



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PRICILA RODRIGUES GONÇALVES

**Efeitos do Antioxidante Tempol nas Alterações
Bioquímicas e Estruturais Induzidas pela
Metaloproteinase de Matriz 2 no Coração**

Belém-PA

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

“Efeitos do Antioxidante Tempol nas Alterações Bioquímicas e Estruturais Induzidas pela Metaloproteinase de Matriz 2 no Coração”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Alejandro Ferraz do Prado

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Marta Chagas Monteiro

Belém-PA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

R696e Rodrigues Gonçalves, Pricila.
Efeitos do Antioxidante Tempol nas Alterações
Bioquímicas e Estruturais Induzidas pela Metaloproteinase
de Matriz 2 no Coração / Pricila Rodrigues Gonçalves. —
2020.
53 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Alejandro Ferraz do Prado
Coorientação: Prof^a. Dra. Marta Chagas Monteiro
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2020.

1. Metaloproteinase da matriz 2. alterações
cardíacas. 3. estresse oxidativo. 4. TNF-?. 5. TGF-?. I.
Título.

CDD 615

FOLHA DE APROVAÇÃO

Pricila Rodrigues Gonçalves

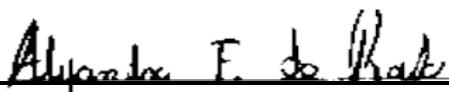
Efeitos do Antioxidante Tempol nas Alterações Bioquímicas e Estruturais
Induzidas pela Metaloproteinase de Matriz 2 no Coração

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Para como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

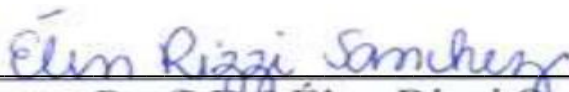
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Aprovado em: 11/09/2020

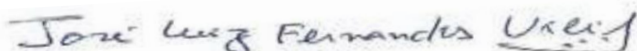
Banca Examinadora



Prof. Dr. Alejandro Fezraz do Prado (Orientador). Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPA



Prof. Dra. Elen Rizzi Sanchez Instituição: Departamento de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto / UNAERP



Prof. Dr. José Luiz Vieira. Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPA

**Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas**
Fone/Fax: (91)- 3201-7754
ppgcf@ufpa.br

Belém-PA

2020

Dedicatória

Dedico este trabalho a cada ser vivo que, de alguma forma, contribuiu com o desenvolvimento da ciência e, agora, faz parte destas páginas e de um pequeno espaço no Universo.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por sempre guiar meus passos e colocar pessoas de bom coração no meu caminho.

Agradeço a minha família, em especial meus pais Rodivaldo Ramalho e Maria Gonçalves, aos meus avós João Maria Gonçalves e Eurídice Gonçalves e meus tios Edna Pamplona e Francisco Gonçalves, que me apoiaram desde a base da minha educação e que nunca mediram esforços para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alejandro Prado, por todos os conhecimentos repassados, pela paciência e dedicação de sempre, e por me presentear com esse lindo projeto. Sempre ouço que ter sua orientação foi como ganhar na loteria, e eu concordo plenamente, sem a sua orientação este trabalho não seria possível.

A minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Marta Chagas Monteiro por ser a minha primeira inspiração no mundo da ciência, e acreditar em mim quando nem eu mesmo acreditava. Gratidão, por abrir as portas do seu laboratório, por todos ensinamentos repassados desde a minha Iniciação Científica até aqui, e por ser responsável por grande parte do meu amadurecimento pessoal e profissional.

Agradeço imensamente, as minhas parceiras de projeto, amigas, e alunas de Iniciação Científica Wictória Dias, Stefanne Silva e Thayná Catete, obrigada pela parceria, risos e lanches divididos. Por toda dedicação e amor que colocaram nesse trabalho, vocês foram incansáveis, estiveram comigo desde o início e merecem todo reconhecimento por isso.

Ao meu irmão de mestrado Herald Reis, por toda ajuda e parceria, conhecimentos compartilhados e amizade que construímos ao longo desses anos.

A Dr^a. Keuri Rodrigues, pela paciência, disponibilidade, colaboração e conhecimentos compartilhados, que foram essenciais para a conclusão desse trabalho.

A secretária do PPGCF, Cliciane, por toda a paciência, tempo e disponibilidade dedicados a nós alunos, salvando nossas vidas sempre que possível.

Aos membros do LABEIM, Roseane, Kaio, Kelly, Ana Ligia, João Paulo, Carol e demais membros, pela amizade, risos (muitos risos), estresses e aprendizado.

Em Especial a Carla, pelo acolhimento, ensinamentos, por toda parceria, disponibilidade e pela amizade que cultivamos durante esses cinco anos.

Ao grupo de Estresse Oxidativo, Bruno, Everton, Sávio, Jhoni e Paulo, que foram cruciais para que eu entrasse nesse mestrado, obrigada por todo incentivo, por me apoiarem lá no início, pela parceria e amizade.

Ao Prof. Dr. José Luiz Nascimento e a Prof^a. Dra^a. Barbarela Macchi, pela colaboração, por abrirem as portas do seu laboratório e possibilitarem que este trabalho fosse executado.

Aos membros do LNMC, Izabella, Nagila, Tatiane, Fábio, Gustavo, Cahy, Neidiane e demais membros, pelo acolhimento e amizade construída durante esse período.

Aos membros do LBE, em especial a Prof^a Dr^a Edilene Silva e ao Prof. Dr. Chubert Sena, pela colaboração boa convivência e espaço cedido.

Ao Prof. Dr. Agenor Santos, a Prof^a Dr^a Raquel Gerlach, Prof^a Dr^a Carolina Heitmann, pela colaboração e tempo dedicado a este trabalho.

Ao meu parceiro de vida, Elivelton Gonçalves, por me apoiar mesmo em momentos difíceis, por se adaptar ao meu horário maluco, minhas noites viradas estudando, por me trazer café, assistir minhas apresentações repetidamente, mesmo sem entender nada, por acreditar no meu potencial, e compartilhar todos os momentos comigo, os bons e os ruins.

Aos amigos Renata, Erlane, Mailson Barbosa, Mailson Leal, Leonardo, Glaydson e Jhonatan pela amizade, por me fazerem rir, me distrair quando eu precisei, por vibrarem com as minhas conquistas e por estarem comigo por tanto tempo.

Aos meus primos e amigos, Samara, Sarah e Manoel, por me proporcionarem conversas incríveis, trocas de conhecimentos e experiências, e risos infinitos. Por parecerem interessados, mesmo quando não entendiam nada do que eu falava. Gratidão por fazerem parte disso e pela nossa conexão, um torcendo pelo outro sempre.

Agradeço a Universidade Federal do Pará, a faculdade de Ciências Farmacêuticas, que foram minha casa durante 7 anos entre graduação e mestrado.

As agências de fomento CNPq e Capes por financiarem essa pesquisa.

Epígrafe

“Talvez tivesse que ser assim. Talvez sem os pontos baixos,
os pontos altos não pudessem ser alcançados.”

Stephenie Meyer

GONÇALVES, R. G. **Efeitos do Antioxidante Tempol nas Alterações Bioquímicas e Estruturais Induzidas pela Metaloproteinase de Matriz 2 no Coração**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2020

A expressão da MMP-2 é elevada em muitas patologias cardiovasculares como infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca, onde a remodelação do tecido e as respostas inflamatórias são perturbadas. Alterações na homeostase da MEC podem levar à disfunção cardíaca. Às MMPs mais analisadas em relação à disfunção cardíaca são a MMP-2 e MMP-9. Já foi demonstrado que inibidores de ERO, como antioxidantes, reduzem a expressão de MMP-2 em tecido vascular. Sendo assim antioxidantes com o Tempol tem grande potencial para atuar nesses mecanismos. Diante disso avaliamos a atividade e a pureza da rhMMP-2 pelo método de zimograma e SDS-PAGE corado pela prata. Os animais foram divididos em 4 grupos de tratamento. O grupo 1: recebeu salina a 0,9%; grupo 2: Tempol 18 mg/kg/v.o; grupo 3: MMP-2 150 ng/kg/i.p; grupo 4: Tempol 18 mg/kg/v.o + MMP-2 150 ng/kg/i.p; durante 4 semanas. Ao final do tratamento o coração foi coletado para quantificação de colágeno, quantificação das ERO por microscopia de fluorescência e imunofluorescência para TNF α e TGF- β . Após as análises, nossos resultados mostraram que a rhMMP-2 estava pura e ativa e que não houve diferença na média de peso dos animais ($P>0,05$). Já no grupo tratado com rhMMP-2 e Tempol, houve diminuição na razão peso coração/peso corporal, comparados ao grupo controle ($P<0,05$). O Tempol foi capaz de diminuir o colágeno no coração dos animais tratados com rhMMP-2. Vimos também a rhMMP-2 aumentou ERO no coração, o que foi impedido pelo Tempol. A rhMMP-2 também levou ao aumento de TNF- α e TGF- β no coração, no entanto o TGF- β foi reduzido pelo Tempol. Em conclusão, a infusão de rhMMP-2 aumentou as ERO cardíacas, que pode levar ao estresse oxidativo, com consequente aumento de TNF- α e TGF- β , podendo acarretar em um coração com perfil pró-fibrótico e inflamatório. No entanto, o Tempol foi capaz de reduzir o colágeno intersticial, inibir o aumento de ERO, TNF- α , TGF- β e de aumentar catalase no coração. Tendo, o Tempol, potencial para inibir fatores que levam ao estresse oxidativo, inflamação e fibrose cardíaca.

Palavras-chave: Metaloproteinase da matriz 2, alterações cardíacas, estresse oxidativo, TNF- α , TGF- β .

GONÇALVES, R. G. **Effects of the Tempol Antioxidant on Biochemical and Structural Changes Induced by Matrix 2 Metalloproteinase in the Heart.**

Master's Dissertation, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2020

MMP-2 expression is elevated in many cardiovascular pathologies such as myocardial infarction and heart failure, where tissue remodeling and inflammatory responses are disturbed. Changes in ECM homeostasis can lead to cardiac dysfunction. The most analyzed MMPs in relation to cardiac dysfunction are MMP-2 and MMP-9. ROS inhibitors, as antioxidants, have been shown to reduce the expression of MMP-2 in vascular tissue. Thus, antioxidants with Tempol have great potential to act on these mechanisms. Therefore, we evaluated the activity and purity of rhMMP-2 using the zymogram and SDS-PAGE silver-stained method. The animals were divided into 4 treatment groups. Group 1: received 0.9% saline; group 2: Tempol 18 mg / kg / v.o; group 3: MMP-2 150 ng / kg / i.p; group 4: Tempol 18 mg / kg / v.o + MMP-2 150 ng / kg / i.p; for 4 weeks. At the end of the treatment, the heart was collected for quantification of collagen, quantification of ROS by fluorescence microscopy and immunofluorescence for TNF α and TGF- β . After the analysis, our results showed that rhMMP-2 was pure and active and that there was no difference in the average weight of the animals ($P > 0.05$). In the group treated with rhMMP-2 and Tempol, there was a decrease in the heart weight / body weight ratio, compared to the control group ($P < 0.05$). Tempol was able to decrease collagen in the heart of animals treated with rhMMP-2. We also saw rhMMP-2 increased ROS in the heart, which was prevented by Tempol. RhMMP-2 also led to an increase in TNF- α and TGF- β in the heart, however TGF- β was reduced by Tempol. In conclusion, rhMMP-2 infusion increased cardiac ROS, which can lead to oxidative stress, with a consequent increase in TNF- α and TGF- β , which can result in a heart with a pro-fibrotic and inflammatory profile. However, Tempol was able to reduce interstitial collagen, inhibit the increase in ROS, TNF- α , TGF- β and increase catalase in the heart. Having Tempol, the potential to inhibit factors that lead to oxidative stress, inflammation and cardiac fibrosis.

Keywords: Matrix 2 metalloproteinase, cardiac changes, oxidative stress, TNF- α , TGF- β .

Lista de figuras e tabelas

Figura 1 - Estruturas dos domínios de MMPs.....	p.17;
Figura 2 - Estrutura esquemática das isoformas MMP-2 de 72 e 64 kDa....	p.18;
Figura 3 - Estrutura e organização do domínio da MMP-2.....	p.24;
Figura 4 - Esquema demonstrando o protocolo de tratamento.....	p.31;
Figura 5 - Pureza e atividade da rhMMP-2.....	p.34;
Figura 6 - Média dos pesos dos animais durante o período de tratamento..	p.35;
Figura 7 - Quantificação de colágeno no coração.....	p.36;
Figura 8 - Níveis de ERO no coração.....	p.37;
Figura 9 – Atividade da catalase no coração.....	p.38;
Figura 10 - Expressão de TNF- α no coração.....	p.38;
Figura 11 - Expressão GF- β no coração.....	p.39;
Tabela 1 - Razão entre peso do coração e peso corporal.....	p.36;

Lista de abreviações

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina Trifosfato
BCA	Anidrase Carbônica Bovina
BSA	Albumina de Soro Bovino
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CEUA	Comitê de Ética da UFPA
CMLV	Células musculares lisas vasculares
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCV	Doença cardiovascular
DHE	Dihidroetídio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GSH	Glutathiona
HB-EGF	Fator de Crescimento Semelhante ao EGF de Ligação à Heparina
KCl	Cloreto de Potássio
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
MEC	Matrix Extracelular
MMP	Metaloproteinases de Matrix
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
MT1-MMP	Metaloproteinase de Matrix do Tipo Membranar
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida Reduzida
NEM	N-etilmaleimida
PHE	Fenantrolina
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

rhMMP-2	Metaloproteinase-2 de Matrix Recombinante Humana
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
SOD	Superóxido Dismutase
TGF- β	Fator de Transformação de Crescimento Beta
TIMP	Inibidores Teciduais de Metaloproteinases
TNC	Tris, NaCl e ClCa ²
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

