Hypertension**, [S. l.], v. 45, n. 3, p. 432–437, 2005. DOI: 10.1161/01.HYP.0000154680.44184.01.
- CARRAGHER, Neil O.; LEVKAU, Bodo; ROSS, Russell; RAINES, Elaine W. Degraded collagen fragments promote rapid disassembly of smooth muscle

focal adhesions that correlates with cleavage of pp125(FAK), paxillin, and talin. **The Journal of cell biology**, [S. l.], v. 147, n. 3, p. 619–629, 1999. DOI: 10.1083/JCB.147.3.619.

CASTRO, Michele M.; RIZZI, Elen; FIGUEIREDO-LOPES, Lívia; FERNANDES, Karla; BENDHACK, Lusiane M.; PITOL, Dimitrius Leonardo; GERLACH, Raquel F.; TANUS-SANTOS, Jose E. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. **Atherosclerosis**, [S. l.], v. 198, n. 2, p. 320–331, 2008. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.10.011.

CASTRO, Michele M.; RIZZI, Elen; PRADO, Cibele M.; ROSSI, Marcos A.; TANUS-SANTOS, Jose E.; GERLACH, Raquel Fernanda. Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling. **Matrix Biology**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 194–201, 2010. DOI: 10.1016/J.MATBIO.2009.11.005.

CERISANO, Giampaolo et al. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor after reperfused ST-elevation myocardial infarction treated with doxycycline. Insights from the TIPTOP trial. **International Journal of Cardiology**, [S. l.], v. 197, p. 147–153, 2015. DOI: 10.1016/J.IJCARD.2015.06.024.

CERON, Carla S.; RIZZI, Elen; GUIMARAES, Danielle A.; MARTINS-OLIVEIRA, Alisson; CAU, Stefany B.; RAMOS, Junia; GERLACH, Raquel F.; TANUS-SANTOS, Jose E. Time course involvement of matrix metalloproteinases in the vascular alterations of renovascular hypertension. **Matrix Biology**, [S. l.], v. 31, n. 4, p. 261–270, 2012. DOI: 10.1016/J.MATBIO.2012.01.009.

CHESLER, Naomi C.; KU, David N.; GALIS, Zorina S. Transmural pressure induces matrix-degrading activity in porcine arteries ex vivo. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, [S. l.], v. 277, n. 5, p. H2002–H2009, 1999. DOI: 10.1152/ajpheart.1999.277.5.H2002.

EGEBLAD, Mikala; RASCH, Morten G.; WEAVER, Valerie M. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. **Current Opinion in Cell Biology**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 697–706, 2010. DOI: 10.1016/j.ceb.2010.08.015.

FILIPPOV, Sergey et al. MT1-matrix metalloproteinase directs arterial wall invasion and neointima formation by vascular smooth muscle cells. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 202, n. 5, p. 663–671, 2005. DOI: 10.1084/JEM.20050607.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 123, n. 24, p. 4195–4200, 2010. DOI: 10.1242/jcs.023820.

GALIS, Zorina S.; KHATRI, Jaikirshan J. **Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: The good, the bad, and the ugly.** **Circulation Research** Lippincott Williams & Wilkins, , 2002. DOI: 10.1161/res.90.3.251.

GOLDBLATT, HARRY. Experimental Renal Hypertension. **Circulation**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 642–647, 1958. DOI: 10.1161/01.CIR.17.4.642. 2019.

GRAF, Kristof; NEUSS, Michael; STAWOWY, Philipp; HSUEH, Willa A.; FLECK, Eckart; LAW, Ronald E. Angiotensin II and $\alpha_v\beta_3$ Integrin Expression in

- Rat Neonatal Cardiac Fibroblasts. **Hypertension**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 978–984, 2000. DOI: 10.1161/01.HYP.35.4.978.
- GUIMARAES, Danielle A.; RIZZI, Elen; CERON, Carla S.; OLIVEIRA, Alisson M.; OLIVEIRA, Diogo M.; CASTRO, Michele M.; TIRAPELLI, Carlos R.; GERLACH, Raquel F.; TANUS-SANTOS, Jose E. Doxycycline Dose-dependently Inhibits MMP-2-Mediated Vascular Changes in 2K1C Hypertension. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [S. l.], v. 108, n. 5, p. 318–325, 2011. DOI: 10.1111/J.1742-7843.2010.00656.X.
- HEERKENS, Egidius H. J.; IZZARD, Ashley S.; HEAGERTY, Anthony M. Integrins, Vascular Remodeling, and Hypertension. **Hypertension**, [S. l.], v. 49, n. 1, p. 1–4, 2007. DOI: 10.1161/01.HYP.0000252753.63224.3b.
- HEERKENS, Egidius H. J.; QUINN, Lisa; WITHERS, Sarah B.; HEAGERTY, Anthony M. β Integrins mediate FAK Y397 autophosphorylation of resistance arteries during eutrophic inward remodeling in hypertension. **Journal of vascular research**, [S. l.], v. 51, n. 4, p. 305–314, 2014. DOI: 10.1159/000365479..
- HOOD, John D.; CHERESH, David A. Role of integrins in cell invasion and migration. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 91–100, 2002. DOI: 10.1038/nrc727..
- HORI, Yasutomo et al. Matrix metalloproteinase-2 stimulates collagen-I expression through phosphorylation of focal adhesion kinase in rat cardiac fibroblasts. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, [S. l.], v. 303, n. 9, p. 947–953, 2012. DOI: 10.1152/AJPCCELL.00401.2011/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH00211270780008.JPEG.
- HULMES, David J. S. Building Collagen Molecules, Fibrils, and Suprafibrillar Structures. **Journal of Structural Biology**, [S. l.], v. 137, n. 1–2, p. 2–10, 2002. DOI: 10.1006/JSBI.2002.4450.
- HUMPHREY, Jay D. Mechanisms of Vascular Remodeling in Hypertension. **American Journal of Hypertension**, [S. l.], v. 34, n. 5, p. 432–441, 2021. DOI: 10.1093/AJH/HPAA195.
- HUMPHREY, Jay D.; DUFRESNE, Eric R.; SCHWARTZ, Martin A. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 15, n. 12, p. 802–812, 2014. DOI: 10.1038/nrm3896.
- HUVENEERS, Stephan; DANEN, Erik H. J. Adhesion signaling - Crosstalk between integrins, Src and Rho. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 122, n. 8, p. 1059–1069, 2009. DOI: 10.1242/JCS.039446.
- JEONG, Kyuho et al. Nuclear Focal Adhesion Kinase Controls Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Neointimal Hyperplasia Through GATA4-Mediated Cyclin D1 Transcription. **Circulation Research**, [S. l.], v. 125, n. 2, p. 152–166, 2019. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.314344.
- JEONG, Kyuho et al. Fak activation promotes smc dedifferentiation via increased dna methylation in contractile genes. **Circulation Research**, [S. l.], v. 129, n. 12, p. E215–E233, 2021. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.319066.

JIA, Nan; OKAMOTO, Hiroshi; SHIMIZU, Toshihiro; CHIBA, Satoru; MATSUI, Yutaka; SUGAWARA, Takeshi; AKINO, Masatoshi; KITABATAKE, Akira. A Newly Developed Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonist, CS866, Promotes Regression of Cardiac Hypertrophy by Reducing Integrin β 1 Expression. **Hypertension Research**, [S. l.], v. 26, n. 9, p. 737–742, 2003. DOI: 10.1291/HYPRES.26.737.

JONKMAN, James E. N.; CATHCART, Judith A.; XU, Feng; BARTOLINI, Miria E.; AMON, Jennifer E.; STEVENS, Katarzyna M.; COLARUSSO, Pina. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. **Cell Adhesion & Migration**, [S. l.], v. 8, n. 5, p. 440–451, 2014. DOI: 10.4161/CAM.36224.

KAWANO, H.; CODY, R. J.; GRAF, K.; GOETZE, S.; KAWANO, Y.; SCHNEE, J.; LAW, R. E.; HSUEH, W. A. Angiotensin II enhances integrin and alpha-actinin expression in adult rat cardiac fibroblasts. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, [S. l.], v. 35, n. 1 Pt 2, p. 273–9, 2000.

KECHAGIA, Jenny Z.; IVASKA, Johanna; ROCA-CUSACHS, Pere. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 20, n. 8, p. 457–473, 2019. DOI: 10.1038/S41580-019-0134-2.

KORSHUNOV, Vyacheslav A.; SCHWARTZ, Stephen M.; BERK, Bradford C. Vascular Remodeling. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [S. l.], v. 27, n. 8, p. 1722–1728, 2007. DOI: 10.1161/ATVBAHA.106.129254.

LEITINGER, Birgit. Transmembrane Collagen Receptors. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 265–290, 2011. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154013.

LENNON, Frances E. et al. Unique fractal evaluation and therapeutic implications of mitochondrial morphology in malignant mesothelioma. **Scientific Reports 2016 6:1**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1–15, 2016. DOI: 10.1038/srep24578.

LI, Ruoshui; FRANGOGIANNIS, Nikolaos G. Integrins in cardiac fibrosis. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, [S. l.], v. 172, p. 1–13, 2022. DOI: 10.1016/J.YJMCC.2022.07.006.