Sumário

1. Introdução	14
1.2. MMP-2 e Doenças Cardiovasculares	19
1.3. MMP-2 e Estresse oxidativo	21
1.4. Tempol	24
2. Objetivo	26
2.1. Objetivos específicos	26
3. Metodologia	27
3.1. Obtenção da rhMMP-2	27
3.1.1. Construção do plasmídeo contendo a sequência de DNA da MMP-2 humana (rhMMP2)	27
3.1.2. Expressão e purificação da rhMMP-2	27
3.1.3. Quantificação da rhMMP-2	28
3.1.4. Avaliação da expressão e atividade da rhMMP-2	28
3.1.5. Coloração de prata	28
3.1.6. Zimografia em gel	29
3.1.7. Atividade de MMP-2 por fluorímetro	29
3.2. Tratamento <i>in vivo</i>	30
3.3. Quantificação de Colágeno no coração	31
3.4. Quantificação dos níveis de ERO por microscopia de fluorescência do Coração	31
3.5. Atividade da catalase	31
3.6. Imunofluorescência para o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), no coração	31
3.7. Imunofluorescência para o TGF- β , no coração	32
3.8. Análise Estatística	32
4. Resultados	32
4.1. Purificação da MMP-2 recombinante	32
4.2. Peso corporal dos animais durante o tratamento	34
4.3. Razão entre o peso do coração e o peso corporal dos animais	34
4.4. Quantificação de colágeno no coração	35
4.5. Níveis de ERO no coração	35
4.6. Atividade da catalase no coração	36
4.7. Imunofluorescência de TNF- α no coração	37
4.8. Níveis de TGF- β no coração	37
5. Discussão	38
6. Conclusões	42
7. Referências	42

1. Introdução

As doenças cardiovasculares (DCVs) são a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo. Geralmente, a doença cardiovascular relaciona-se com estados patológicos do sistema circulatório, incluindo artérias, veias, capilares, vasos linfáticos e distúrbios sanguíneos que afetam a circulação. Danos ao revestimento interno dos vasos sanguíneos sejam causados por patógenos ou por radicais oxidativos, levam a uma resposta inflamatória que desencadeia a adesão de leucócitos e a transmigração para a parede do vaso. Resultando na ativação das metaloproteinases da matriz (MMPs) e levando à proliferação de células musculares lisas vasculares, alteração de proteína junção célula-a-célula e vazamento vascular, desarranjo de colágeno e disfunção vascular (AMIN et al. 2016).

A expressão da MMP-2 é elevada em muitas patologias cardiovasculares (por exemplo, infarto do miocárdio, doença cardíaca hipertensiva e insuficiência cardíaca) em que a remodelação do tecido e as respostas inflamatórias são alteradas (HARDY et al. 2018) A matriz extracelular do miocárdio (MEC) é o ambiente dinâmico fundamental para a homeostase estrutural e fisiológica do coração. Alterações na homeostase da MEC podem levar à disfunção diastólica ou sistólica e consequente desenvolvimento de cardiopatias. Às MMPs mais analisadas em relação à DCVs são as gelatinases: MMP-2 e MMP-9 (RADOSINSKA, 2018).

Já foi demonstrado que o aumento de MMP-2 induz alterações cardíacas que resultam em insuficiência cardíaca e recentemente foi mostrado que a MMP-2 induz aumento de espécies reativas de oxigênio. A hipótese deste projeto é que o aumento de superóxido pela MMP-2 resulta em alterações bioquímicas e estruturais no coração. Por tanto o objeto deste estudo é avaliar os efeitos do antioxidante Tempol Nas alterações bioquímicas e estruturais induzidas pela MMP-2 no coração

1.1. Metaloproteinases da matriz

As MMPs são proteases, especializadas em degradar os componentes da matriz extracelular em condições normais e patológicas. MMPs são altamente homólogas em sua estrutura. A maioria possui os quatro domínios básicos: peptídeo sinal, pró-atividade autoinibitória, domínio catalítico e domínio semelhante à hemopexina (TOKITO et al, 2016). O propeptídeo consiste em

aproximadamente 80 a 90 aminoácidos contendo um resíduo de cisteína, que interage com o átomo catalítico de zinco por meio de seu grupo tiol da cadeia lateral. Uma sequência altamente conservada (.PRCGXPD.) Está presente no propeptídeo. A remoção do propeptídeo por proteólise resulta na ativação do zimogênio, pois todos os membros da família MMP são produzidos de forma latente (KAPOOR et al., 2016).

O domínio catalítico contém dois íons de zinco e pelo menos um íon cálcio coordenado com vários resíduos. Um dos dois íons de zinco está presente no sítio ativo e está envolvido nos processos catalíticos das MMPs. O segundo íon de zinco (também conhecido como zinco estrutural) e o íon de cálcio estão presentes no domínio catalítico a aproximadamente 12 Å de distância do zinco catalítico. O íon catalítico de zinco é essencial para a atividade proteolítica das MMPs; os três resíduos de histidina que coordenam com o zinco catalítico são conservados entre todas as MMPs. Pouco se sabe sobre os papéis do segundo íon zinco e do íon cálcio no domínio catalítico, mas as MMPs demonstram possuir altas afinidades pelos íons estruturais de zinco e cálcio (COUSSENS et al. 2002; OVERALL et al. 2002)

O domínio semelhante à hemopexina das MMPs é altamente conservado e mostra semelhança de sequência com a proteína plasmática, a hemopexina. Demonstrou-se que o domínio semelhante à hemopexina desempenha um papel funcional na ligação do substrato e/ou nas interações com seus inibidores teciduais (TIMPs) (LOCKHART et al. 2003). Além desses domínios básicos, a família de MMPs evoluiu para diferentes subgrupos ao incorporar e/ou excluir domínios estruturais e funcionais (EGEBLAD et al. 2002; MCCAWLEY et al. 2001; KOREM et al. 2002).

A família MMP é constituída de 28 membros, pelo menos 23 são expressos em tecidos humanos e 14 destas MMPs são expressas na vasculatura (VISSE et al. 2003). As MMPs são comumente classificadas com base em seus substratos e na organização de seus domínios estruturais em collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelinas (MMP-3, MMP-10, MMP-11 e MMP-27), matrilisinas (MMP-7 e MMP-26), MMPs do tipo membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25) e outras MMPs (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23 e MMP-28). Além disso, diferentes classes de MMPs têm características

estruturais específicas que as distinguem da estrutura prototípica de MMP (KUCUKGUVEN et al. 2013; ENGLISH et al. 2001; PEI et al. 2000) A topologia das MMPs é bem conservada, e uma grande diferença entre as MMPs está no “*subsíte*” S1', uma bolsa hidrofóbica bem definida de profundidade variável que é crítica para a interação específica do MMP-substrato (Figura 1) (CUI et al., 2017).

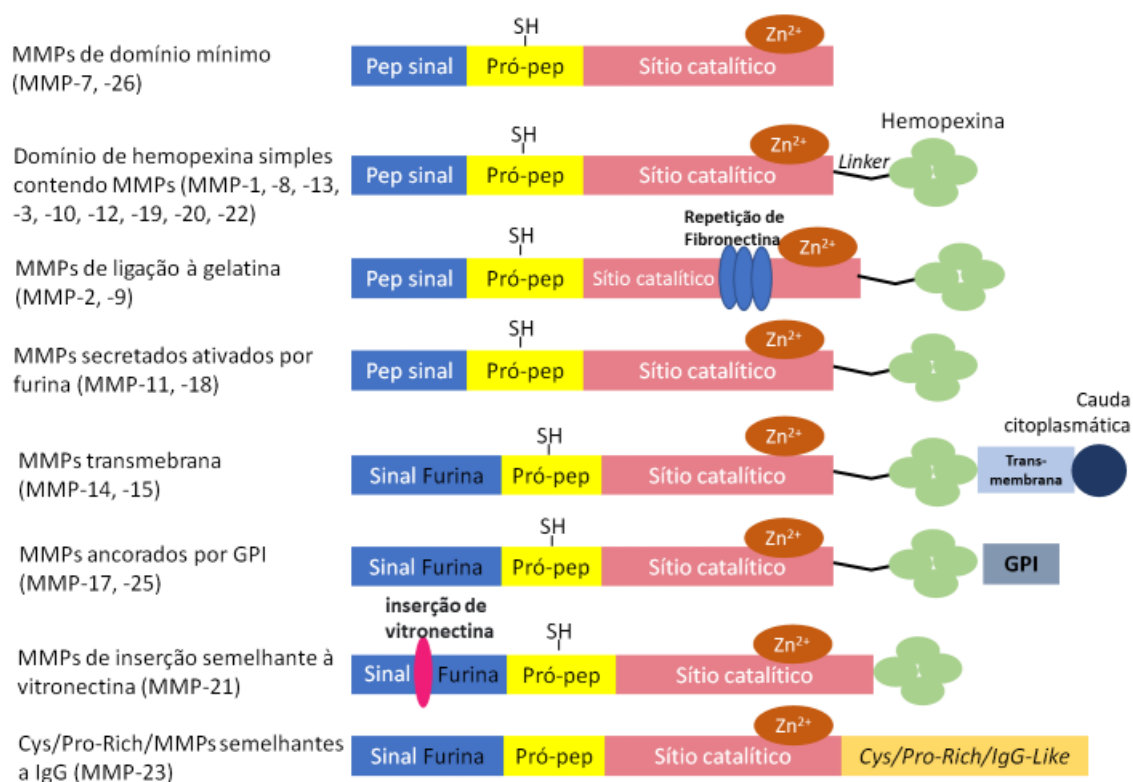


Figura 1. Estruturas dos domínios de MMPs.

As gelatinases (MMP-2 e -9) têm um domínio catalítico único entre as MMPs. A repetição tripla do tipo II da fibronectina no domínio catalítico da gelatinase forma um domínio de ligação ao colágeno, permitindo a ligação e degradação do colágeno tipo IV ou colágeno desnaturado (gelatina) (Figura 2) (MORGUNOVA et al. 1999). Dentre as gelatinases, a MMP -2 (colagenase de 72 kDa ou gelatinase A), vem sendo bastante visada por estar presente em células e tecidos como endotélio, músculo liso vascular, adventícia, plaquetas, leucócitos, aneurisma da aorta, varizes. E por estar envolvida em uma variedade de processos fisiológicos, como angiogênese e reparo tecidual, e processos patológicos como doença venosa crônica, câncer, doença cardiovascular, infecção viral e inflamação (CUI et al. 2017). A sua atividade é regulada

principalmente pelos inibidores teciduais (TIMP1, TIMP2) e pela alfa2macroglobulina (PEETERS et al. 2017).

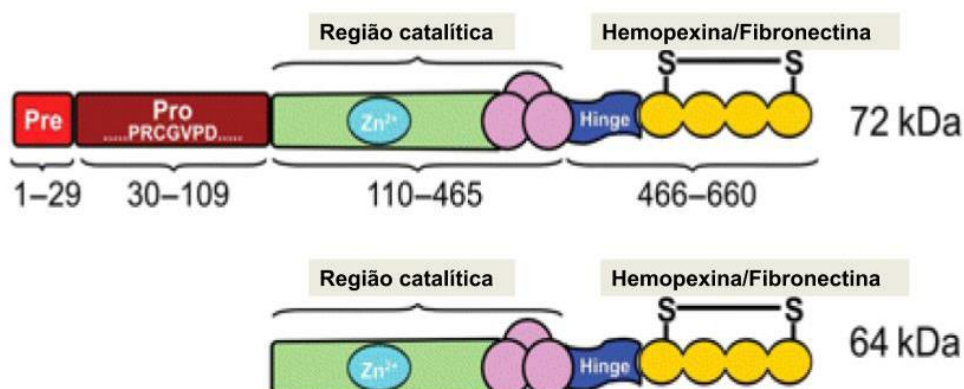


Figura 2. Estrutura esquemática das isoformas MMP-2 de 72 e 64 kDa. A sequência de sinal do terminal N (indicada como 'Pré') é seguida pelo domínio propeptídeo ('Pro'). O local catalítico contém o local essencial de ligação ao íon zinco. Um resíduo de cisteína no domínio do propeptídeo autoinibitório interage com o zinco para impedir a ligação do substrato. MMP-2 (e MMP-9) é único em relação a outras MMPs, pois o domínio catalítico contém três repetições de fibronectina (círculos cor de rosa). As repetições de fibronectina podem se ligar ao colágeno desnaturado, aumentando sua interação com a gelatina ou substratos do tipo gelatina. A região flexível da dobradiça rica em prolina e um domínio da hemopexina carboxi (C) -terminal que funciona no reconhecimento de substrato mediam a interação com substratos enzimáticos. Adaptada de KANDASAMY, 2009.

A MMP-2 cliva o colágeno em duas fases, a primeira semelhante à da colagenase intersticial, seguida pela gelatinólise, promovida pelo domínio semelhante à fibronectina (PATTERSON et al. 2001). A atividade colagenolítica da MMP-2 é muito mais fraca que as colagenases. No entanto, a proMMP-2 é recrutada para a superfície celular e sofre clivagem auto catalítica na superfície celular com o apoio do complexo MT1-MMP/TIMP-2, acumulando-se pericelularmente e causando acentuada atividade colagenolítica local (NAGASE et al. 2006; OVERALL et al. 2000)

As MMPs são produzidas por múltiplos tecidos e células, são secretadas por tecido conjuntivo, pró-inflamatório e células uteroplacentárias, incluindo fibroblastos, osteoblastos, células endoteliais, músculo liso vascular, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e citotrofoblastos (CUI et al. 2017). A expressão e atividade

de MMP pode ser influenciada pela expressão de mRNA, por hormônios como por exemplo hormônios sexuais ovarianos, estrogênio e progesterona; fatores de crescimento como, fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento placentário, fator de crescimento epidérmico, e citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α). As MMPs são secretadas por células pró-inflamatórias e sua secreção é promovida por citocinas pró-inflamatórias (VERMA et al. 2007).

As MMPs são reguladas em vários níveis, incluindo a expressão do mRNA, a ativação da pró-enzima na forma ativa e as ações de neutralização das TIMPs endógenas. As MMPs são sintetizadas como pré-proMMPs, das quais o peptídeo sinal é removido durante a tradução para gerar proMMPs. Os zimogênios ou proMMPs, a cisteína do motivo do PRCGXPD '*switch* de cisteína' coordena com o Zn²⁺ catalítico para manter as proMMPs inativas (NAGASE et al. 2006). Para processar e ativar esses zimogênios ou proMMPs, ocorre um "distúrbio" da cisteína com o pró-domínio que pode ser clivado por outras enzimas proteolíticas, como serina proteases, endopeptidase, furina, plasmina ou outras MMPs para produzir as formas ativas de MMP (CUI et al. 2017).