LIM, Ssang-Taek et al. Nuclear FAK Promotes Cell Proliferation and Survival through FERM-Enhanced p53 Degradation. **Molecular Cell**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 9–22, 2008. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.11.031.

MARTINEZ-LEMUS, Luis A.; ZHAO, Guiling; GALIÑANES, Edgar L.; BOONE, Matthew. Inward remodeling of resistance arteries requires reactive oxygen species-dependent activation of matrix metalloproteinases. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [S. l.], v. 300, n. 6, p. 2005–2015, 2011. DOI: 10.1152/AJPHEART.01066.2010/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH40061199020005.JPEG.

MATSUBARA, Hiroaki. Pathophysiological Role of Angiotensin II Type 2 Receptor in Cardiovascular and Renal Diseases. **Circulation Research**, [S. l.], v. 83, n. 12, p. 1182–1191, 1998. DOI: 10.1161/01.RES.83.12.1182.

MAYET, Jamil; HUGHES, Alun. Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. **Heart (British Cardiac Society)**, [S. l.], v. 89, n. 9, p. 1104–9,

2003. DOI: 10.1136/heart.89.9.1104..

MESSENT, Anthea J.; TUCKWELL, Danny S.; KNÄUPER, Vera; HUMPHRIES, Martin J.; MURPHY, Gillian; GAVRILOVIC, Jelena. Effects of collagenase-cleavage of type I collagen on alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 111, n. 8, p. 1127–1135, 1998. DOI: 10.1242/JCS.111.8.1127.

NEWBY, Andrew C.; PAUSCHINGER, Matthias; SPINALE, Francis G. From tadpole tails to transgenic mice: Metalloproteinases have brought about a metamorphosis in our understanding of cardiovascular disease. **Cardiovascular Research**, [S. l.], v. 69, n. 3, p. 559–561, 2006. DOI: 10.1016/J.CARDIORES.2005.12.011.

NICHOLS, Wilmer W.; DENARDO, Scott J.; WILKINSON, Ian B.; MCENIERY, Carmel M.; COCKCROFT, John; O'ROURKE, Michael F. Effects of Arterial Stiffness, Pulse Wave Velocity, and Wave Reflections on the Central Aortic Pressure Waveform. **The Journal of Clinical Hypertension**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 295–303, 2008. DOI: 10.1111/J.1751-7176.2008.04746.X.

OH, Junseo et al. Mutations in two matrix metalloproteinase genes, MMP-2 and MT1-MMP, are synthetic lethal in mice. **Oncogene**, [S. l.], v. 23, n. 29, p. 5041–5048, 2004. DOI: 10.1038/SJ.ONC.1207688.

PAGE-MCCAWE, Andrea; EWALD, Andrew J.; WERB, Zena. **Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling**. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** Nature Publishing Group, , 2007. DOI: 10.1038/nrm2125.

PANG, Xiaocong et al. Targeting integrin pathways: mechanisms and advances in therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy** 2022 8:1, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–42, 2023. DOI: 10.1038/s41392-022-01259-6..

PARENTE, Juliana Montenegro et al. MMP inhibition attenuates hypertensive eccentric cardiac hypertrophy and dysfunction by preserving troponin I and dystrophin. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 193, p. 114744, 2021. DOI: 10.1016/J.BCP.2021.114744.

PARK, Sungho; KWON, Minseong; NAM, Hyojin; HUH, Hyungkyu. Interpolation time-optimized aortic pulse wave velocity estimation by 4D flow MRI. **Scientific Reports** 2023 13:1, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 1–11, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-43799-z.

PFISTERER, Larissa; FELDNER, Anja; HECKER, Markus; KORFF, Thomas. Hypertension impairs myocardin function: a novel mechanism facilitating arterial remodelling. **Cardiovascular Research**, [S. l.], v. 96, n. 1, p. 120–129, 2012. DOI: 10.1093/CVR/CVS247.

PIRES, Paulo W.; ROGERS, Curt T.; MCCLAIN, Jonathon L.; GARVER, Hannah S.; FINK, Gregory D.; DORRANCE, Anne M. Doxycycline, a matrix metalloprotease inhibitor, reduces vascular remodeling and damage after cerebral ischemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [S. l.], v. 301, n. 1, 2011. DOI: 10.1152/AJPHEART.01206.2010.

RENNA, Nicolás F.; DE LAS HERAS, Natalia; MIATELLO, Roberto M. Pathophysiology of Vascular Remodeling in Hypertension. **International**

Journal of Hypertension, [S. l.], v. 2013, p. 1–7, 2013. DOI: 10.1155/2013/808353.

RIBEIRO VITORINO, Thaís; FERRAZ DO PRADO, Alejandro; BRUNO DE ASSIS CAU, Stefany; RIZZI, Elen. MMP-2 and its implications on cardiac function and structure: Interplay with inflammation in hypertension.

Biochemical Pharmacology, [S. l.], v. 215, p. 115684, 2023. DOI: 10.1016/J.BCP.2023.115684.

ROSS, R. S.; BORG, T. K. Integrins and the myocardium. **Circulation research**, [S. l.], v. 88, n. 11, p. 1112–9, 2001.

SCHAFFNER, P.; DARD, M. M. Structure and function of RGD peptides involved in bone biology. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, [S. l.], v. 60, n. 1, p. 119–32, 2003.

SIMÕES, Gonçalo; PEREIRA, Telmo; CASEIRO, Armando. Matrix metalloproteinases in vascular pathology. **Microvascular Research**, [S. l.], v. 143, p. 104398, 2022. DOI: 10.1016/J.MVR.2022.104398.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. 7ª DIRETRIZ BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. *In*: 2016, **Anais [...]**. [s.l.: s.n.] DOI: 10.5935/abc.20160151.

SRICHAJ, Manakan Betsy; ZENT, Roy; MANAKAN BETSY SRICHAJ AND ROY ZENT. Integrin Structure and Function. . 2010, p. 19–41.

STRINGA, Emanuela; KNÄUPER, Vera; MURPHY, Gillian; GAVRILOVIC, Jelena. Collagen degradation and platelet-derived growth factor stimulate the migration of vascular smooth muscle cells. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 113, n. 11, p. 2055–2064, 2000. DOI: 10.1242/JCS.113.11.2055.

TAYLOR, Joan M.; MACK, Christopher P.; NOLAN, Kate; REGAN, Christopher P.; OWENS, Gary K.; PARSONS, J. Thomas. Selective Expression of an Endogenous Inhibitor of FAK Regulates Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. **Molecular and Cellular Biology**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. 1565–1572, 2001. DOI: 10.1128/MCB.21.5.1565-1572.2001.

UNGER, Thomas. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. **The American Journal of Cardiology**, [S. l.], v. 89, n. 2, p. 3–9, 2002. DOI: 10.1016/S0002-9149(01)02321-9.

WANG, Xi; KHALIL, Raouf A. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *In*: **Advances in Pharmacology**. [s.l.] : Academic Press Inc., 2018. v. 81p. 241–330. DOI: 10.1016/bs.apha.2017.08.002.

YOSEF, Gal; ARKADASH, Valeria; PAPO, Niv. Targeting the MMP-14/MMP-2/integrin v3 axis with multispecific N-TIMP2– based antagonists for cancer therapy. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 293, n. 34, p. 13310–13326, 2018. DOI: 10.1074/JBC.RA118.004406/ATTACHMENT/EA3C9D30-0A6E-4D56-B052-6B5E745CB6FF/MMC1.PDF.

ZHAO, Huijun; POND, Gregory; SIMOS, Demetrios; WANG, Zhou; ROBERTSON, Susan; SINGH, Gurmit; VANDERMEER, Lisa; CLEMONS, Mark; ADDISON, Christina Lynn. Doxycycline-Induced Changes in Circulating MMP or TIMP2 Levels Are Not Associated with Skeletal-Related Event-Free or Overall Survival in Patients with Bone Metastases from Breast Cancer.

Cancers 2023, Vol. 15, Page 571, [S. I.], v. 15, n. 3, p. 571, 2023. DOI: 10.3390/CANCERS15030571.

ZHAO, Ji-He; REISKE, Heinz; GUAN, Jun-Lin. Regulation of the Cell Cycle by Focal Adhesion Kinase. **The Journal of Cell Biology**, [S. I.], v. 143, n. 7, p. 1997–2008, 1998. DOI: 10.1083/jcb.143.7.1997..

ZUREK, Michelle; AAVIK, Einari; MALLICK, Rahul; YLÄ-HERTTUALA, Seppo. Epigenetic Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype Switching in Atherosclerotic Artery Remodeling: A Mini-Review. **Frontiers in Genetics**, [S. I.], v. 12, p. 719456, 2021. DOI: 10.3389/FGENE.2021.719456/BIBTEX.



Contents lists available at ScienceDirect

Vascular Pharmacology

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

Type I collagen proteolysis by matrix metalloproteinase-2 contributes to focal adhesion kinase activation and vascular smooth muscle cell proliferation in the aorta in early hypertension

Viviano Gomes de Oliveira Neves^a, Marcela M. Blascke de Mello^a, Daniel Rodrigues^a, Laena Pernomian^a, Isadora Sousa de Oliveira^b, Juliana M. Parente^a, Eliane Candiani Arantes^b, Rita C. Tostes^a, Michele M. Castro^{a,*}

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

^b Department of Biomolecular Sciences, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Matrix metalloproteinase-2
Collagen
Vascular smooth muscle cells
Focal adhesion kinase

ABSTRACT

Introduction: Increased matrix metalloproteinase (MMP)-2 activity contributes to increase vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation in the aorta in early hypertension by cleaving many proteins of the extracellular matrix. Cleaved products from type I collagen may activate focal adhesion kinases (FAK) that trigger migration and proliferation signals in VSMC. We therefore hypothesized that increased activity of MMP-2 proteolyzes type I collagen in aortas of hypertensive rats, and thereby, induces FAK activation, thus leading to increased VSMC proliferation and hypertrophic remodeling in early hypertension.

Methods: Male Sprague-Dawley rats were submitted to renovascular hypertension by the two kidney-one clip (2K1C) model and treated with doxycycline (30 mg/kg/day) by gavage from the third to seventh-day post-surgery. Controls were submitted to sham surgery. Systolic blood pressure (SBP) was measured daily by tail-cuff plethysmography and the aortas were processed for zymography and Western blot for MMP-2, pFAK/FAK, integrins and type I collagen. Mass spectrometry, morphological analysis and Ki67 immunofluorescence were also done to identify collagen changes and VSMC proliferation. A715 cells were stimulated with collagen and treated with the MMP inhibitors (doxycycline or ARP-100), and with the FAK inhibitor PND1186 for 24 h. Cells were lysed and evaluated by Western blot for pFAK/FAK.

Results: 2K1C rats developed elevated SBP in the first week as well as increased expression and activity of MMP-2 in the aorta ($p < 0.05$ vs. Sham). Treatment with doxycycline reduced both MMP activity and type I collagen proteolysis in aortas of 2K1C rats ($p < 0.05$). Increased pFAK/FAK and increased VSMC proliferation ($p < 0.05$ vs. Sham groups) were also seen in the aortas of 2K1C and doxycycline decreased both parameters ($p < 0.05$). Higher proliferation of VSMC contributed to hypertrophic remodeling as seen by increased media/lumen ratio and cross sectional area ($p < 0.05$ vs Sham groups). In cell culture, MMP-2 cleaves collagen, an effect reversed by MMP inhibitors ($p < 0.05$). Increased levels of pFAK/FAK were observed when collagen was added in the culture medium ($p < 0.05$ vs control) and MMP and FAK inhibitors reduced this effect.

Conclusions: Increase in MMP-2 activity proteolyzes type I collagen in the aortas of 2K1C rats and contributes to activate FAK and induces VSMC proliferation during the initial phase of hypertension.

1. Introduction

Arterial stiffening is a predictive stimulus that contributes to hypertension. The stiffening of the conductance arteries leads to impaired distensibility causing alterations in shear stress, thus contributing to

endothelial dysfunction, hypertrophic remodeling and hypertension [1]. Increased aortic pulse wave velocity is increased in obesity and precedes hypertension [2] in addition to predicting mortality in hypertensive and diabetics patients [3]. Type I collagen is the most abundant structural protein present in the arterial extracellular matrix, where it maintains

* Corresponding author.

E-mail address: castro@fmrp.usp.br (M.M. Castro).

<https://doi.org/10.1016/j.vph.2023.107211>

Received 30 May 2023; Received in revised form 27 July 2023; Accepted 18 August 2023

Available online 20 August 2023

1537-1891/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

integrity and contributes to cell signaling and adhesion [4]. When it accumulates, collagen causes rigidity in the arteries and contributes to the development of systolic hypertension. The proteolysis of collagen is also one of the main processes that causes hypertrophic arterial remodeling in hypertension as its products interact with integrins to cause vascular smooth muscle cell (VSMC) migration and proliferation [5]. Integrins activate signaling pathways that include the phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK), which triggers cell cycle regulation and proliferation [6,7]. Cleavage of type I collagen exposes cryptic integrin binding sites such as $\alpha_v\beta_3$, and facilitates the activation of FAK and VSMC migration and proliferation [8].

Matrix metalloproteinases (MMPs) are zinc-dependent endopeptidases that cause extra- and intracellular remodeling. Increased MMP-2 activity notably contributes to proteolyze type I collagen in the extracellular matrix and causes hypertrophic vascular remodeling and stiffness in different models of hypertension [5,9–11]. Furthermore, MMP-2 also triggers VSMC migration and proliferation in cardiovascular diseases. In fact, either MMP inhibitors or MMP-2 knockout mice showed lower VSMC migration and reduced intima formation in injury models of carotid ligation [12,13]. Knocking down MMP-2 or inhibiting its activity prevented histone H3 cleavage, thus reducing cell proliferation [14]. Although the proteolysis of collagen contributes to the exposure of new integrin-binding sites in VSMC, there is no evidence that this effect is caused by MMP-2 and, then, increases FAK activation and hypertrophic remodeling in hypertension. We studied whether increased MMP-2 activity proteolyzes type I collagen in the aorta in early hypertension and increases FAK levels and VSMC proliferation to result in hypertrophic remodeling. We tested whether inhibiting MMPs excess is a critical mechanism to stop vascular changes of hypertension.

2. Results

2.1. MMP-2 activity contributes to proteolyze aortic type I collagen in early hypertension

Rats were studied at one week of hypertension as the objective was to analyze whether proteolytic MMP-2 effects on collagen is an initial point to stimulate hypertrophic arterial remodeling. SBP was markedly increased with seven days of hypertension ($*p < 0.05$ vs. Sham and Dox), although treatment with doxycycline did not decrease it at this point (Fig. 1). Body weight was slightly lower in the 2K1C rats treated with doxycycline (Table; $*p < 0.05$ vs. Sham). Aortas from 2K1C rats showed a significant increase in the activity of 72 and 64 kDa MMP-2 when compared to Sham rats ($*p < 0.05$, Fig. 2A), whereas no bands

corresponding to MMP-9 were seen in gelatin zymography. During the electrophoresis procedure in the gelatin zymography, the MMP inhibitor may detach from the catalytic domain of MMP-2, which may mask its potential inhibitory effect. Because of this limitation, in situ zymography was also performed in the aortas. Increased gelatinase activity was seen in the medial layer of aorta from 2K1C rats ($*p < 0.05$ vs. Sham and Dox) and doxycycline notably decreased it ($*p < 0.05$, Fig. 2B). Moreover, protein levels of 72 kDa MMP-2 were also reduced by doxycycline in the aorta from 2K1C rats ($*p < 0.05$; Fig. 2C).

Collagen is one of the most likely targets of MMPs in the extracellular matrix in cardiovascular or metabolic diseases. In addition to conferring arterial rigidity, its proteolytic products may stimulate VSMC migration and proliferation, which then would lead to hypertrophic arterial remodeling [5,8]. Examination of aorta from 2K1C rats by Western blot showed a significant reduction in 130 kDa type I collagen when compared to Sham ($*p < 0.05$, Fig. 3A). Treatment with doxycycline prevented this proteolytic loss in the aortas of hypertensive rats ($*p < 0.05$). In fact, mass spectrometry confirmed that the 130 kDa bands contained type I collagen (Supplemental Fig. 1A). The small coverage seen for type I collagen is consistent with the extraction protocol and the low proportion of total amount of protein present in the SDS-PAGE gel. Finally, the hydroxyproline assay showed that the proteolytic products of collagen were higher in the aortas from 2K1C rats ($*p < 0.05$ vs. Sham and Dox) and doxycycline prevented this increase ($*p < 0.05$, Fig. 3B). When total collagen was analyzed by picrosirius red in the aortic media layer, it was apparently increased in the 2K1C ($p = 0.058$ vs. Sham and Dox; Fig. 3C). However, it is important to note that picrosirius red stains all forms of collagen, including its proteolytic products.

2.2. Proteolysis of collagen contributes to FAK activation, VSMC proliferation and aortic hypertrophy in early hypertension

Cleavage of type I collagen exposes cryptic integrin binding sites that contribute to FAK activation and increased cell proliferation in diseases [8]. We observed an increase in the phosphorylated form of FAK in the aorta of 2K1C rats ($*p < 0.05$ vs. Sham and Dox; Fig. 5A) and doxycycline notably reduced it ($*p < 0.05$ vs. 2K1C). The protein levels of α_2 , α_v and β_1 integrins did not change in the aorta; however, a reduction in β_3 levels was observed in the aorta of 2K1C rats ($*p < 0.05$ vs. Sham and Dox; Fig. 4). Despite this, their activity was probably increased as FAK was more activated in the vasculature of 2K1C rats (Fig. 5A). Furthermore, we also observed a significant increase in VSMC proliferation in the aorta of 2K1C rats as determined by Ki67 nuclei staining ($*p < 0.05$ vs. Sham and Dox; Fig. 5B). Doxycycline prevented VSMC proliferation

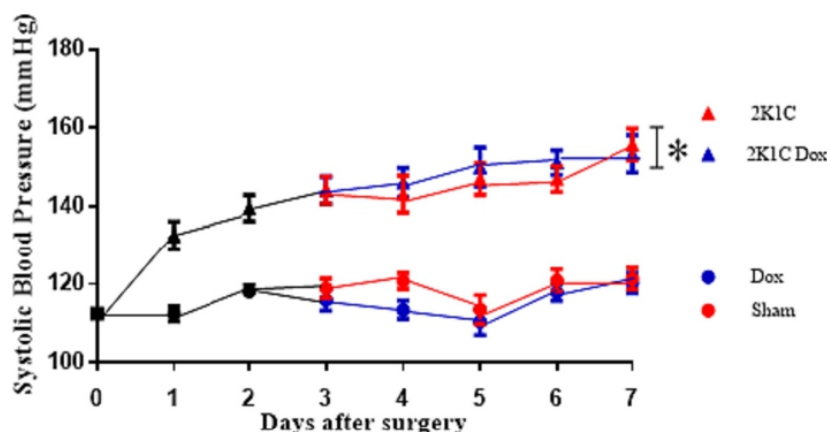


Fig. 1. Systolic blood pressure after tail-cuff plethysmography throughout seven days of 2K1C hypertension. Data are shown as means \pm SEM $*p < 0.05$ vs. Sham and Dox ($n = 12$). The black lines in the graphs represent rats before starting the treatment with doxycycline at third day post-surgery (Sham, $n = 24$; 2K1C, $n = 24$). Dox: doxycycline.