As MMPs ativadas são fortemente reguladas por seus inibidores endógenos, ou seja, os TIMPs. A família TIMP consiste em 4 membros, TIMP1–4 e eles exibem alta similaridade de sequência. Os TIMPs se dobram em dois domínios, o terminal N e o terminal C, onde o domínio do terminal N é suficiente para a inibição das MMPs (LEVIN et al. 2017). MMPs são proteínas extracelulares, mas estudos indicaram que MMP-1, MMP-2 e MMP-11 também são encontrados intracelularmente e podem atuar sobre proteínas intracelulares (NAGASE et al., 2006).

Em condições normais, a expressão e atividade das MMPs são altamente reguladas via interações entre seus ativadores e inibidores. O desequilíbrio entre esses fatores, no entanto, resulta em atividade desregulada da MMP, que causa destruição tecidual e alteração funcional ou inflamação local, levando ao desenvolvimento de diversas doenças, como doenças cardiovasculares, artrite, doenças neurodegenerativas, bem como câncer (TOKITO et al. 2016). Uma vez que a atividade da MMP é conhecida por desempenhar um papel proeminente nas doenças vasculares, uma potencial estratégia seria reduzir a atividade da MMP para melhorar a remodelação da matriz extracelular (PEETERS et al. 2017). Assim as MMPs têm sido propostas como biomarcadores para inúmeras

condições patológicas e estão sendo examinadas como possíveis alvos terapêuticos em vários distúrbios cardiovasculares e musculoesqueléticos.

1.2. MMP-2 e Doenças Cardiovasculares

A MEC preserva a geometria cardíaca correta e a integridade estrutural do miocárdio, mantendo o equilíbrio entre a deposição e a degradação das proteínas da matriz. A MEC forma um andaime específico que permite a ancoragem dessas proteínas e, portanto, ajuda as células cardíacas a funcionarem adequadamente. A MEC também é responsável pela transdução de forças mecânicas dentro dos vasos cardíacos e influencia a complacência diastólica das paredes arteriais (KOBUSIAK-PROKOPOWICZ et al. 2018). A degradação oportuna da MEC é uma característica importante do desenvolvimento, morfogênese, reparo e remodelação tecidual. Esse processo é regulado com precisão em condições fisiológicas normais, mas, quando desregulado, torna-se uma causa de muitas doenças, como artrite, nefrite, câncer, encefalomielite, úlceras crônicas, fibrose, etc. como aterosclerose, estenose, hipertrofia ventricular esquerda, insuficiência cardíaca e aneurisma (NEWBY et al. 2005)

Os principais mediadores do remodelamento da MEC são as MMPs. Sob condições normais, esses processos são rigorosamente regulamentados. Os TIMPs também são responsáveis pelo remodelamento da MEC, e as alternâncias no equilíbrio entre MMPs e TIMPs desempenham um papel importante no remodelamento cardíaco patológico (HENDRY et al, 2014; SQUIRE et al., 2004). O espectro conhecido de substratos para a MMP-2 contém não apenas os componentes da matriz extracelular, como colágenos ou elastina, mas foi descrito que a MMP-2 pode digerir os componentes do aparelho contrátil, como troponina I ou cadeia leve da miosina 1 (KOBUSIAK-PROKOPOWICZ et al., 2018).

A MMP-2 se mostra elevada em DCVs (AZEVEDO et al. 2014). Em corações de ratos hipertensos renais a MMP-2 está mais expressa e ativa e parece ser a principal protease envolvida no remodelamento e disfunção cardíaca nesses animais (RIZZI et al. 2013). A presença de MMP-2 aumentada no coração (por modelo de transgenia) levou ao aumento da peroxidação lipídica, áreas de infarto maiores e diminuição no funcionamento contrátil dos corações dos animais submetidos à isquemia/reperfusão (ZHOU et al. 2007). Esse aumento de MMP-2 no coração resultou ainda em perdas funcionais e alterações

morfológicas do coração, particularmente um marcante remodelamento ventricular, com hipertrofia de miócitos, lise de miofilamentos, destruição de sarcômeros e proliferação de fibroblastos cardíacos (Bergman et al. 2007). Já após 12 a 24 semanas de vida, foi observada degeneração de válvulas cardíacas nesses camundongos (MAHIMKAR et al. 2009). Camundongos nocaute para MMP-2 apresentaram melhora na lesão do ventrículo esquerdo quando submetidos ao aumento de pré-carga cardíaca (MATSUSAKA et al. 2006).

Existem várias evidências mostrando que o aumento de MMP-2 no coração é prejudicial e que resulta em alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais. No entanto, até o momento não se sabe quais os mecanismos pela qual a MMP-2 leva a essas alterações. Alguns trabalhos mostram a ação direta da MMP-2 na proteólise de proteínas funcionais e morfológicas do coração como a titina (ALI et al. 2013), α -actina (SUNG et al. 2007), troponina I (WANG et al. 2002), cadeia leve de miosina 1 (SAWICKI et al. 2005) e ainda em estruturas cardíacas como válvulas cardíacas (MAHIMKAR et al. 2009).

Nos últimos anos, foi demonstrado que a fibrose miocárdica contribui para a insuficiência cardíaca, arritmias ventriculares e morte cardíaca. Estudos levantam a possibilidade de que MMP-2 pode ser um biomarcador potencial cardiomiopatia hipertrófica nas fibras focais no coração (YANG et al, 2019). Um modelo transgênico cardíaco de MMP-2 forneceu evidências fisiopatológicas inequívocas para um papel primário de MMP-2 na evolução de anormalidades estruturais e funcionais cardíacas pleiotrópicas na ausência de lesão sobreposta. Além disso, mostra evidências ultraestruturais para ativação e proliferação intrínseca de fibroblastos cardíacos, com deposição de colágenos intersticiais. A fibrose de substituição extensa foi evidente nos camundongos transgênicos MMP-2, consistente com a apoptose celular de cardiomiócitos em curso (Bergman et al, 2006).

A MMP-2 desempenha um papel central na remodelação cardíaca, e a inibição de MMP pode mitigar o dano causado pela proteólise excessiva da atividade de MMP-2 regulada positivamente e talvez prevenir a evolução desta condição para insuficiência cardíaca (Rizzi et al 2010). Um estudo em modelo 2R1C mostrou remodelação cardíaca progressiva associada a aumentos precoces na atividade de MMP, particularmente envolvendo MMP-2, e com níveis aumentados de TGF- β e ERO cardíacos. Portanto, os níveis aumentados de

TGF- β cardíaco podem resultar de um aumento na formação de ERO cardíacas, promovendo fibrose em modelo de hipertensão (Rizzi et al 2013). Estudos in vitro indicam que o TGF- β é ativado por MMP-2 (KARSDAL et al, 2002). O aumento associado à idade na ativação de TGF- β latente é dependente do aumento concomitante associado à idade na atividade de MMP-2. Assim, o aumento na atividade de MMP-2 não apenas regula a proteólise de proteínas da matriz, como colágeno e elastina, mas aumenta favoravelmente o potencial de invasão de células do músculo liso vascular (CMLV) dentro da parede arterial envelhecida, mas também regula a atividade do fator de crescimento TGF- β , que promove fibrose (Lakatta, 2007).

Recentemente foi demonstrado que após 28 dias de tratamento de camundongos com rhMMP-2 observou-se aumento de ERO, apoptose de cardiomiócitos e diminuição da função cardíaca, como diminuição da fração de ejeção e de encurtamento. Para elucidar o mecanismo de ação envolvido na insuficiência cardíaca induzida pela MMP-2, iremos investigar se o estresse oxidativo é o fator desencadeante nos danos cardíacos, visto que trabalhos recentes mostram que a MMP-2 é capaz de induzir o aumento do estresse oxidativo (LOVETT et al. 2012; DO PRADO, 2013; PRADO et al. 2018; ZHOU. 2007).

1.3. MMP-2 e Estresse oxidativo

Estresse oxidativo é o termo usado quando ocorre um desequilíbrio entre o aumento da formação das espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou a diminuição de sua inativação por sistemas antioxidantes endógenos (BARBOSA, K. et al., 2010). A geração das ERO acontece durante processos de oxidação biológica em que são produzidos de maneira controlada em condições fisiológicas, como por exemplo, na respiração celular acoplada à fosforilação oxidativa para a formação de adenosina trifosfato (ATP) na mitocôndria (TOUYZ et al., 2019).

A produção de MMPs também é estimulada por fatores como o estresse oxidativo, que levam à sua regulação positiva ou negativa com subsequente remodelação da MEC. Ainda, o estresse oxidativo induzido pelo desequilíbrio entre a eliminação e a produção de ERO tem efeito deletério na biologia vascular via ativação excessiva de MMPs. A formação de ERO via NADPH oxidase induzida por estiramento mecânico aumenta a expressão de mRNA de MMP-2 e

a liberação de pró-MMP-2. O estresse oxidativo induz a perda de células capilares da retina regulando o papel proapoptótico da MMP-2. Além disso, a ativação dependente de ERO de MMPs é necessária para o remodelamento interno da arteríola (MARTINEZ et al. 2011). Em relação aos efeitos do estresse oxidativo no remodelamento vascular, abordagens antioxidantes já estão sendo usadas para reduzir a regulação positiva de MMPs e atenuar a remodelação tecidual durante doenças vasculares (AMIN et al, 2016). Além disso, as ERO são capazes de inativar os TIMPs, levando ao aumento indireto da atividade dessas proteases (FREARS, et al. 1996;). Assim, por meio da ativação de MMPs, o estresse oxidativo pode modular degradação de matriz e o remodelamento de diversos tecidos.

Já foi demonstrado que estresse oxidativo e a proteólise são dois mecanismos de ativação da MMP-2. A clivagem proteolítica remove o domínio propeptídico (por exemplo, por MMP-14), sendo um mecanismo catalítico que produz a mmp-2 ativa (64 kDa) (DECOUX et al. 2014; SCHULZ et al. 2007). A remoção do propeptídeo por proteólise é coordenada por serino-proteases e MMPs e modulada pelos TIMPs. Curiosamente, TIMP-2 coopera com MT1-MMP (MMP-14) na remoção do pró-peptídeo de domínio e ativação de MMP-2 a partir da forma de 72 kDa para a forma de 64 kDa (NAGASE et al. 1999). Há muito que se propõe que o estresse oxidativo desempenha um papel na ativação da MMP nas situações de aterosclerose e inflamação (LOVETT et al., 2012). Um mecanismo de ativação da MMP pelo estresse oxidativo é a glutatilação. O peroxinitrito (ONOO^-) reage com glutatona celular (GSH) e o resíduo de cisteína na região conservada do domínio pró-peptídeo. Assim, a cisteína glutatiliada não pode mais se complexar com o átomo de Zn^{2+} no domínio catalítico. Então, a enzima resultante (72 kDa) é ativada apesar de conter o domínio pró-peptídeo (Figura 3) (DECOUX et al., 2014; FERNANDEZ-PATRON et al. 2011; LOVETT et al., 2012, PACHER et al., 2005).

Já existem evidências de que a MMP-2 aumenta a produção de ERO por mecanismos que envolvem a clivagem do pró-HB-EGF (fator de crescimento epidérmico de ligação à heparina) mediada por MMP-2, levando à transativação do receptor de EGF que desencadeia vias de sinalização a jusante, aumentando a formação de ERO e promovendo vasoconstrição. Esses achados podem ter várias implicações para doenças

cardiovasculares (PRADO et al. 2018). Lovett et al (2013) também mostrou que a MMP-2 é capaz de induzir vias pro-oxidantes. Além da MMP-2, foi mostrado que a MMP-7 também é capaz de induzir estresse oxidativo via clivagem do pro-HB-EGF (FERNANDEZ-PATRON et al. 2011)

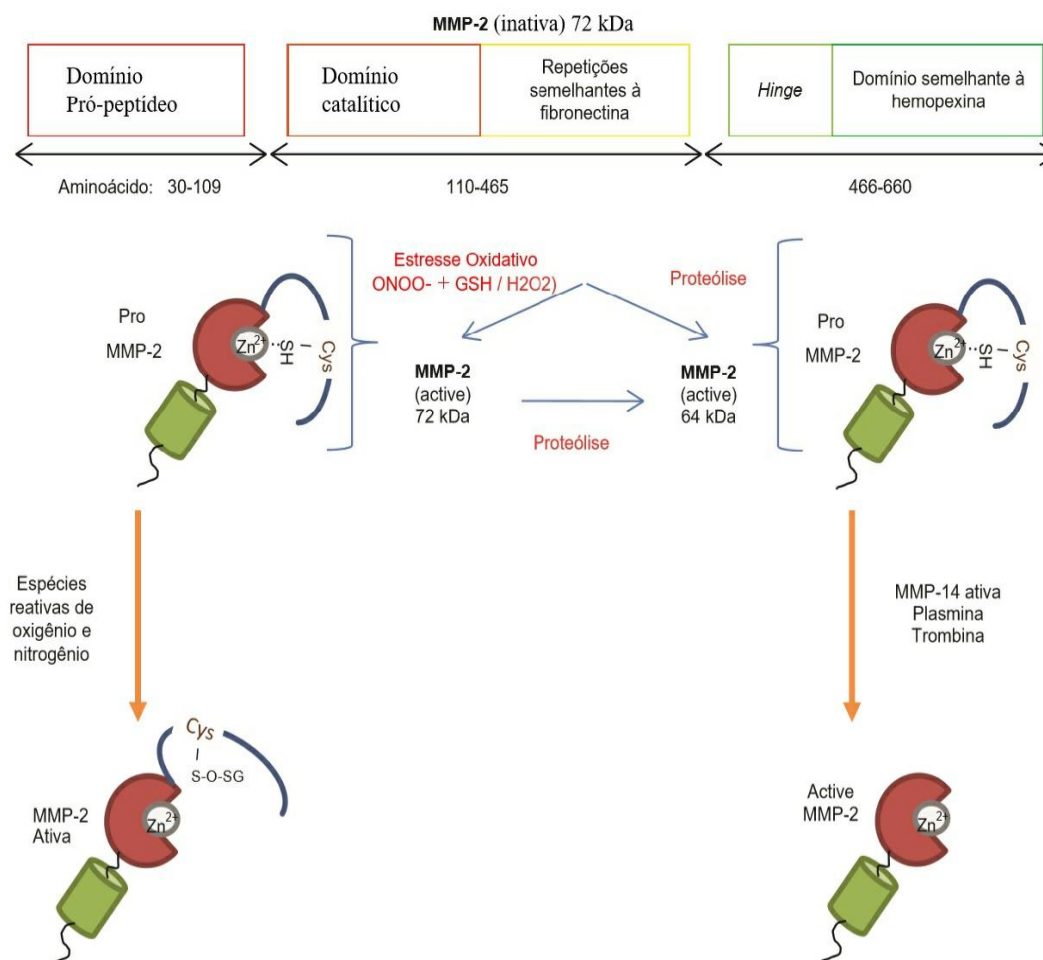


Figura 3. A. Estrutura e organização do domínio da MMP-2. **B** A atividade catalítica da MMP-2 (72 kDa) é fortemente regulada por seu domínio propeptídico. Um resíduo de cisteína no domínio propeptídeo se liga ao átomo de Zn^{2+} no domínio catalítico, inibindo a ligação e a proteólise do substrato. O estresse oxidativo e a proteólise são dois mecanismos de ativação da MMP-2. A glutatilação S é induzida pelo estresse oxidativo. Presumivelmente, peroxinitrito ($ONOO^-$) reage com a GSH e um resíduo de cisteína crítica na região conservada (PRCGVPD) do pró-peptídeo de domínio. A cisteína glutatiliada S não pode mais se complexar com o átomo de Zn^{2+} no domínio catalítico. A enzima resultante (72 kDa) é ativa apesar de conter o domínio propeptídico. A remoção proteolítica do domínio propeptídico (por exemplo, por MMP-14 e proteases em cascata de coagulação como trombina e plasmina) é um mecanismo importante que

produz MMP-2 cataliticamente ativo (64 kDa). Segundo Ali (2013) o peróxido de hidrogênio também ativa a MMP-2 (FERNANDEZ-PATRON et al, 2011)

É provável que a ativação direta da MMP-2 durante a lesão por estresse oxidativo influencie processos de longo prazo, o que pode alterar o equilíbrio de lesão reversível para irreversível no miócito. Como resultado de danos celulares irreversíveis, um estado inflamatório induzido no coração contribui para a progressão para IC. De fato, a formação de MMP-2 em resposta ao estresse oxidativo é outro exemplo do início de uma resposta imune inata por meio de sinalização de estresse oxidativo e ativação de NF- κ B para causar disfunção contrátil miocárdica progressiva (LOVETT et al., 2012).

As ERO têm sido consideradas um importante ativador das MMPs em diferentes doenças cardiovasculares e parecem desempenhar um papel mecanicista na hipertrofia vascular (MATTOS et al, 2020). Além disso, o TNF- α mostrou aumentar a produção de ERO em diferentes culturas de células, particularmente em miócitos e células do músculo liso vascular (CMLV) (CHOI et al, 2015). O TNF- α contribuiu para aumentar a formação de ERO na aorta de ratos 2K1C. Provavelmente, a atenuação na formação de ERO causada por inibidores do TNF- α contribuiu para a redução da atividade da MMP-2 encontrada em ratos hipertensos tratados (MATTOS et al, 2020). Um estudo com células do músculo liso da aorta relatou que o TNF- α induziu um aumento nos níveis de proteína e mRNA de MMP-2 e atividade enzimática de MMP-2 que foi atenuada por inibidores de NADPH oxidase e um antioxidante geral, sugerindo um importante papel para a produção de ROS dependente de NADPH oxidase na regulação da expressão de MMP-2 (ZHANG et al, 2006).

1.4. Tempol

O Tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina- *N*-oxil) é um agente mimético de SOD solúvel em água. Devido ao seu baixo peso molecular, o Tempol passa através das membranas biológicas (BERNARDY et al., 2017). Tempol pode se deslocar entre o radical nítróxi, a hidroxilamina reduzida e a forma de cátion oxoamônio oxidado com 1 e 2 reações de transferência de elétrons (SOULE et al., 2007). Estes são facilitados por mudanças conformacionais de “barco e cadeira” que estão por trás da rapidez e natureza catalítica das reações. A reação do Tempol com o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) para formar o peróxido de hidrogênio ($H_2 O_2$) é responsável por sua ação mimética de

superóxido dismutase (SOD). Embora as taxas de reação relatadas entre Tempol e $O_2^{\cdot-}$ variem amplamente, um estudo recente relatou que a eficácia do Tempol em catalisar o metabolismo do $O_2^{\cdot-}$ celular foi semelhante ao SOD nativo e apenas ligeiramente menos do que a forma peguilada (SOD-PEG) permeabilizada por células de SOD (PEG-SOD) (SAITO et al, 2003). Tempol foi tão eficaz no metabolismo de $O_2^{\cdot-}$ celular quanto N-acetil cisteína (NAC), mas ao contrário de Tempol. Tempol foi significativamente mais eficaz do que outros antioxidantes usados com frequência e foi muito mais eficaz do que vitaminas (LUO et al, 2009). Entre um grupo de nitróxidos de anel de 6 membros, a atividade mimética da SOD in vitro na metabolização do $O_2^{\cdot-}$ muito semelhante às suas ações in vitro, consistente com o conceito de que a eficácia biológica do Tempol dependia de sua facilidade em promover o metabolismo do $O_2^{\cdot-}$ (PATEL et al, 2006).

Ainda, o Tempol favorece o metabolismo de uma grande variedade de espécies reativas celulares de oxigênio e nitrogênio, ele decompõe cataliticamente os radicais livres derivados do peroxinitrito, como: dióxido de nitrogênio ($\cdot NO_2$), carbonato ($\cdot CO_3$) e $O_2^{\cdot-}$ com uma constante de taxa rápida (CARROLL et al. 2000) reduzindo o estresse oxidativo. Assim, o Tempol é um potente antioxidante, tendo eficácia semelhante a da enzima catalase na inativação da geração de $OH\cdot$ a partir de H_2O_2 , e na presença de metais de transição na reação de Fenton (SOULE et al., 2007; WILCOX e PEARLMAN, 2008). Assim, o Tempol é considerado um agente do ciclo redox de uso geral, em vez de um mimético específico de SOD (WILCOX e PEARLMAN, 2008).

O Tempol é um anfólito com alta capacidade de permear as membranas celulares, o trato gastrointestinal ou a barreira hematoencefálica, responsável por sua eficácia após a administração oral e por suas ações no sistema nervoso central (WILCOX et al. 2010). Tempol tem sido eficaz na prevenção da geração de ERO nas células cardíacas, prevenindo processos como: respostas hipertróficas e contráteis, aumento de Ca^{++} intracelular e sinalização via inositol-3-fosfato e a promoção da fibrose intersticial (SUZUKI & FORD, 1999). Já foi demonstrado que inibidores de ERO, como antioxidantes, reduzem a expressão de MMP-2 e MMP-9 em tecido vascular (WANG et al. 2018). O Tempol é capaz de aumentar a expressão do fator de transcrição Nrf-2, que regula a expressão de enzimas citoprotetoras e antioxidantes (SOMPAKDEE et al. 2018).

Tempol é uma droga antioxidante que mostrou efeitos protetores em diversos modelos de doenças, incluindo hipertensão (RIZZI et al, 2013; WILCOX et al. 2010). De fato, esta droga promissora inibiu a formação de ERO *in vitro* melhor do que outros antioxidantes tais como: N-acetil-L-cisteína, (-) epicatequina, Ebselen, trolox, α -tocoferol e ascorbato (WILCOX et al. 2010; LUO et al. 2009). Tempol diminuiu os aumentos no TGF- β , o desequilíbrio proteolítico e as alterações morfológicas e funcionais encontradas na hipertrofia cardíaca induzida em modelo de hipertensão 2K1C. Esses achados são consistentes com a ideia de que antioxidantes podem ajudar a prevenir a hipertrofia cardíaca induzida pela hipertensão (RIZZI et al. 2013). Tempol também diminuiu o estresse oxidativo aórtico induzido pela hipertensão e a atividade aumentada da MMP-2 (DE MELLO et al. 2019)

Diante disso, substâncias antioxidantes como o Tempol, necessitam ser investigadas tanto quanto ao seu potencial em prevenir a progressão ou o aparecimento de doença cardiovascular, quanto ao seu potencial em regular de alguma forma as MMPs através da regulação do estresse oxidativo. Assim, novos estudos são necessários para avaliar os mecanismos envolvidos na regulação de MMPs e doenças cardiovasculares e o potencial efeito desses antioxidantes sobre esses fatores, podendo apresentar maior efetividade, menor custo e baixa toxicidade. Levando em consideração que a MMP-2 é capaz de ativar vias pró-oxidantes e assim aumentar o estresse oxidativo (PRADO et al. 2018; LOVETT et al. 2013). *A hipótese deste estudo é de que a MMP-2 induz alterações bioquímicas e estruturais no coração pelo aumento de ERO.*

2. Objetivo

Avaliar o efeito do antioxidante Tempol nas alterações bioquímicas e estruturais induzidas pela metaloproteinase da matriz 2 no coração.

2.1. Objetivos específicos

- Produzir a MMP-2 recombinante em bactéria E. coli;
- Avaliar os efeitos estruturais da rhMMP-2 no coração dos animais tratados;
- Avaliar os efeitos da rhMMP-2 na produção de ERO no coração dos animais tratados;

- Avaliar a expressão, TNF- α e TGF- β no coração dos animais com a rhMMP2 na presença ou não do Tempol;

3. Metodologia

3.1. Obtenção da rhMMP-2

3.1.1. Construção do plasmídeo contendo a sequência de DNA da MMP-2 humana (rhMMP2)

Para clonagem do sítio catalítico da MMP-2 (catMMP-2), utilizamos um clone previamente caracterizado (GONÇALVES et al., 2012). Este clone, denominado pET5a_rhMMP-2, contém a sequência humana completa da região codificadora da MMP-2 recombinante humana (rhMMP-2) inserida nos múltiplos sítios de clonagem do vetor plasmidial pET5a, o sítio de restrição em EcoRI.

3.1.2. Expressão e purificação da rhMMP-2

O clone da rhMMP-2 foi cultivado em meio Luria-Bertani (LB) (extrato de levedura: 5 g/L, NaCl: 10 g/L; tritpton 10 g/L e agar: 15 g/L) contendo 100 μ g/mL de ampicilina, seguido de incubação em estufa a 37°C por 12-16 h. O pré-inóculo foi preparado selecionando uma colônia, que foi cultivada em 30 mL de meio LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina, que ficou sob rotação a 200 rpm em agitador a 37°C, por 12-16 h. No dia seguinte, 10 mL do pré-inóculo foi expandido em 1 litro de meio LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina, seguido de incubação em agitador sob rotação de 200 rpm a 37°C, por aproximadamente 3 h até obtenção de densidade ótica (OD600) de 0,5-0,7. Para indução da expressão proteica foi adicionado 50 μ mol/L de isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) ao meio de cultura, o qual ficou sob agitação a 200 rpm a 18°C por 8-10 h. Para purificação da proteína, as células bacterianas foram centrifugadas a 4000 g, por 15 min. O precipitado bacteriano foi ressuspenso em 25 mL de tampão TNC [Tris (50 mmol/L), NaCl (150 mmol/L), CaCl₂ (10 mmol/L), Brij 35 (0,005%) contendo 2 mM dos inibidores de protease: fenantrolina (PHE, Sigma, St Louis, MO, USA), phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF, Sigma) e N-ethylmaleimide (NEM, Sigma)]. Para auxiliar na quebra da parede bacteriana foi adicionado a esta solução, 10 μ g/mL de lisozima (Sigma), seguido de incubação em gelo por 30 min. Em seguida, a amostra foi submetida a 10 ciclos de 10 seg. de sonicação com intervalo de 10 seg. entre cada ciclo. O lisado bacteriano foi centrifugado a 18.000 g por 30 min. e o sobrenadante foi submetido à coluna de gelatinasefarose

(Gelatin Sepharose™ 4B, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) e a corrida cromatográfica foi realizada no aparelho Äkta Prime Plus (GE Healthcare) em temperatura controlada a 4°C. Após passagem da amostra na coluna, foram realizadas as seguintes lavagens: com 60 mL de tampão TNC, uma lavagem com 60 mL de TNC contendo Triton X114 (0,1% v/v, Sigma) para remover o LPS da amostra (Reichelt et al., 2006), outra lavagem com 60 mL de tampão TNC e a seguir a proteína foi eluída da coluna com 60 mL de TNC contendo DMSO (5% v/v, Sigma). Os volumes dos tampões foram calculados com base na altura da coluna (10-12 cm). A proteína eluída da coluna foi concentrada em concentradores do tipo Amicon com membrana de 30 kDa de "cut-off" (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) sob rotação de 4.000 g a 4°C no volume de 60 mL (contendo os inibidores descritos acima). A seguir, a proteína foi concentrada 60 vezes e lavada 2 vezes em água Milli-Q gelada para retirada do DMSO e inibidores. As amostras foram separadas em alíquotas e armazenadas a -70°C.

3.1.3. Quantificação da rhMMP-2

A quantificação de MMP-2 foi realizada utilizando o kit BCA protein, utilizando albumina como padrão. A leitura foi feita em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm.

3.1.4. Avaliação da expressão e atividade da rhMMP-2

Amostras foram coletadas durante todo o processo de indução de expressão e purificação da catMMP-2/GFP. Essas amostras foram submetidas à eletroforese convencional SDS-PAGE 12% ou géis co-polimerizados com gelatina como substrato (zimografia em gel). Os géis SDS-PAGE foram corados pelo método de prata (Nesterenko et al., 1994) para avaliar a pureza da proteína recombinante e a atividade da proteína foi avaliada por zimograma em gel e fluorimetria.