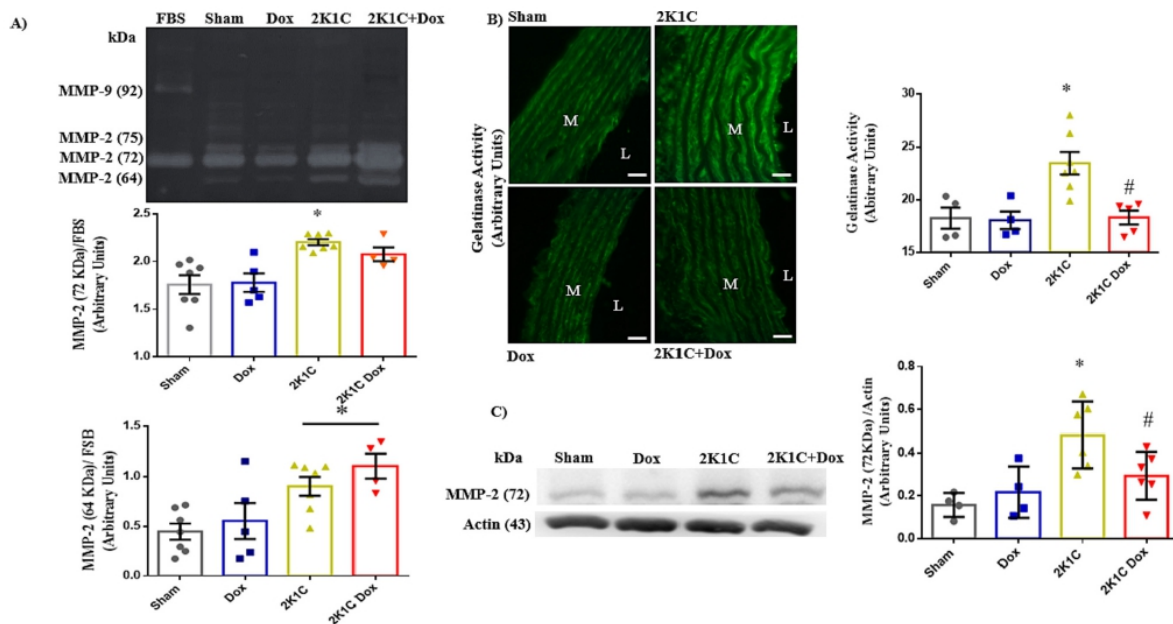


Fig. 2. Doxycycline decreases the heightened MMP-2 activity in aorta from 2K1C rats. A) Representative gelatin zymogram of aorta from hypertensive rats. The graphs represent the quantification of the 72 and 64 kDa MMP-2 activities in the aortic homogenates. Data are shown as means \pm SEM ($n = 4-7$); $*p < 0.05$ vs. Sham and Dox. FBS: Fetal Bovine Serum; Dox: doxycycline. B) Representative micrographs of gelatinolytic activity in the aorta of hypertensive rats by in situ zymography (400 \times). Data are shown as means \pm SEM ($n = 4-7$); $*p < 0.05$ vs. Sham and Dox and $*p < 0.05$ vs. 2K1C. M: media; L: lumen. Bars are 20 μ m. Dox: doxycycline; C) Representative Western blots of the 72 kDa MMP-2 and 43 kDa actin (as loading control) in rat aortas. Data are shown as means \pm SEM ($n = 4-6$); $*p < 0.05$ vs. Sham and Dox; $#p < 0.05$ vs. 2K1C.

in the aorta ($*p < 0.05$ vs 2K1C). As a result, hypertrophic arterial remodeling (identified by increased CSA and M/L) is observed in the aortas of 2K1C rats ($*p < 0.05$ vs. Sham and Dox; Fig. 5C). We previously showed that daily treatment with doxycycline for eight weeks notably decreased the increased activity of MMP-2 and aortic hypertrophic remodeling in 2K1C rats [11].

To certify that FAK is one of the key signaling pathways that contributes to VSMC migration after collagen proteolysis, we next inhibited its activity in vitro. Supplemental Fig. 2A shows that when culture medium is incubated with type I collagen in A715 cells, the level of 130 kDa type I collagen was reduced when compared to medium and collagen in the presence of the MMP inhibitors ARP-100 or doxycycline ($*p < 0.05$). To show that MMP-2 is in fact present in the medium, gelatin zymography was performed. The activity of 72 kDa MMP-2 was seen and this effect was decreased by ARP-100 ($*p < 0.05$; Supplemental Fig. 2B). We observed a significant increase in the protein level of pFAK in cells when collagen was added in the culture medium ($*p < 0.05$), an effect that was reversed by either MMP or FAK inhibitors ($*p < 0.05$; Fig. 6A). Increased pFAK usually contributes to VSMC migration in injured blood vessels. At 24 h after scratching A715 cells, there was a large increase in their migration when collagen was added in the culture medium ($*p < 0.05$ vs. control, $\Delta = 24$ h; Fig. 6B). MMP and FAK inhibitors prevented VSMC migration in the presence of type I collagen at 24 h ($#p < 0.05$).

3. Discussion

We showed here that MMP-2 activity is increased at the beginning of hypertension and contributes to proteolyze type I collagen in the aorta, an effect that stimulated FAK activation and VSMC proliferation. These mechanisms contribute to the development of hypertensive hypertrophic arterial remodeling, which is a predictive factor to cause other vascular diseases. An adequate pharmacological treatment capable of preventing the progression of these maladaptive elements of

hypertension is required. The novelty we found here is that MMPs are the proteases which trigger collagen proteolysis which then stimulates FAK signaling to contribute to VSMC proliferation at the beginning of renovascular hypertension.

Hypertrophic remodeling is a maladaptive response to hypertension to compensate for the higher tensile stress formed in the conductance arteries. It is usually described as an increase in the arterial cross sectional area and media to lumen, with an increase in the extracellular matrix components such as type I collagen. Furthermore, the VSMC proliferate and migrate from the medial to luminal areas, thus contributing to hypertrophic arterial wall [5,18]. Increased MMP-2 activity increases both VSMC migration and proliferation in hypertension [15,19]. Our group showed that MMP-2 proteolyzed calponin-1 and stimulated VSMC proliferation in aortas of 2K1C Wistar rats during the first week of hypertension, effects that preceded the hypertrophic remodeling [15]. Here we see that MMP-2 activity is increased in the aorta of hypertensive rats in the first week and doxycycline decreased it. Treatment with doxycycline reduced the accentuated VSMC proliferation in the aorta of hypertensive rats. This effect may contribute to the ability of doxycycline to reduce hypertrophic remodeling in late phases of hypertension [11,20]. As doxycycline showed a trend to reduce increased arterial cross sectional area in early hypertension, the activation of other mechanisms beyond MMP-2 which contribute to arterial hypertrophy needs to be addressed.