3.1.5. Coloração de prata

As amostras foram misturadas ao tampão de amostra redutor [SDS (2%, Sigma), Tris Base (125 mmol/L), glicerol (10% v/v), azul de bromofenol (0,001%) e 2- mercaptoethanol (2% v/v, Sigma)]. Após a eletroforese, o gel foi imerso em solução fixadora [metanol (50% v/v, Merck Millipore), ácido acético (12% v/v, Merck Millipore) e formaldeído (0,018% v/v, Sigma)]. Após fixação, o gel foi lavado três vezes em etanol (50% v/v, Sigma) a cada dez min. e depois tratado

com tiosulfato de sódio (0,2%, Sigma) por trinta seg. Depois, o gel foi lavado três vezes em água Milli-Q a cada dez seg., e foi imerso em solução corante contendo nitrato de prata (0,2%, Sigma) e formaldeído (0,027% v/v) durante dez min. Em seguida, o gel foi lavado duas vezes em água Milli-Q a cada dez seg. e foi revelado com a solução reveladora [carbonato de sódio (6%, Sigma), tiosulfato de sódio (0,002% v/v) e formaldeído (0,018% v/v)]. Após revelação do gel, o mesmo foi lavado duas vezes em água Milli-Q a cada um min. e depois foi imerso em solução contendo metanol (50% v/v) e ácido acético (12% v/v) para parar de revelar.

3.1.6. Zimografia em gel

Amostras foram misturadas ao tampão de amostra não redutor [SDS (2%), Tris Base (125 mmol/L), glicerol (10% v/v) e azul de bromofenol 0,001%] e aplicadas em géis de poliacrilamida a 12% contendo gelatina (0,1%, Sigma). Após eletroforese, os géis foram submetidos a dois banhos de 30 min. com Triton X-100 (2% v/v, Sigma), para remover o SDS do gel. Em seguida, os géis foram incubados em solução Tris (50 mmol/L) contendo CaCl₂ (10 mmol/L), por 18 h a 37°C para permitir a degradação da gelatina presentes nos géis. Por último, os géis foram colocados em solução corante [metanol (30% v/v), ácido acético (10% v/v) e Coomassie Blue (0,05%)] por 3 h para corar de azul a gelatina presente no gel. A degradação da gelatina (bandas brancas) foi visualizada descorando os géis com solução descorante [metanol (30% v/v) e ácido acético (10% v/v)]. As bandas brancas foram visualizadas porque as MMPs presente no gel degradaram a gelatina naquele local. Portanto, não havia gelatina para o corante Coomassie Blue corar. Em todos os géis foi aplicado um marcador de peso molecular (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas, Ontario, Canadá). As fotos dos géis serão quaticadas pelo image J.

3.1.7. Atividade de MMP-2 por fluorímetro

Após dosagem de proteína dos lotes, 1 µg de amostra foi utilizada para avaliar atividade utilizando DQ gelatin[®] (1 ug/ml). O ensaio foi realizado em placa preta opaca (PerkinElmer[®]) no volume total de 200 µl. O Tampão utilizado para o ensaio foi o Tris (50mM) contendo CaCl₂ (10 mM, ph 7,4) em quantidade para completar o volume do poço. A placa foi lida em fluorímetro (VICTOR Multilabel Plate Reader X) com excitação de 480nm e emissão de 520nm, 37°C, por 1h.

3.2. Tratamento *in vivo*

Para o tratamento *in vivo* foram utilizados camundongos C57BL/6 [Wild type (Wt)]. Os animais foram alojados em gaiolas, sendo mantidos sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e em ciclo alternado de 12 horas de claro/escuro. Água e comida serão fornecidas *ad libitum* durante os experimentos. O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPA sob o parecer nº 6175230518. Os animais foram divididos em 4 grupos de tratamento contendo 7 animais cada, sendo: grupo 1, Salina (receberá salina a 0,9%); grupo 2, TEMPOL (Tempol 18 mg/kg/v.o); grupo 3, MMP-2 (MMP-2 150 ng/kg/i.p); grupo 4, MMP-2+ TEMPOL (Tempol 18 mg/kg/v.o + MMP-2 150 ng/kg/i.p); As doses das drogas foram selecionadas em trabalhos previamente publicados (CASTRO et al, 2009; CHANG et al, 2010; PRADO, 2015; PRADO et al, 2018). O tratamento foi realizado em 4 semanas conforme o seguinte esquema (Figura 4):

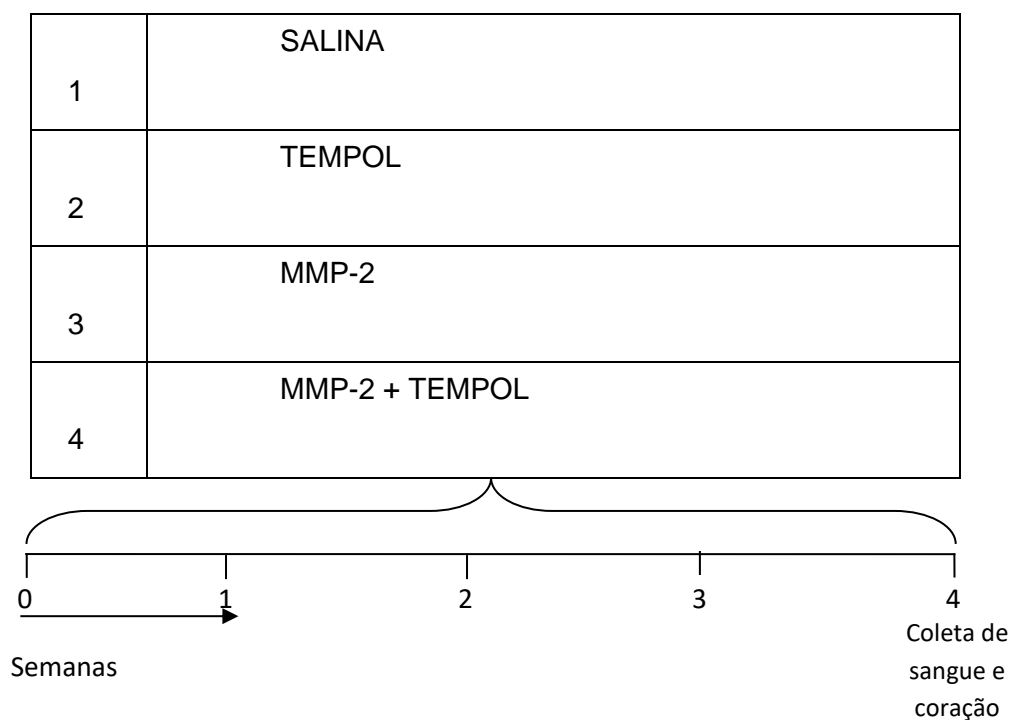


Figura 4. Esquema demonstrando o protocolo de tratamento.

Após o término do tratamento farmacológico, os animais foram anestesiados com quetamina (90mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e submetidos à eutanásia por exsanguinação para a coleta do coração.

3.3. Quantificação de Colágeno no coração

Para as análises morfológicas, partes do coração foram isolados e congelados em líquido de crioproteção (Tissue Tek, Sakura Finetek). O coração antes de ser congelado foi imerso em solução de KCl (50 mmol/L) para permanecer em fase de diástole. Os corações foram emblocados com as metades cortadas, voltadas para cima. Os blocos foram cortados (10 µm de espessura) em criostato (CM 1900; Leica). Após foi realizada a coloração de *Picro sirius*, com o objetivo de analisar a quantidade de colágeno. O colágeno no tecido cardíaco foi analisado por microscópio de luz branca (Zeiss). As imagens foram quantificadas no programa *Image J*.

3.4. Quantificação dos níveis de ERO por microscopia de fluorescência do Coração

O ensaio no coração foi realizado em corações congelados em líquido de crioproteção (Tissue Tek, Sakura Finetek), os blocos foram cortados (10 µm de espessura) em criostato (CM 1900; Leica). Os cortes foram incubados com sonda DHE (10 µmol/L) durante 30 min, a 37°C, preparada em PBS (Sigma), pH 7,4. As ERO no tecido cardíaco foram analisadas por microscópio de fluorescência (Zeiss). As imagens foram quantificadas no programa *Image J* e as ERO foram expressas em unidades arbitrária de intensidade de fluorescência.

3.5. Atividade da catalase

A atividade da enzima catalase foi medida após a reação das amostras com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para formar formaldeído, que foi revelado pelo tratamento com reagente Purpald® 34,2 mM (4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1, 2, 4-triazol). Os resultados foram expressos em formaldeído/min/mg de proteína, determinado por comparação da absorbância a 540 nm (BIO-RAD Leitor de Microplacas Modelo 450) com uma curva padrão para formaldeído 4,25 µM (Johansson and Borg, 1988; Wheeler et al., 1990).

3.6. Imunofluorescência para o fator de necrose tumoral alfa (TNFα), no coração

Cortes congelados de coração com 10 µm de espessura foram fixados em formalina 4% por 10 min. e incubados com solução de bloqueio de PBS contendo BSA (1%), soro normal de cavalo (10% v/v), glicina (0,3 mol/L) e Tween (0,1%

v/v) por 60 min., a 37°C, para bloquear as ligações inespecíficas e permeabilizar o tecido. Após o bloqueio, os cortes foram incubados com anticorpo primário policlonal produzido em coelho anti-TNF α (1:100; Sigma), por 12 h, a 4°C. O anticorpo secundário utilizado foi produzido em cabra anti-IgG de coelho conjugado com Cy5 (1:500, AB6949, GE) e foi incubado por 60 min., temperatura ambiente. As lâminas foram montadas com solução de Fluoroshield contendo DAPI (F6057, Sigma) e as imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência (Zeiss), utilizando objetiva de imersão em óleo (aumento de 40x). As imagens foram quantificadas com o programa image J e o resultado expresso em intensidade de fluorescência

3.7. Imunofluorescência para o TGF- β , no coração

Cortes congelados de aorta com 10 μ m foram fixados e bloqueados conforme os métodos descritos na imunofluorescência anti-TNF α nos corações. Após o bloqueio, os cortes foram incubados com anticorpo primário monoclonal produzido em camundongo anti-TGF- β (1:100, SC65378, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA), por 12h, a 4°C. O secundário utilizado foi produzido em cabra conjugado com Cy3. Os anticorpos secundários foram incubados por 60 min., temperatura ambiente. As lâminas foram montadas com solução de Fluoroshield contendo DAPI (F6057, Sigma) e as imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência (Zeiss), utilizando objetiva de imersão em óleo (aumento 40x).

3.8. Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística, onde cada parâmetro foi analisado inicialmente em relação aos possíveis pontos discrepantes (outliers), sendo utilizado o cálculo do intervalo interquartil. Para cada parâmetro analisado foi realizada Análise Variância (ANOVA) uma via seguida do teste de Tukey para a comparação de pares de médias. Para verificação de possível correlação entre parâmetros, foi realizado o teste de correlação de Pearson. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$.

4. Resultados

4.1. Purificação da MMP-2 recombinante

Após o processo de purificação em coluna de gelatina-sefarose, foi observado através da aplicação em gel SDS-PAGE e zimograma que os lotes

obtidos da rhMMP-2 estão puros (Figura 5A) e com atividade (Figura 5B), apresentando uma banda ativa (~70KDa).

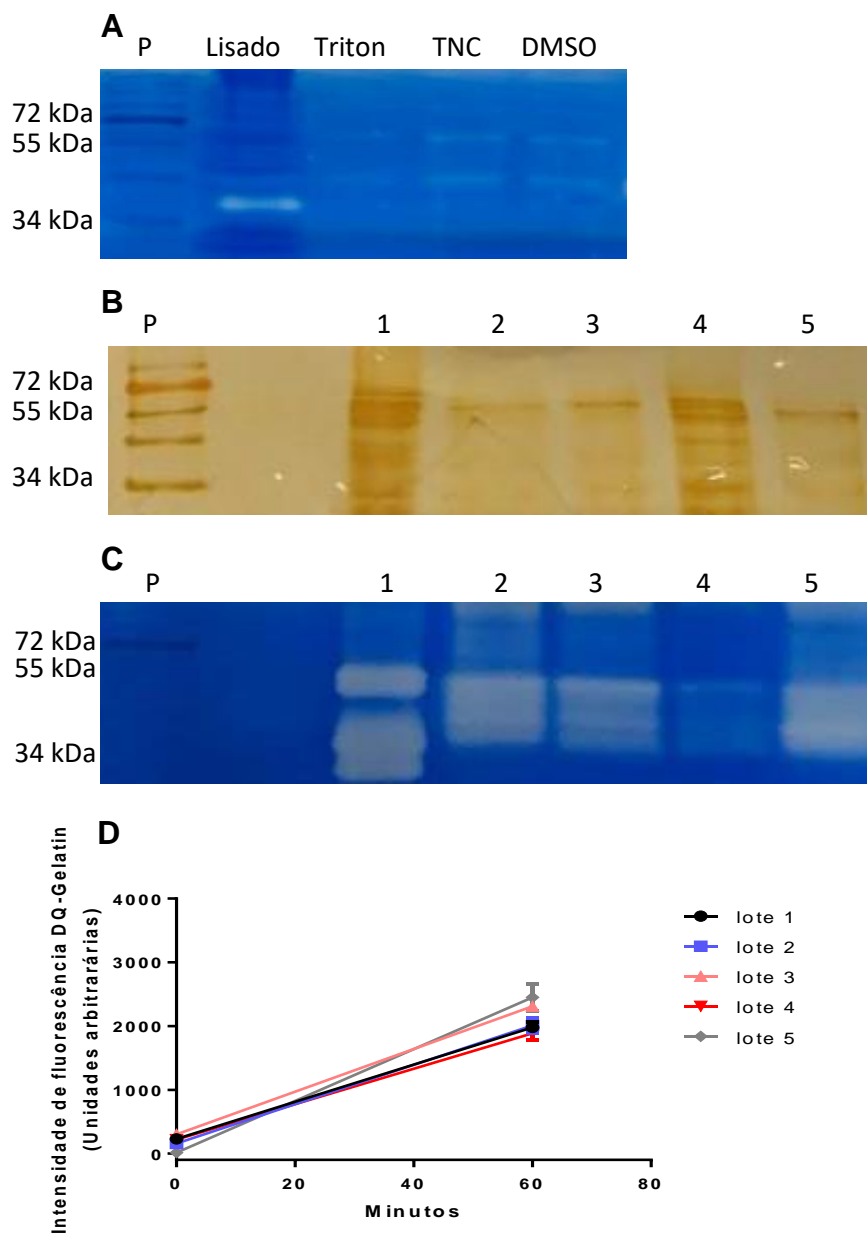


Figura 5: Pureza e atividade da rhMMP-2 após purificação em coluna de gelatina-sefarose.