To stimulate VSMC migration or proliferation, MMP-2 also needs to proteolyze some components of the extracellular matrix in order to make space for cells to move. Type I collagen is profuse in the aortic media and one of the main targets of MMP-2. In fact, use of MMP inhibitors in animal models of hypertension showed the ability of MMP-2 to degrade collagen in the vasculature, thus contributing to hypertrophic remodeling [11,21,22]. In this study doxycycline prevented the loss of type I collagen in hypertensive aortas in addition to reducing the formation of its proteolytic products, thus showing the effects of MMP-2 at early stages of hypertension. Similar findings were observed with A715

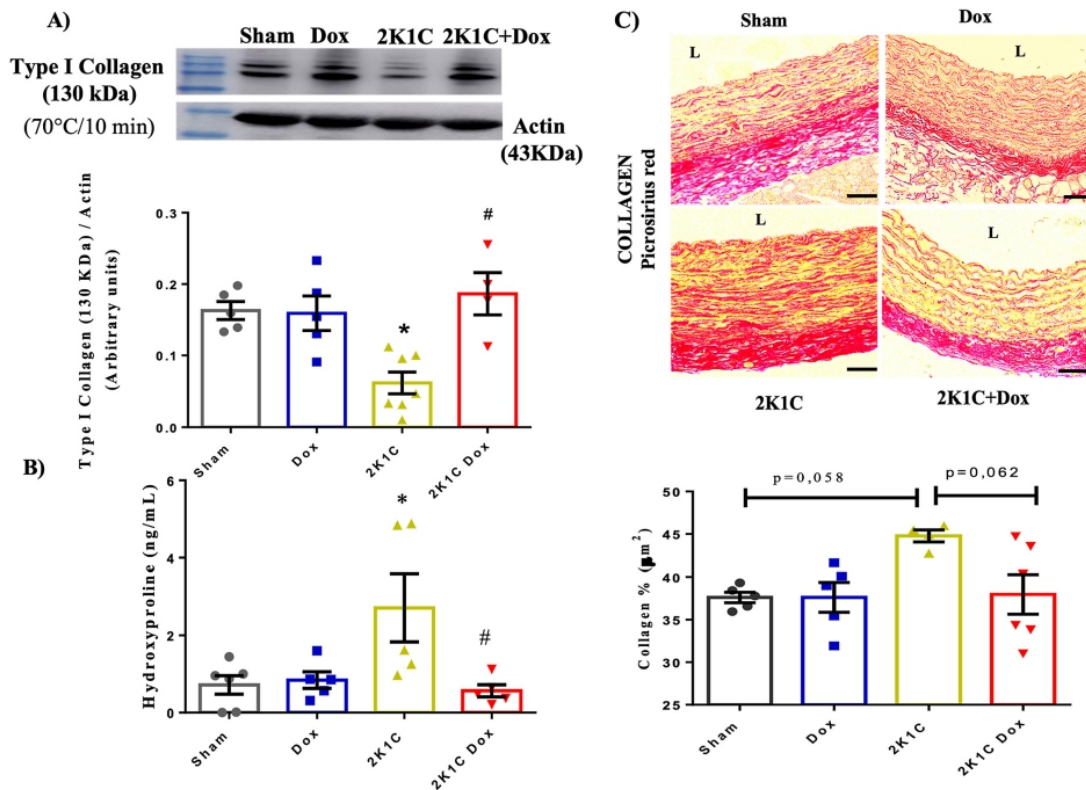


Fig. 3. MMP inhibition by doxycycline prevents loss of type I collagen in aortas from 2K1C rats. A) Representative Western blot of 130 kDa type I collagen in the aorta and its respective quantification (n = 4-7). Data are shown as the means ± SEM; *p < 0.05 vs. Sham and #p < 0.05 vs. 2K1C. B) Graph shows the quantification of hydroxyproline levels in ng/ml in rat aorta. Data are shown as the means ± SEM (n = 4-6). *p < 0.05 vs Sham and Dox and #p < 0.05 vs. 2K1C. Dox: doxycycline; C) Representative images of rat aortas stained with picrosirius red (400×). The graph shows the quantification of total collagen (red staining) in the medial layer of aorta. Data are shown as the means ± SEM (n = 4-6). M: media; L: lumen. Bars are 50 µm. Dox: doxycycline. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

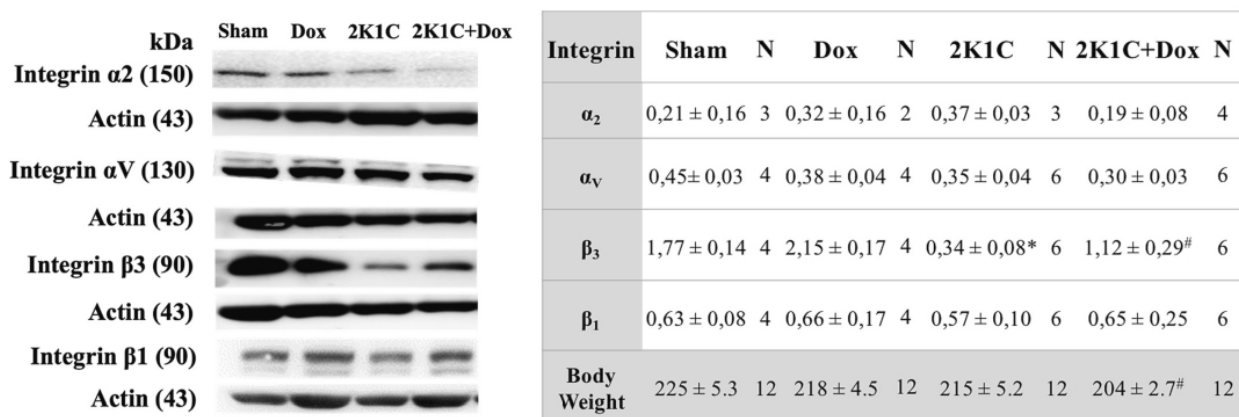


Fig. 4. Quantification of protein levels of α₂, α_V, β₁ and β₃ integrins in rat aorta by Western Blot. Data are shown as the means ± SEM. *p < 0.05 vs. Sham and #p < 0.05 vs 2K1C. Bottom row represents the body weight of rats from all experimental groups. #p < 0.05 vs. Sham group.

cells, where ARP-100 was able to preserve the levels of exogenous collagen in the conditioned medium. We then considered that this mechanism is one of the starting triggers of VSMC proliferation and migration, which may be followed by collagen resynthesis to keep aortic structure in chronic hypertension. According to Ceron et al [23], collagen was already increased (or resynthesized) in aorta of 2K1C rat at

the second week of hypertension. As collagen is a stiffer protein, its resynthesis should enhance vascular rigidity.

Collagen proteolysis is also one of the main processes that causes hypertrophic arterial remodeling in hypertension. Cleavage of type I collagen may contribute to expose cryptic integrin binding sites that facilitate FAK activation and increase VSMC migration and proliferation

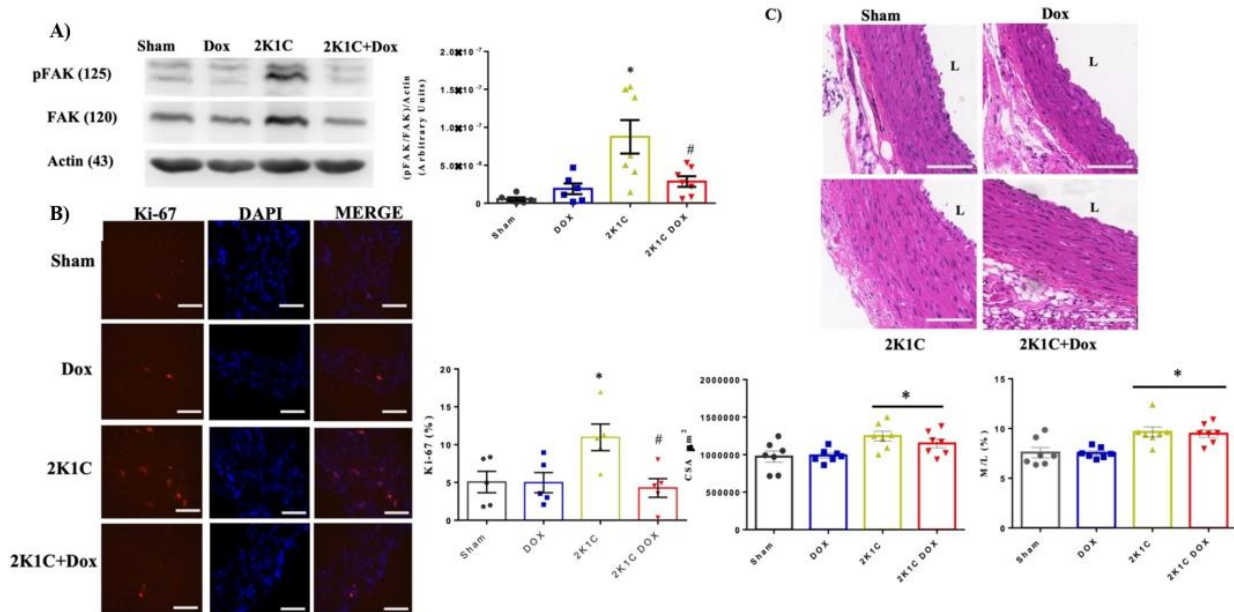


Fig. 5. MMP inhibition by doxycycline prevents FAK activation and VSMC proliferation in aorta from 2K1C rats. A) Representative Western blot of 125 kDa pFAK/FAK with 43 kDa actin as loading control in aorta from the experimental groups. Graphs show the quantification of pFAK/FAK/actin. Data are shown as the means \pm SEM ($n = 6-7$). * $p < 0.05$ vs. Sham and Dox; # $p < 0.05$ vs 2K1C. Dox: doxycycline; B) Photographs of aortas stained with Ki-67 immunofluorescence (400 \times). Graphs show the quantification of Ki-67 in the aorta. Values were obtained after quantifying the purple fluorescence from merged images (Ki-67 plus DAPI). Data are shown as the means \pm SEM ($n = 5$). * $p < 0.05$ vs. Sham and Dox; # $p < 0.05$ vs 2K1C. Bars are 20 μm . C) Representative images of rat aorta stained with hematoxylin and eosin. Graphs show the quantification of the aortic structural parameters as follows: cross sectional area (CSA), in μm^2 , and media per lumen ratio (M/L), in percentage. Data are shown as the means \pm SEM ($n = 7$). * $p < 0.05$ vs. Sham groups. M: media; L: lumen. Bars are 200 μm . Dox: doxycycline. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