A. Figura representativa de zimograma dos flows coletados durante a purificação em coluna de gelatina sefarose; Lisado, lisado bacteriano; Triton, TNC contendo Triton X114 (0,1% v/v); TNC, tampão TNC; DMSO, TNC contendo DMSO (5% v/v); **B.** Figura representativa de gel SDS-PAGE corado pela prata. Os números representam lotes: Lote 1, Lote 2, Lote 3, Lote 4 e Lote 5. **C.** Figura representativa de zimograma. Números representam lotes: Lote 1, Lote 2, Lote 3, Lote 4 e Lote 5. **D.** Gráfico das dosagens de proteínas no fluorímetro, expresso em média \pm EPM.

4.2. Peso corporal dos animais durante o tratamento

Os animais também foram pesados durante as quatro semanas de tratamento, o que nos mostrou que todos os grupos experimentais apresentaram aumento de peso constante e que não houve diferença significativa entre os quatro grupos experimentais ($P>0,05$) (Figura 6).

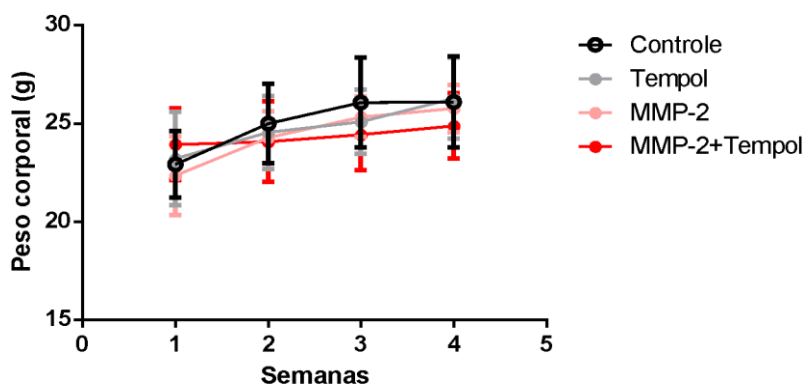


Figura 6. Média dos pesos dos animais durante o período de tratamento. $P>0,05$

4.3. Razão entre o peso do coração e o peso corporal dos animais

Não houve diferença na média de peso dos animais ($P>0,05$). No entanto, no grupo tratado com rhMMP-2 e Tempol houve uma diminuição dos pesos dos corações e na razão peso coração/peso corporal, comparados ao grupo controle ($P<0,05$).

	Controle	Tempol	MMP-2	MMP-2+Tempol
Peso corporal (g)	25,7 ± 1,0	24,9 ± 0,8	26,0 ± 0,2	24,9 ± 0,7
Peso do coração (mg)	101,9 ± 10,9	99,5 ± 5,3	77,4 ± 7,9	58,3 ± 5,1
Razão peso do coração / peso corporal (mg)	3,9 ± 0,3	4,0 ± 0,3	2,9 ± 0,2	2,3 ± 0,1

Tabela 1. Os dados representam a média ± EPM One-Way ANOVA ($n=7$ /grupo), considerando $P < 0,05$

4.4. Quantificação de colágeno no coração

Na marcação para colágeno, o Tempol foi capaz de diminuir o colágeno intersticial no coração dos animais tratados com a rhMMP-2 ($P < 0.05$), como mostrado na figura 7.

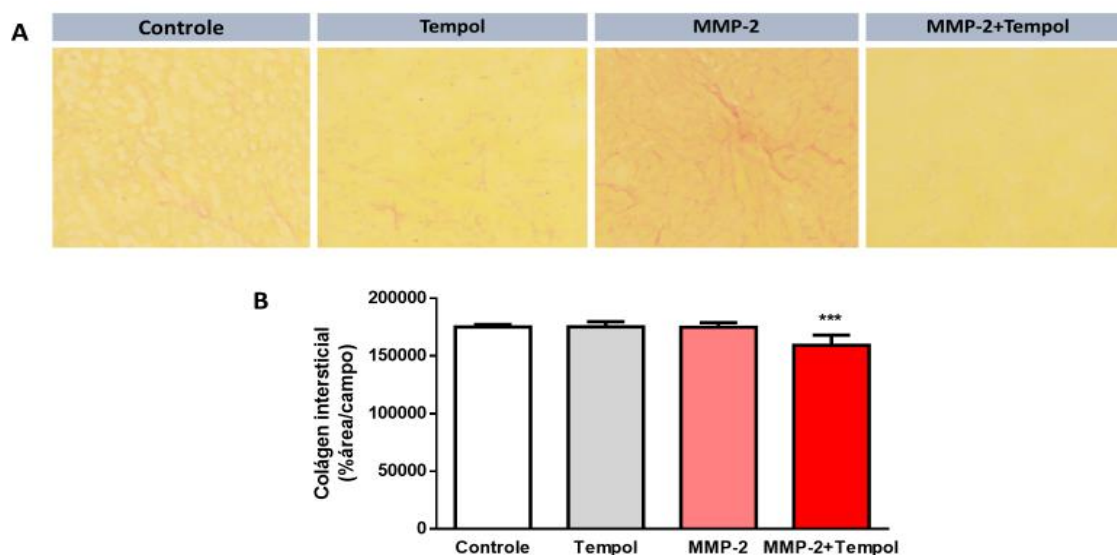


Figura 7. Quantificação de colágeno no coração. **A.** imagens representativas da coloração de *Picro sirius* no coração, o colágeno está marcado na cor vermelha. **B.** gráfico da média \pm EPM do colágeno no coração. One-Way ANOVA ($n=7$ /grupo), considerando $P < 0.05$.

4.5. Níveis de ERO no coração

O de ensaio DHE mede as ERO diretamente nas células vivas. O DHE ao ser oxidado pelo superóxido para formar 2-hidroxi-etídio (2-OH-E⁺) ou por oxidação não específica por outras fontes de ERO para formar etídio (E⁺). Dada sua estreita faixa espectral, distinguir entre as duas espécies usando sistemas ópticos baseados em filtros é muitas vezes difícil, por tanto a geração de ERO é representada como fluorescência total do DHE.

Com isso, podemos observar na figura 8B que o tratamento dos animais com rhMMP-2 aumentou os níveis de ERO no coração, em relação ao controle ($P > 0,05$). No entanto, no grupo MMP-2+Tempol, o tempol foi capaz de reduzir significativamente os níveis de ERO no coração, comparado ao grupo MMP-2 ($P < 0.05$). O que também pode ser observado na figurara 8A que mostra imagens representativas da fluorescência DHE em cada grupo de tratamento.

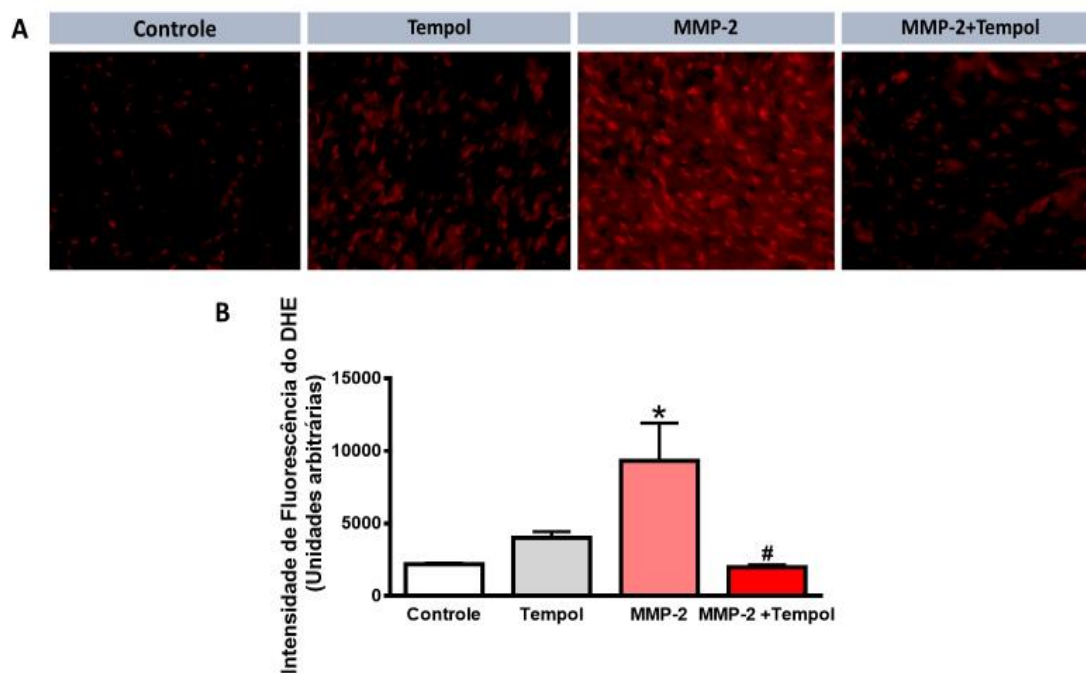


Figura 8. Níveis de ERO no coração. A. Fotomicrografias representativas ilustrando a marcação nuclear com a sonda DHE que representa os níveis de ERO marcados em vermelho. B. Gráfico da média \pm EPM das ERO no coração. One-Way ANOVA (n=7/grupo), considerando $P < 0.05$.

4.6. Atividade da catalase no coração

Na figura 9 podemos observar que o tratamento com a rhMMP-2 e Tempol foi capaz de aumentar a atividade da catalase, comparado ao grupo MMP-2 ($P < 0.05$).

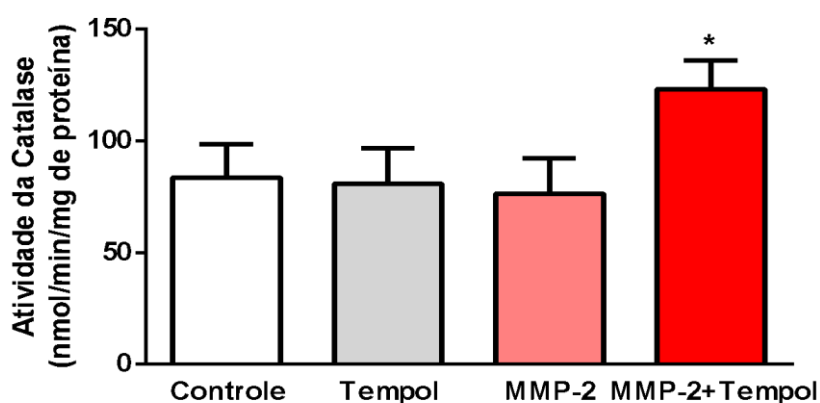


Figura 9. Atividade da catalase no coração. Gráfico da média \pm EPM da catalase no coração. One-Way ANOVA seguido de teste T (n=7/grupo), considerando $P < 0.05$.

4.7. Imunofluorescência de TNF- α no coração

O painel 10A mostra a expressão de TNF- α no coração, marcado em vermelho. Os animais tratados com MMP-2 apresentam aumento na expressão de TNF- α comparado com o grupo controle ($P < 0,05$). No entanto o Tempol não foi capaz de diminuir a expressão de TNF- α significativamente nos animais tratados com MMP-2 ($P > 0,05$) (figura 9B)

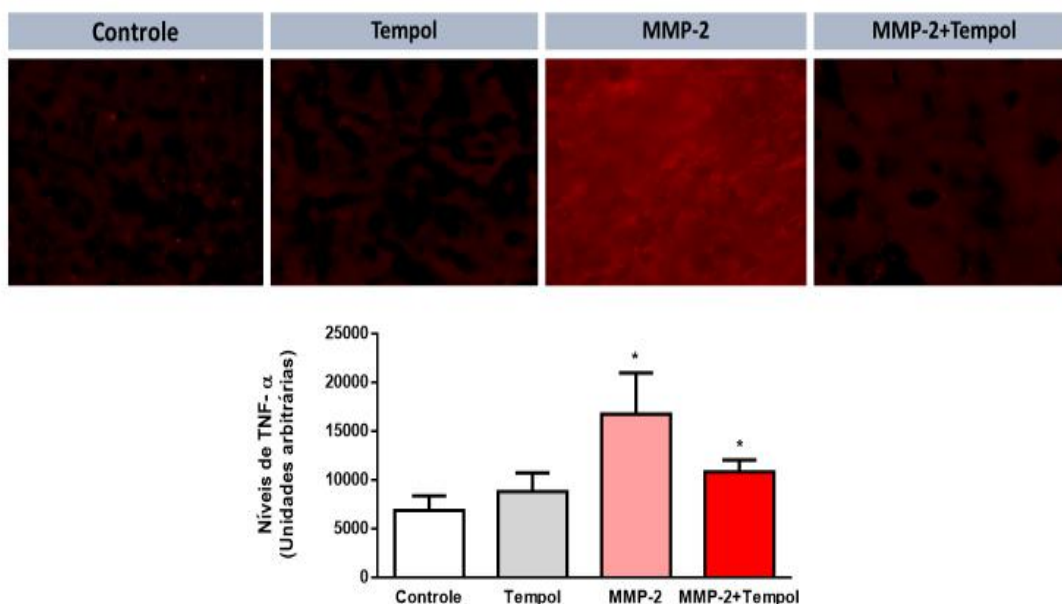


Figura 10. Expressão de TNF- α no coração. **A.** Fotomicrografias representativas de imunofluorescência com marcação para TNF- α , marcado em vermelho, representativas de cada grupo de tratamento. **B.** Gráfico mostrando a média \pm EPM de TNF- α para cada grupo de tratamento. One-Way ANOVA ($n=7$ /grupo), considerando $P < 0.05$.

4.8. Níveis de TGF- β no coração

Os resultados mostraram que o tratamento com rhMMP-2 aumentou a expressão de TGF- β em relação ao grupo controle ($P < 0.05$). Já o tratamento com Tempol, nos animais tratados com rhMMP-2, foi capaz de reduzir a expressão de TGF- β , comparado aos níveis do grupo controle ($P > 0.05$), como mostrado na figura 11, na marcação de TGF- β em verde.

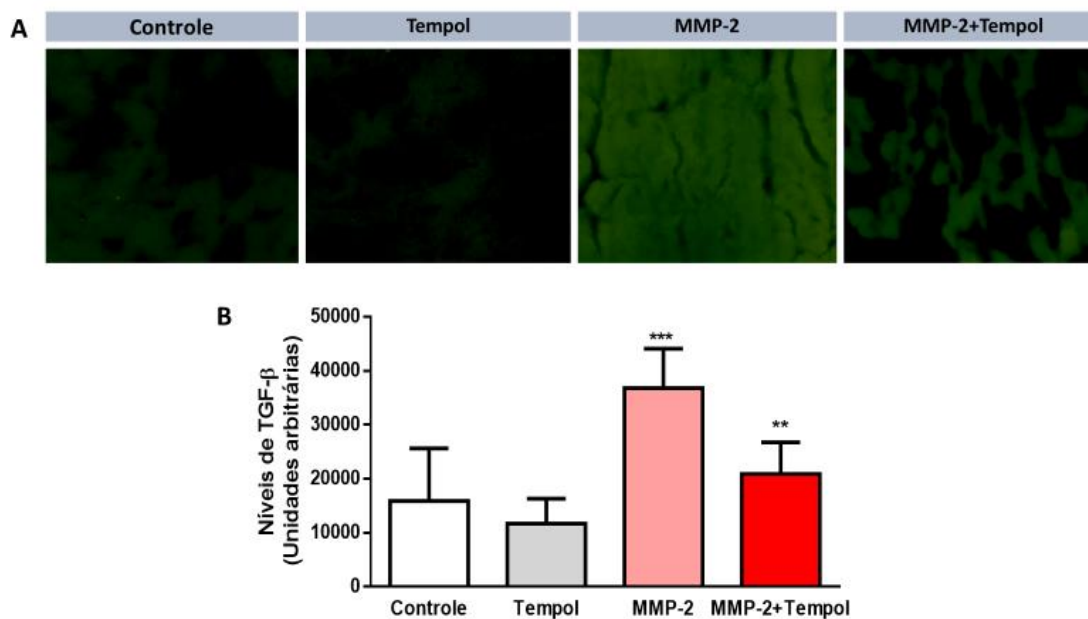


Figura 11. Expressão TGF- β no coração. A. Imagens representativas da imunofluorescência de cada grupo de tratamento, com marcação para TGF- β em verde. B. Gráfico mostrando média \pm EPM de TGF- β no coração, para cada grupo de tratamento. One-Way ANOVA (n=7/grupo), considerando $P < 0.05$.

5. Discussão

Este trabalho mostrou pela primeira vez que o antioxidante Tempol é capaz de prevenir e/ou atenuar o aumento de estresse oxidativo, aumento de TNF- α e TGF- β em corações de camundongos após quatro semanas de infusão de rhMMP-2. Schnackenberg e Wilcox (1999) já relacionaram o Tempol à diminuição do estresse oxidativo. Luo (2009) mostrou que o Tempol preveniu a geração de $O_2^{\cdot-}$ em células do músculo liso vascular (VSMC). A administração oral de Tempol em ratos preveniu o efeito do TNF α para aumentar a produção $O_2^{\cdot-}$ pela subunidade do complexo 1 mitocondrial em células cardíacas, enquanto a apocinina, que inibe NADPH oxidase, não foi eficaz, demonstrando assim a capacidade do Tempol de inibir ERO derivadas de mitocôndria (MARIAPPAN et al., 2009).

De fato, a administração oral de Tempol ($18\text{mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ por 8 semanas) evitou a geração excessiva de ERO sistêmica e vascular, a expressão e atividade aórtica de MMP-2 e a remodelação vascular em um modelo de rato com hipertensão 2K, 1C (CASTRO et al., 2009). Assim, uma redução de MMP-2 pode contribuir para os efeitos do Tempol na redução da remodelação e inflamação vascular e cardíaca (CHOW et al., 2007). Por tanto, nossos

resultados podem sugerir que as alterações cardíacas induzidas pela rhMMP-2 podem ser decorrentes da inflamação e do estresse oxidativo.

Além disso, o Tempol também aumentou a atividade da catalase nos corações tratados com rhMMP-2. A catalase é uma enzima que faz parte da defesa antioxidante do organismo. Esta enzima catalisa uma reação na qual o peróxido de hidrogênio é decomposto em água e oxigênio (Nakamura et al, 2010). Diferentemente, Sainz et al (2005) mostrou que a atividade da catalase no coração não foi afetada pelo tempol, em modelo de hipertensão por aumento de óxido nítrico. Vaziri et al (2003) relatou que o Tempol também não teve efeito significativo sobre atividade da catalase no coração de ratos com hipertensão induzida pelo chumbo. Com isso nosso resultado sugere que o Tempol é capaz de aumentar a atividade da catalase no coração, em situações de estresse induzido por MMP-2.

Anteriormente foi mostrado que a mmp-2 pode aumentar o estresse oxidativo e a inflamação (PRADO et al, 2018; LOVETT et al, 2012). Sabe-se que existe um “*cross-talk*” entre MMPs e estresse oxidativo, podendo ativar MMP-2. Lovett et al (2012) mostrou que a MMP-2 é capaz de alterar vários genes cardíacos causando inflamação. Corroborando com esses resultados nós observamos que o tratamento com MMP-2 aumentou a expressão de TNF- α nos corações dos animais e o Tempol impediu esse aumento. Nesse contexto, sabe-se que o TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que regula uma rede de sinalização complexa que pode desencadear a sobrevivência ou a morte celular e que induz disfunção cardíaca e morte celular (BRENNER et al, 2015; D'ASCIA et al., 2006). Esta citocina envolvida em uma ampla gama de processos homeostáticos e fisiopatológicos, como imunidade, inflamação, proliferação celular, apoptose e metabolismo lipídico (YUAN et al, 2020).

Em modelo animais hipertensos 2K1C o tratamento crônico com inibidores do TNF- α diminuiu a remodelação vascular, a formação de ERO e inibiu a ativação de MMP, independentemente de seus efeitos anti-hipertensivos. Provavelmente, a atenuação na formação de ERO causada por inibidores do TNF- α contribuiu para a redução da atividade da MMP-2 encontrada em ratos hipertensos tratados (MATTOS et al 2020). A morte celular necrótica dependente de TNF- α , mas independente da caspase, demonstrou envolver ERO que

poderiam ser derivadas de fontes mitocondriais ou não mitocondriais (FIERS et al, 1999; VANDENABEELE et al, 2010).

Esta correlação entre TNF- α e ERO acrescenta outra camada de complexidade à rede de sinalização de TNF- α porque ERO atuam em muitas proteínas necessárias para regular a homeostase celular, incluindo aquelas que medeiam a proliferação celular, sobrevivência, morte, diferenciação, reparo de DNA e metabolismo (BLASER et al, 2016). Um sinal de morte iniciado por TNF- α pode ser influenciado por ERO mitocondriais, que contribuem para a apoptose induzindo a permeabilização da membrana externa mitocondrial (WIN et al, 2014). TNF- α e ROS participam de um ciclo de feedback positivo, onde por um lado, a geração de ERO é induzida por citocinas; por outro, as ERO podem estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias ao ativar o NF- κ B (MORGAN et al, 2011). Assim, nossos resultados sugerem que o aumento do TNF- α está envolvido no aumento de estresse oxidativo pela MMP-2.

Citocinas como TGF- β e TNF α , são ativadas por ERO e podem mediar as respostas fibróticas ou a transformação celular epidérmica para mesenquimal. (WILCOX, 2010). A MMP-2 é uma MMP especializada em degradar componentes da matriz extracelular como o colágeno. Interessantemente trabalhos mostram que o aumento de MMP-2 no coração aumenta a produção de colágeno causando uma fibrose cardíaca. Sabe-se que este processo é decorrente do aumento da expressão de TGF- β . Wang et al (2006) mostraram que a ativação de TGF- β é dependente, pelo menos em parte, de um aumento concomitante da atividade de MMP-2 associado à idade. Estudos também mostraram que a MMP-2 aumentou a atividade de TGF- β , colágeno e fibronectina dentro dos anéis aórticos ou CMLV de ratos jovens para os níveis que ocorrem em animais idosos. Todos esses efeitos foram substancialmente reduzidos pela inibição de MMP-2 (WANG et al, 2006). Wang et al (2005) mostrou que os efeitos induzidos pela Ang II em MMP2, TGF- β , colágeno e CMLV são centrais para a remodelação arterial que acompanha o avanço da idade. Além disso, a inibição de MMP previne a degeneração da elastina, deposição de colágeno e aumento da pressão arterial associada ao envelhecimento arterial em ratos por intervenção na rede de sinalização pró-inflamatória MCP-1 / TGF- β 1 / ET-1 (WANG et al, 2012).

Wang et al (2015) mostrou que aumento de mmp-2 ocorre concomitante com o aumento de TGF- β . E a ativação de TGF- β associada a MMP facilita a fibrose arterial. A clivagem de MMP da rede de elastina libera a proteína-1 de ligação a TGF beta latente ligada à fibrilina-1 (LTBP-1). Além disso, a MMP-2 cliva o LTBP-1 passo a passo, levando à ativação de TGF- β , aumentando a produção de VSMC de colágeno I, II e III e fibronectina (WANG et al, 2014; LAKATTA, 2013). Esses dados indicam que a elastólise e a fibrose podem ser duas faces separadas da mesma moeda. A ativação da calpaína-1 leva à ativação de MMP-2, ativação de TGF- β 1 e produção de colágeno em VSMCs (JIANG et al, 2012). Corroborando com estes achados, os nossos animais tratados com mmp2 mostraram aumento no TGF- β e foram atenuados por Tempol. Rizzi et al (2013) mostrou que o Tempol é capaz de reduzir a fibrose cardíaca em ratos hipertensos renais pela redução de mmp2 e TGF- β no coração. Os efeitos do Tempol na geração de ERO em fibroblastos foram bem estudados. A geração de $O_2^{\cdot-}$ pela xantina + xantina oxidase no meio de cultura de fibroblastos pulmonares aumentou o $O_2^{\cdot-}$ TGF- β e colágeno intracelular. Esses efeitos foram relacionados ao $O_2^{\cdot-}$ e não ao H_2O_2 e foram evitados pelo Tempol (Qi et al, 2009).

A administração oral de Tempol e apocinina juntas ($120 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de cada por quatro semanas) a ratos infundidos com Ang II atenuou a expressão cardíaca de NADPH oxidase, MMP-1 e -2, TGF- β e colágeno- 1, e reduziu a fibrose cardíaca (ZHAO et al., 2008). De fato, o Tempol bloqueou ERO e respostas hipertróficas ao peptídeo natriurético atrial em miócitos cardíacos neonatais de ratos (Laskowski et al, 2006). Tempol bloqueou a fibrose cardíaca, proliferação de miofibroblastos e acúmulo de colágeno cardíaco produzido por uma infusão de Ang II (Zhao et al, 2008). Assim, o Tempol pode interromper um ciclo de alimentação em que as MMP-2/ERO ativam citocinas, como TNF α e TGF- β , que aumentam ainda mais a geração de ERO no coração, que promovem o acúmulo de matriz e, assim, levam a mais fibrose e danos cardíacos.

6. Conclusões

Este trabalho mostrou pela primeira vez que o antioxidante Tempol é capaz de prevenir e/ou atenuar o aumento de estresse oxidativo, aumento de TNF- α e TGF- β , além de aumentar a atividade da catalase em corações de camundongos após quatro semanas de infusão de rhMMP-2. Nossos resultados podem sugerir que as alterações cardíacas induzidas pela rhMMP-2 podem ser decorrentes da inflamação e do estresse oxidativo. Processos esses que foram diminuídos pelo Tempol, tendo assim potencial para interromper um ciclo de alimentação em que as MMP-2/ERO ativam citocinas, como TNF α e TGF- β , que aumentam ainda mais a geração de ERO no coração, que promovem o acúmulo de matriz e, assim, levam a mais fibrose e danos cardíacos.

7. Referências

ALI, Mohammad AM et al. Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. **Circulation**, v. 122, n. 20, p. 2039-2047, 2010.

ALI, Mohammad AM et al. Hydrogen peroxide-induced necrotic cell death in cardiomyocytes is independent of matrix metalloproteinase-2. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 6, p. 1686-1692, 2013.

AMIN, Matthew et al. Regulation and involvement of matrix metalloproteinases in vascular diseases. **Frontiers in bioscience** (Land Mark edition), v. 21, p. 89, 2016.

AZEVEDO, Aline et al. Matrix metalloproteinases are involved in cardiovascular diseases. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 115, n. 4, p. 301-314, 2014.

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BERGMAN, M R, Teerlink JR, Mahimkar R, Li L, Zhu BQ, Nguyen A, Dahi S, Karliner JS, Lovett DH. Cardiac matrix metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic dysfunction. **American Journal of Physiology-Heart Circulatory Physiology**. 2007 Apr;292(4):H1847-60. doi: 10.1152/ajpheart.00434.2006. Epub 2006 Dec 8. PMID: 17158653.

BERGMAN, Marina R. et al. Cardiac matrix metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic

dysfunction. **American journal of physiology-heart and circulatory physiology**, v. 292, n. 4, p. H1847-H1860, 2007.

BERNARDY, Catia CF et al. Tempol, a superoxide dismutase mimetic agent, inhibits superoxide anion-induced inflammatory pain in mice. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.

BRENNER, Dirk; BLASER, Heiko; MAK, Tak W. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 6, p. 362-374, 2015.