[8]. In fact, the proteolytic products of collagen increase platelet-derived growth factor-mediated VSMC migration by $\alpha_v\beta_3$ integrin [24]. Moreover, overexpression of an inhibitor of FAK activity in cultured rat VSMC inhibited their migration in the presence of platelet-derived growth factor [25]. As MMP-2 is increased in the aorta of 2K1C rats and proteolyzes type I collagen, it may trigger an extracellular matrix-integrin pathway to mediate VSMC migration and proliferation. We showed that MMP inhibitors significantly reduced the migration of A7r5 cells in the presence of collagen and VSMC proliferation in 2K1C rats as seen by Ki-67 staining. Although we did not see any alterations in aortic α_2 , α_v and β_1 integrins, their activity was probably increased as FAK was more activated in 2K1C rats. Integrins are transmembrane adhesion receptors for extracellular matrix proteins, that use adaptor molecules, such as auto-phosphorylated FAK at Tyr 397, to transduce biochemical signals [26]. Here, the MMP inhibitors notably decreased this phosphorylated form of FAK in A7r5 cells and in aorta from hypertensive rats. We speculate that this effect occurred as the MMP inhibitors prevented collagen proteolysis and then contribute to reduce FAK activation as peptides containing Arg-Gly-Asp (RGD) (as proteolytic products of collagen) are critical ligands of integrin. On the other hand, MMP-2 stimulates FAK phosphorylation and induces collagen expression in a time-dependent manner in rat cardiac fibroblasts, an effect that was abolished by MMP-2 siRNA and FAK inhibitors [27]. As for the reduction of β_3 integrin that we observed in the aortas of 2K1C rats, Heerkens et al. [28] showed that when the β_3 receptor is inhibited in resistance arteries of hypertensive rats, they develop vascular hypertrophy in response to the activation of β_1 via FAK. Furthermore, it was shown that MMP-14 participates in the proteolytic cleavage of β_3 in tumor cells, contributing to its activation to modulate cells adhesion and migration [29]. Interestingly, we previously showed that the levels of MMP-14 was increased in the aorta of 2K1C rats [21]. Finally, there is the possibility that other adhesion receptors, such as cadherins, may be activated by

MMPs to mediate VSMC migration in cardiovascular diseases [5]. The platelet-derived growth factor receptor may be also activated by collagen in the VSMC as another alternative for FAK activation [30] and needs further investigation. On the other hand, in addition to FAK, the Ras/MAP kinase and Src tyrosine kinases increase VSMC migration after the interaction between extracellular matrix factors and integrins [31].

One limitation of this is the use of doxycycline as the only MMP inhibitor in the rat model. As it can inhibit some other MMPs, these may contribute to hypertension-induced hypertrophic arterial remodeling. However, other MMP inhibitors, such as ONO-4817, also inhibit different MMPs and is prohibitively expensive for use in vivo. The use of MMP-2 knockout mice is also challenging as they may develop serious vascular defects in addition that it is embryonically lethal when MMP-2 is deleted together with MMP-14 [32,33]. Finally, MMP-14 is one of the activators of MMP-2 at the VSMC plasma membrane, thus contributing to the proteolytic effects of MMP-2 on collagen in the aorta of 2K1C rats. Furthermore, MMP-14 per se also stimulates VSMC migration and proliferation in injured blood vessels of mice, thus increasing neointima formation [34]. We therefore cannot exclude the possibility that MMP-14 also contributes to VSMC proliferation and aortic hypertrophy in our present study. The 30 mg/kg/day of doxycycline was used in other studies and ameliorated hypertension-induced hypertrophic and eutrophic arterial remodeling [11,35]. This dose was also chosen as lower doses did not ameliorate 2K1C-induced aortic structural alterations [20].

In conclusion, treatment with doxycycline diminished the heightened activity of MMP-2 in the aorta of 2K1C rats and helped prevent type I collagen proteolysis. This inhibitory effect reduced the activation of FAK and then VSMC proliferation in early hypertension. Furthermore, MMP-2 inhibition in A7r5 cells decreased FAK activation and prevented their migration in vitro. The proteolytic effect of MMP-2 on type I collagen may be one of the starting points for the development of

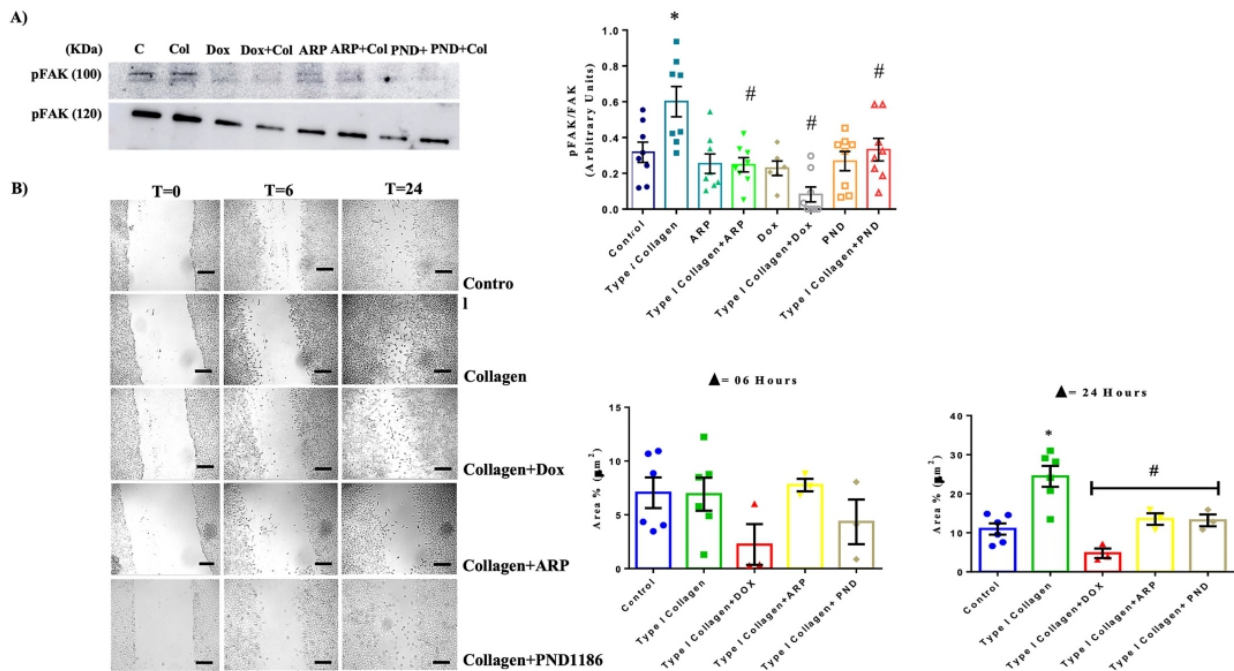


Fig. 6. MMP inhibition prevents FAK activation and VSMC migration in A7r5 cells. A) Representative Western blot of pFAK/FAK from A7r5 cells stimulated with type I collagen, MMP inhibitors (doxycycline or ARP-100) and the FAK inhibitor, PND1186. The graph shows the values of the quantified pFAK/FAK. Data are shown as the means \pm SEM ($n = 6-8$). * $p < 0.05$ vs. Control; # $p < 0.05$ vs. type I collagen. C: control; Col: collagen; Dox: doxycycline. B) Images of A7r5 cell migration in the scratch assay simulating wound injury. The cells were stimulated with type I collagen in the presence of the MMP and FAK inhibitors and the values were quantified after 6 and 24 h after scratching [36]. Data are represented as the means \pm SEM of the percentage of cells migration per time ($\Delta T = 6$ and 24 h). * $p < 0.05$ vs. Control and # $p < 0.05$ vs. type I collagen. Bars are 200 μm ($10\times$).

hypertrophic arterial remodeling in the chronic phases of hypertension.

4. Experimental procedures

4.1. Two kidney-one clip (2K1C) model of hypertension

We used male Sprague-Dawley rats (180 ± 20 g) obtained from the University of Sao Paulo, Campus of Ribeirao Preto to conduct the experiments. All procedures were performed according to the *Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal* (CONCEA) for animal experimentation and approved by the Ethics Committee on Animal Research of Ribeirão Preto Medical School (165/2019). Rats were kept in collective cage under controlled conditions (12 h light/dark cycle at 24 °C) with water and chow ad libitum. Rats were anesthetized with ketamine and xylazine (100 and 10 mg/kg, intraperitoneal) to perform the renovascular hypertension surgery, two kidneys, one clip (2K1C), in which a silver clip with a 0.2 mm opening is placed at the left renal artery to cause stenosis. The control groups (Sham) were submitted only to a laparotomy without clipping. Flunixin (1.0 ml/kg) and oxytetracycline (1.0 ml/kg) were subcutaneously and intramuscularly administered to the rats, once, post-surgically.

4.2. Tail-cuff plethysmography

Systolic blood pressure (SBP) and body weight were daily measured by tail-cuff plethysmography for seven days after surgery. Rats were considered hypertensive when the SBP had increased up to 25 mmHg after three days post-surgery compared to baseline. Rats were treated with doxycycline (30 mg/kg/day, #Sigma, D989) or water (vehicle) by gavage for five days [15]. For tail-cuff plethysmography, rats were restrained and kept under a heated (37 °C) platform to facilitate the measurements. Cuffs were placed on tail and connected to an acquisition

system (CODA non-invasive blood pressure system, V.1.1, 2007, Kent Scientific Inc.). At least five measurements of SBP were used for calculate the mean. At the end of seven days, rats were anesthetized with ketamine and xylazine and euthanized by abdominal and thoracic incision for removing the aorta to evaluate morphofunctional and biochemical parameters.

4.3. Determination of MMP activity by gelatin and in situ zymography

Proteins were extracted from thoracic aortas by using a glass pulverizer with RIPA buffer containing in mM (200 NaF and 1 sodium orthovanadate) and $1\times$ protein inhibitors cocktail followed by digestion for 2 h at 4 °C. Supernatants were taken by centrifugation. Bradford (#B6916; Sigma-Aldrich, USA) was used to measure proteins concentration. Aortic homogenates (15 μg) were mixed to a non-reducing buffer (0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 30% glycerol, 10% sodium dodecyl sulphate, 0.179 mM bromophenol blue), loaded onto an 8% polyacrylamide gel co-polymerized with gelatin (1 mg/ml) and submitted to electrophoresis. Gels were incubated with 2.5% v/v Triton X-100 twice for 30 min each at room temperature and then with an activator buffer (150 mM NaCl, 5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 mM Tris, pH 7.6) for 16 h at 37 °C. Gels were stained with 0.05% Coomassie Blue G-250 (diluted in 25% methanol and 10% acetic acid) and bleached with 30% methanol and 10% acetic acid. Gelatinolytic activity was detected through bleached bands under a blue background and quantified by ImageJ (National Institutes of Health, NIH).

Gelatinases activities in the cryopreserved aortas (5 μm) were also measured by in situ zymography. The transverse aortic sections were incubated with dye-quenched gelatin (1 mg/ml, #D12054, ThermoFisher, USA) diluted 1:10 in an MMP activator buffer (150 mM NaCl, 5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 mM Tris, pH 7.6) for 1 h in a humid dark chamber, followed by 4% formaldehyde fixation. Negative controls were made by

incubating control sections with PBS and none fluorescence was noticed. Images were captured at 400× magnification in a fluorescence microscope (Carl Zeiss Microscopy, Cambridge). Green fluorescence was quantified by ImageJ by adding forty squares with the same area in the medial layer of the aortas.

4.4. Western blot for type I collagen, FAK and integrins in the aortas of hypertensive rats

Aortic homogenate (30 µg protein) was mixed to a reducing buffer (0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 30% glycerol, 0.6 M DTT, 10% sodium dodecyl sulphate and 0.179 mM bromophenol blue) and heated to 70 °C for 10 min. The homogenates were loaded onto 10 or 12% polyacrylamide gels. After electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Germany) using a wet transfer apparatus (#TE22 Mini Tank Transfer Unit, GE Healthcare, Germany) at 100 V for 1 h and 15 min. The membranes were blocked for 1 h with 5% BSA diluted in TBS-T (phosphate buffer saline + tween 20 0,1%) and then incubated for 16 h at 4 °C with the following primary antibodies: anti-collagen type I (ab 6308), anti-integrin α_v (ab179475), anti-integrin α_2 (ab 133,557), anti-integrin β_1 (ab 183,666) and β_3 (ab119992), anti-FAK (sc-558), pFAK (sc-11,765) and MMP-2 (MAB3308). Membranes were then washed five times with TBS-T + Tween (0.1% v/v) for subsequent incubation with polyclonal mouse or rabbit anti-IgG horse-radish peroxidase conjugated antibodies (1:10,000, #12-349, #12-348, Millipore) for 1 h. Bands were visualized by ECL chemiluminescence (#32106, Thermo Fisher Scientific) with Amersham Imager 600 (GE Healthcare). Band intensities were quantified by ImageJ. Bands were normalized by either 43 kDa actin (MAB1501) or Ponceau (# MKBT0397V).

4.5. Hydroxyproline assay to analyze proteolytic products of collagen in the rat aortas

Ten mg aorta was added to polypropylene tubes with deionized water following by 12 M HCl to acidify the samples. Samples were then incubated at 120 °C for 3 h and centrifuged at 10,000 g for 3 min. Supernatants were used to quantify the hydroxyproline in 96 well-plate using the hydroxyproline assay (Sigma, MAK008). Values were analyzed by a spectrophotometer (Molecular Devices) at 560 nm and obtained in ng/ml.

4.6. Mass spectrometry analysis for type I collagen in the rat aortas separated by SDS-PAGE

Bands of interest (130 kDa) were excised from SDS-PAGE protein gel, reduced, alkylated and digested with sequencing grade porcine pancreatic trypsin 10 ng/µl (Promega) and analyzed by matrix-assisted desorption/ionization (MALDI) with time of flight (TOF) analyzer (UltrafleXtreme, Bruker Corporation). FlexControl 4.0 software (Bruker Corporation) was used for data acquisition. Mass spectrometer was calibrated with Peptide Calibration Standard II (8222570). The parameters used were 1500 laser shots per spectrum, 1000 Hz laser frequency and the instrument operating in reflectron positive mode, within a range of 900 to 4500 Da. A saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid prepared in acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid (v/v), at the ratio of 1:1 (v/v) was used as matrix. For data analysis, the software Flex Analysis 3.4, BioTools 3.2 and Sequence Editor 3.2 (all from Bruker Corporation, USA) were used. Type I collagen sequences (P02454 and P02466 from UniprotKB [16,17]) were also used for data analysis with the same software, using the following parameters: MS/MS error tolerance set at 0.8 Da, carbamidomethyl cysteine was fixed, methionine oxidation and variable modifications and three missed cleavages per peptide.

4.7. Evaluation of VSMC proliferation by Ki67 immunofluorescence in rat aortas

Immunofluorescence for Ki67 was performed in the cryopreserved aortas (five µm) of all experimental groups by using anti-Ki67 (ab 16,667). Briefly, transverse aortic sections were washed with PBS for 5 min in a dark humidified chamber followed by 4% formaldehyde for 20 min at room temperature. A blocking solution (1% BSA, 0.3 M glycine, 0.1% Tween-20, in PBS) was used for 1 h at 37 °C. After, aortic sections were washed with PBS and incubated in the humidified chamber with anti-Ki-67 at 1:500, overnight. Sections were incubated with Texas red secondary antibody (Vector Laboratory, TI-1000) at 1:200 for 1 h followed by DAPI fluoroshield (Sigma). For negative control, sections were incubated with the secondary antibody and none fluorescence was detected. Sections were studied by a fluorescence microscopy (Carl Zeiss Microscopy, Cambridge) and images were captured at 400×. The Ki67 was considered positive when the red fluorescence was co-localized with the blue fluorescence of DAPI in the nuclei of aortas (forming purple fluorescence). The arithmetic mean of at least three percentages obtained from the ratio between Ki67-marked nuclei, in purple, and the total nuclei, in blue, was calculated and expressed as the ratio of Ki67 nuclei/total nuclei x 100.

4.8. Aorta morphometric analysis and collagen deposition

To evaluate whether increased VSMC proliferation contributed to hypertension-induced hypertrophic remodeling, aortas were fixed in 10% buffered formaldehyde for 24 h, dehydrated in 70% ethanol and embedded in paraffin. Four-µm sections were either stained with hematoxylin and eosin (H&E) or picosirius red. Images were obtained by a light microscopy in a high-resolution camera (Leica LMD6500) and the morphometric parameters were analyzed by ImageJ. To analyze cross sectional area (CSA) and media to lumen ratio (M/L), we 1) subtracted the aortic internal area from the external area and 2) we analyzed the ratio between the media layer thickness (M = external-internal diameter) per lumen diameter. Picosirius red (0.1 g/100 ml) was used (20 min incubation) to evaluate total collagen in the media layer of aortas. Sections were then photographed at 400× magnification and analyzed by ImageJ using Colour Thresholding tool.

4.9. Cell culture and in vitro wound healing/SMC migration assay

Rat vascular smooth muscle cell line A7r5 (American Type Culture Collection – ATCC catalog CRL-1444™) were cultured in 6-well plates, using Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose (4.5 g/l), penicillin/streptomycin (100 U/ml and 100 µg/ml), amphotericin B (250 mg/l) and gentamicin (50 mg/ml) maintained at the incubator at 37 °C and 5% CO₂. Once the wells were at ~80% of confluence, fetal bovine serum (FBS) was reduced from 10% to 2% for 3 h. The medium was changed to a fresh one and cells were treated with type I collagen (#C3867-1VL, 25 µg/cm²) with or without the MMP inhibitors, doxycycline (#Sigma, D9891, 40 µg/ml) and ARP-100 (#Tocris2621, 100 µM), and the FAK inhibitor, PND1186 (#Tocris 6891/10, 2.5 µM) for 24 h. The inhibitors were added 30 min before the addition of type I collagen. Cells were then lysed with RIPA buffer (#Sigma RO278), centrifuged at 12000 rpm, and the supernatant was collected. Cells were then harvested in lysis buffer. Supernatant and cell extracts were kept frozen. Western blot for pFAK (sc-11765)/FAK (sc-558) was performed in the lysed cells (30 µg) and type I collagen (ab34710) was performed in supernatants. For this, the supernatants were washed twice for 1 h with iced-cold acetone, centrifuged at 1200 rpm and then resuspended in RIPA buffer. Gelatin zymography was done to verify the activity of MMP-2 in the supernatants.

To evaluate VSMC migration capacity stimulated by type I collagen, A7r5 cells were seeded in 6-well plates until 100% of confluence. The media was changed for one containing 2% of FBS for 2 h. By

using a 200 μ l tip, a centralized line was made in the bottom of the well by a gentle scratch. Cellular debris was removed by changing the media and the pharmacological treatments were performed as follows: type I collagen, doxycycline (or PND1186 or ARP-100) + type I collagen. Migration capacity was recorded by taking pictures at 0, 6 and 24 h after scratching the culture in a bright field mode on confocal microscope (Leica Confocal 6000 Fluorescence Microscope). Images were then analyzed using ImageJ and an online workflow.

4.10. Statistical analyses

The data were analyzed by GraphPad Prism Software, Version 6.01 (California, USA). Results were expressed as mean values \pm standard error of the mean (SEM). Comparisons were made using two-way ANOVA or one-way ANOVA followed by Tukey post-test. For cell culture, we used the nonparametric Mann-Whitney *t*-Test. Statistically significant values were considered when $p < 0.05$.

Disclosures

None.

Sources of funding

This work was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo Research Foundation 2019/09174-8 to MMC; 2020/13176-3 to ISO and 2019/10173-6 to ECA), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq, The National Council of Scientific and Technological Development 401725/2016-2, 309399/2021-1 to MMC and ECA) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

CRedit authorship contribution statement

Viviano Gomes de Oliveira Neves: Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Writing – original draft, Project administration. **Marcela M. Blascke de Mello:** Methodology, Validation, Investigation. **Daniel Rodrigues:** Methodology, Investigation. **Laena Pernomian:** Investigation, Writing – review & editing. **Isadora Sousa de Oliveira:** Investigation, Writing – review & editing. **Juliana M. Parente:** Investigation. **Eliane Candiani Arantes:** Resources, Writing – review & editing. **Rita C. Tostes:** Resources, Writing – review & editing. **Michele M. Castro:** Conceptualization, Validation, Resources, Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

We declare that there are no conflicts of interest associated with this publication.

Data availability

Data and material can be obtained upon request to the corresponding author.

Acknowledgments

We thank Giuliana Bertozzi for her help with the hydroxyproline assay and prof. Dr. Richard Schulz from the University of Alberta for proofreading this manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.vph.2023.107211>.

References

- [1] K. Okuno, K. Torimoto, S.M. Cicalese, et al., Angiotensin II type 1A receptor expressed in smooth muscle cells is required for hypertensive vascular remodeling in mice infused with angiotensin II, *Hypertension* 80 (2023) 668–677.
- [2] R.M. Weisbrod, T. Shiang, L. Al Sayah, et al., Arterial stiffening precedes systolic hypertension in diet-induced obesity, *Hypertension* 62 (2013) 1105–1110.
- [3] A.O. Agbaje, Arterial stiffness preceding metabolic syndrome in 3,862 adolescents: a mediation and temporal causal longitudinal birth cohort study, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 324 (2023) H905–H911.
- [4] C. Frantz, et al., The extracellular matrix at a glance, *J. Cell Sci.* 123 (2010) 4195–4200.
- [5] V.A. Belo, D.A. Guimaraes, M.M. Castro, Matrix metalloproteinase 2 as a potential mediator of vascular smooth muscle cell migration and chronic vascular remodeling in hypertension, *J. Vasc. Res.* 52 (2015) 221–231.
- [6] J.D. Hood, D.A. Cheresh, Role of integrins in cell invasion and migration, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 91–100.
- [7] R. Li, N.G. Frangogiannis, Integrins in cardiac fibrosis, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 172 (2022) 1–13.
- [8] A.C. Newby, Matrix metalloproteinase regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates, *Cardiovasc. Res.* 69 (2006) 614–624.
- [9] G. Simões, T. Pereira, A. Caseiro, Matrix metalloproteinases in vascular pathology, *Microvasc. Res.* 143 (2022), 104398.
- [10] M. Massaro, et al., Oxidative stress and vascular stiffness in hypertension: a review interest for antioxidant therapies, *Vasc. Pharmacol.* 116 (2019) 45–50.
- [11] M.M. Castro, E. Rizzi, L. Figueiredo-Lopes, et al., Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats, *Atherosclerosis* 198 (2008) 320–331.
- [12] C. Johnson, Z.S. Galis, Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (2004) 54–60.
- [13] M.P. Bendeck, M. Conte, M. Zhang, et al., Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration, and matrix remodeling after arterial injury, *Am. J. Pathol.* 160 (2002) 1089–1095.
- [14] M.A.M. Ali, J.A. Garcia-Vilas, C.R. Cromwell, et al., Matrix metalloproteinase-2 mediates ribosomal RNA transcription by cleaving nucleolar histones, *FEBS J.* 288 (2021) 6736–6751.
- [15] V.A. Belo, J.M. Parente, J.E. Tanus-Santos, M.M. Castro, Matrix metalloproteinase (MMP)-2 decreases calponin-1 levels and contributes to arterial remodeling in early hypertension, *Biochem. Pharmacol.* 118 (2016) 50–58.
- [16] The UniProt Consortium, UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021, *Nucleic Ac. Res.* 49 (2021) D480–D489.
- [17] H. Laronha, J. Caldeira, Structure and function of human matrix metalloproteinases, *Cells* 9 (2020) 1076.
- [18] J.D. Humphrey, Mechanisms of vascular remodeling in hypertension, *Am. J. Hypertens.* 34 (2012) 432–441.
- [19] L. Pfisterer, A. Feldner, M. Hecker, et al., Hypertension impairs myocardium function: a novel mechanism facilitating arterial remodeling, *Cardiovasc. Res.* 96 (2012) 120–129.
- [20] D.A. Guimaraes, E. Rizzi, C.S. Ceron, et al., Doxycycline dose-dependently inhibits MMP-2-mediated vascular changes in 2K1C hypertension, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 108 (2011) 318–325.
- [21] M.M. Castro, E. Rizzi, C.M. Prado, et al., Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling, *Matrix Biol.* 29 (2010) 194–201.
- [22] P.W. Pires, C.T. Rogers, J.L. McClain, et al., Doxycycline, a matrix metalloproteinase inhibitor, reduces vascular remodeling and damage after cerebral ischemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301 (2011) H87–H97.
- [23] C.S. Ceron, E. Rizzi, D.A. Guimaraes, et al., Time course involvement of matrix metalloproteinases in the vascular alterations of renovascular hypertension, *Matrix Biol.* 31 (2012) 261–270.
- [24] E. Stringa, V. Knauper, G. Murphy, et al., Collagen degradation and platelet-derived growth factor stimulate the migration of vascular smooth muscle cells, *J. Cell Sci.* 113 (2000) 2055–2064.
- [25] J.M. Taylor, C.P. Mack, K. Nolan, et al., Selective expression of an endogenous inhibitor of FAK regulates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 1565–1572.
- [26] J.Z. Kechagia, J. Ivaska, P. Roca-Cusachs, Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20 (2019) 457–473.
- [27] Y. Hori, T. Kashimoto, T. Yonezawa, et al., Matrix metalloproteinase-2 stimulates collagen-I expression through phosphorylation of focal adhesion kinase in rat cardiac fibroblasts, *Am. J. Phys. Cell Phys.* 303 (2012) C947–C953.
- [28] E.H.J. Heerkens, et al., β Integrins mediate FAK Y397 autophosphorylation of resistance arteries during eutrophic inward remodeling in hypertension, *J. Vasc. Res.* 51 (2014) 305–314.
- [29] G. Yosef, V. Arkadash, N. Papo, Targeting the MMP-14/MMP-2/integrin v3 axis with multispecific N-TIMP-2-based antagonists for cancer therapy, *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 13310–13326.
- [30] K. Jeong, J.H. Kim, et al., Nuclear focal adhesion kinase controls vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia through GATA4-mediated cyclin D1 transcription, *Circ. Res.* 125 (2019) 152–166.
- [31] S. Huvneters, E.H.J. Danen, Adhesion signaling-crosstalk between integrins, Src and rho, *J. Cell Sci.* 122 (2009) 1059–1069.

- [32] J. Oh, R. Takahashi, E. Adachi, et al., Mutations in two matrix metalloproteinase genes, MMP-2 and MT1-MMP, are synthetic lethal in mice, *Oncogene* 23 (2004) 5041–5048.
- [33] A. Page-McCaw, A.J. Ewald, Z. Werb, Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 221–233.
- [34] S. Filippov, G.C. Koenig, T.H. Chun, et al., MT-1-matrix metalloproteinase directs arterial wall invasion and neointima formation by vascular smooth muscle cells, *J. Exp. Med.* 202 (2005) 663–671.
- [35] C. Bouvet, L.A. Gilbert, D. Girardot, et al., Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition, *Hypertension* 45 (2005) 432–437.
- [36] J.E.N. Jonkman, J.A. Cathcart, F. Xu, et al., An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy, *Cell Adhes. Migr.* 8 (2014) 440–451.