BLASER, Heiko et al. TNF and ROS crosstalk in inflammation. **Trends in cell biology**, v. 26, n. 4, p. 249-261, 2016.

CASTRO, Michele M. et al. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 9, p. 1298-1307, 2009.

CARROLL, Richard T. et al. 4-Hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (Tempol) inhibits peroxynitrite-mediated phenol nitration. **Chemical research in toxicology**, v. 13, n. 4, p. 294-300, 2000.

CHANG, William YC; CLEMENTS, Debbie; JOHNSON, Simon R. Effect of doxycycline on proliferation, MMP production, and adhesion in LAM-related cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 299, n. 3, p. L393-L400, 2010.

CHOI, Hyehun et al. C-Jun N-terminal kinase attenuates TNF α signaling by reducing Nox1-dependent endosomal ROS production in vascular smooth muscle cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 86, p. 219-227, 2015.

CHOW, A. K.; CENA, J.; SCHULZ, R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. **British journal of pharmacology**, v. 152, n. 2, p. 189-205, 2007.

COUSSENS, Lisa M.; FINGLETON, Barbara; MATRISIAN, Lynn M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer—trials and tribulations. **Science**, v. 295, n. 5564, p. 2387-2392, 2002.

CUI, Ning; HU, Min; KHALIL, Raouf A. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. In: Progress in molecular biology and translational science. **Academic Press**, 2017. p. 1-73.

D'ASCIA, Cristoforo et al. Effects of biventricular pacing on interstitial remodelling, tumor necrosis factor- α expression, and apoptotic death in failing human myocardium. **European heart journal**, v. 27, n. 2, p. 201-206, 2006.

DECOUX, Ashley et al. Myocardial matrix metalloproteinase-2: inside out and upside down. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 77, p. 64-72, 2014.

DE MELLO, Marcela M. Blascke et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation by oxidative stress decreases aortic calponin-1 levels during hypertrophic remodeling in early hypertension. **Vascular pharmacology**, v. 116, p. 36-44, 2019.

DO PRADO, Alejandro Ferraz et al. Exogenous Matrix Metalloproteinase 2 (MMP-2) Enters the Vascular Tissue and Induces Increased Aortic Contraction Via ROS Generation. **Free Radical Biology and Medicine**, n. 65, p. S80, 2013.

EGEBLAD, Mikala; WERB, Zena. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161, 2002.

ENGLISH, William R. et al. Characterization of the Role of the "MT-loop" an eight-amino acid insertion specific to pro-gelatinase a (mmp2) activating membrane-type matrix metalloproteinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 45, p. 42018-42026, 2001.

FERNANDEZ-PATRON, Carlos et al. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. **Circulation research**, v. 87, n. 8, p. 670-676, 2000.

FERNANDEZ-PATRON, Carlos; KASSIRI, Zamaneh; LEUNG, Dickson. Modulation of Systemic Metabolism by MMP-2: From MMP-2 Deficiency in Mice to MMP-2 Deficiency in Patients. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 4, p. 1935-1949, 2011.

FIERS, Walter et al. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. **Oncogene**, v. 18, n. 54, p. 7719-7730, 1999

GONÇALVES, Andrezza N. et al. Expression of soluble and functional full-length human matrix metalloproteinase-2 in Escherichia coli. **Journal of biotechnology**, v. 157, n. 1, p. 20-24, 2012.

HARDY, Eugenio; HARDY-SOSA, Anette; FERNANDEZ-PATRON, Carlos. MMP-2: is too low as bad as too high in the cardiovascular system?. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 315, n. 5, p. H1332-H1340, 2018.

HENDRY, Reid G.; BILAWCHUK, Leanne M.; MARCHANT, David J. Targeting matrix metalloproteinase activity and expression for the treatment of viral myocarditis. **Journal of cardiovascular translational research**, v. 7, n. 2, p. 212-225, 2014.

JIANG, Liqun et al. Calpain-1 regulation of matrix metalloproteinase 2 activity in vascular smooth muscle cells facilitates age-associated aortic wall calcification and fibrosis. **Hypertension**, v. 60, n. 5, p. 1192-1199, 2012.

KANDASAMY, Arulmozhi D. et al. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. **Cardiovascular research**, v. 85, n. 3, p. 413-423, 2009.

KAPOOR, Charu et al. Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 12, n. 1, p. 28, 2016.

KARSDAL, Morten A. et al. Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor- β controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p. 44061-44067, 2002.

KOBUSIAK-PROKOPOWICZ, Malgorzata et al. MMP-2 and TIMP-2 in patients with heart failure and chronic kidney disease. **Open Medicine**, v. 13, n. 1, p. 237-246, 2018.

KOREM, Sigal et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-2: a diagnostic marker but not prognostic marker of papillary thyroid carcinoma. **Isr Med Assoc J**, v. 4, n. 4, p. 247-251, 2002.

KUCUKGUVEN, Arda; A KHALIL, Raouf. Matrix metalloproteinases as potential targets in the venous dilation associated with varicose veins. **Current drug targets**, v. 14, n. 3, p. 287-324, 2013.

Johansson, L.H., Borg, L.A., 1988. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. **Analytical biochemistry** 174, 331-336.

LAKATTA, Edward G. Central arterial aging and the epidemic of systolic hypertension and atherosclerosis. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 1, n. 5, p. 302-340, 2007.

LAKATTA, Edward G. The reality of aging viewed from the arterial wall. **Artery research**, v. 7, n. 2, p. 73, 2013.

LASKOWSKI, Adrienne et al. Antioxidant actions contribute to the antihypertrophic effects of atrial natriuretic peptide in neonatal rat cardiomyocytes. **Cardiovascular research**, v. 72, n. 1, p. 112-123, 2006.

LEVIN, Maxim et al. Next generation matrix metalloproteinase inhibitors—Novel strategies bring new prospects. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 11, p. 1927-1939, 2017.

LOCKHART, A. Craig et al. Reduction of wound angiogenesis in patients treated with BMS-275291, a broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor. **Clinical cancer research**, v. 9, n. 2, p. 586-593, 2003.

LOVETT, David H. et al. A novel intracellular isoform of matrix metalloproteinase-2 induced by oxidative stress activates innate immunity. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e34177, 2012.

LOVETT, David H. et al. N-terminal truncated intracellular matrix metalloproteinase-2 induces cardiomyocyte hypertrophy, inflammation and systolic heart failure. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68154, 2013.

LUO, Z. et al. Comparison of inhibitors of superoxide generation in vascular smooth muscle cells. **British journal of pharmacology**, v. 157, n. 6, p. 935-943, 2009.

MATTOS, B. R. et al. TNF- α inhibition decreases MMP-2 activity, reactive oxygen species formation and improves hypertensive vascular hypertrophy independent of its effects on blood pressure. **Biochemical Pharmacology**, v. 180, p. 114121, 2020.

MCCAWLEY, Lisa J.; MATRISIAN, Lynn M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!. **Current opinion in cell biology**, v. 13, n. 5, p. 534-540, 2001.

MAHIMKAR, R., A. Nguyen, M. Mann, C.C. Yeh, B.Q. Zhu, J.S. Karliner, and D.H. Lovett. Cardiac transgenic matrix metalloproteinase-2 expression induces myxomatous valve degeneration: a potential model of mitral valve prolapse disease. **Cardiovascular pathology**. 18:253-261, 2009.

MARIAPPAN, Nithya et al. TNF-induced mitochondrial damage: a link between mitochondrial complex I activity and left ventricular dysfunction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 4, p. 462-470, 2009.

MARTINEZ-LEMUS, Luis A. et al. In ward remodeling of resistance arteries requires reactive oxygens pecies-dependent activation of matrix metalloproteinases. **American Journal of Physiology-Heart and CirculatoryPhysiology**, v. 300, n. 6, p. H2005-H2015, 2011.

MATSUSAKA, H., T. Ide, S. Matsushima, M. Ikeuchi, T. Kubota, K. Sunagawa, S. Kinugawa, and H. Tsutsui. Targeted deletion of matrix metalloproteinase 2 ameliorates myocardial remodeling in mice with chronic pressure overload. **Hypertension**. 47:711-717, 2006.

MORGAN, Michael J.; LIU, Zheng-gang. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. **Cell research**, v. 21, n. 1, p. 103-115, 2011.

MORGUNOVA, Ekaterina et al. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. **Science**, v. 284, n. 5420, p. 1667-1670, 1999.

NAGASE, Hideaki; VISSE, Robert; MURPHY, Gillian. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular research**, v. 69, n. 3, p. 562-573, 2006.

NAGASE, Hideaki and WOESSNER JR, J. Frederick. Matrix Metalloproteinases. **The Journal of Biological Chemistry**. v.274, p.21491-21494, 1999.

NAKAMURA, Keisuke et al. A novel analytical method to evaluate directly catalase activity of microorganisms and mammalian cells by ESR oximetry. **Free radical research**, v. 44, n. 9, p. 1036-1043, 2010.

NESTERENKO, M.V., M. Tilley, and S.J. Upton. 1994. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minutes detection of proteins in polyacrylamide gels. **Journal of biochemical and biophysical methods**. 28:239-242.

NEWBY, Andrew C. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. **Physiological reviews**, v. 85, n. 1, p. 1-31, 2005.

OVERALL, Christopher M. et al. Domain Interactions in the Gelatinase A·TIMP-2·MT1-MMP Activation Complex the ectodomain of the 44-kda form of membrane type-1 matrix metalloproteinase does not modulate gelatinase a activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 50, p. 39497-39506, 2000.

OVERALL, Christopher Mark; LÓPEZ-OTÍN, Carlos. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 9, p. 657, 2002.

PACHER, Pal et al. Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 6, p. 302-310, 2005.

PATEL, Kinjal et al. Acute antihypertensive action of nitroxides in the spontaneously hypertensive rat. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 1, p. R37-R43, 2006.

PATTERSON, Margaret L. et al. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. **FEBS letters**, v. 503, n. 2-3, p. 158-162, 2001.

PEETERS, S. A. et al. Plasma matrix metalloproteinases are associated within cident cardiovascular disease and all-cause mortality in patients with type 1 diabetes: a 12-year follow-up study. **Cardiovascular diabetology**, v. 16, n. 1, p. 55, 2017.

PEI, Duanqing; KANG, Tiebang; QI, Huaxiong. Cysteine array matrix metalloproteinase (CA-MMP) /MMP-23 is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and

activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33988-33997, 2000.

PRADO, A.F. In vivo localization and cardiovascular effects after 4 weeks of exposition with matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) fused with green fluorescent protein in health and atherosclerotic mice. 2015. **Thesis (PhD degree) – Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto**, 2015.

PRADO, Alejandro F. et al. Matrix metalloproteinase-2-induced epidermal growth factor receptor transactivation impairs redox balance in vascular smooth muscle cells and facilitates vascular contraction. **Redox biology**, v. 18, p. 181-190, 2018.

QI, Shufan; DEN HARTOG, Gertjan JM; BAST, Aalt. Superoxide radicals increase transforming growth factor- β 1 and collagen release from human lung fibroblasts via cellular influx through chloride channels. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 237, n. 1, p. 111-118, 2009.

RADOSINSKA, Jana; BARANCIK, Miroslav; VRBJAR, Norbert. Heart failure and role of circulating MMP-2 and MMP-9. **Panminerva medica**, v. 59, n. 3, p. 241-253, 2017.

REICHELDT, Peter; SCHWARZ, Christoph; DONZEAU, Mariel. Protocolo de etapa única para purificar proteínas recombinantes com baixo teor de endotoxinas. **Expressão e purificação de proteínas**, v. 46, n. 2, pág. 483-488, 2006.

RIZZI, Élen et al. Matrix metalloproteinase inhibition improves cardiac dysfunction and remodeling in 2-kidney, 1-clip hypertension. **Journal of cardiac failure**, v. 16, n. 7, p. 599-608, 2010.

RIZZI, Elen et al. Tempol inhibits TGF- β and MMPs upregulation and prevents cardiac hypertensive changes. **International journal of cardiology**, v. 165, n. 1, p. 165-173, 2013.

RIZZI, Elen et al. Temporal changes in cardiac matrix metalloproteinase activity, oxidative stress, and TGF- β in renovascular hypertension-induced cardiac hypertrophy. **Experimental and molecular pathology**, v. 94, n. 1, p. 1-9, 2013.

SAITO, Keita et al. Two reaction sites of a spin label, TEMPOL (4-hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-N-oxyl), with hydroxyl radical. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 92, n. 2, p. 275-280, 2003.

SCHNACKENBERG, Christine G.; WILCOX, Christopher S. Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-iso prostaglandin F $_{2\alpha}$. **Hypertension**, v. 33, n. 1, p. 424-428, 1999.

SCHULZ, Richard. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 47, p. 211-242, 2007.

SOMPAKDEE, Vachirapong et al. Suppression of Nrf2 confers chemosensitizing effect through enhanced oxidant-mediated mitochondrial dysfunction. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 101, p. 627-634, 2018.

SOULE, Benjamin P. et al. The chemistry and biology of nitroxide compounds. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 11, p. 1632-1650, 2007.

SQUIRE, Iain B. et al. Plasma MMP-9 and MMP-2 following acute myocardial infarction in man: correlation with echocardiographic and neurohumoral parameters of left ventricular dysfunction. **Journal of cardiac failure**, v. 10, n. 4, p. 328-333, 2004.

SUNG, M.M., C.G. Schulz, W. Wang, G. Sawicki, N.L. Bautista-Lopez, and R. Schulz. 2007. Matrix metalloproteinase-2 degrades the cytoskeletal protein alpha-actinin in peroxynitrite mediated myocardial injury. **Journal of molecular and cellular cardiology**. 43:429-436.

SUZUKI, Yuichiro J.; FORD, George D. Redox regulation of signal transduction in cardiac and smooth muscle. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 31, n. 2, p. 345-353, 1999.

TOUYZ, Rhian M. et al. Vascular biology of superoxide-generating NADPH oxidase 5—Implications in hypertension and cardiovascular disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 30, n. 7, p. 1027-1040, 2019.

TOKITO, Akinori; JOUGASAKI, Michihisa. Matrix metalloproteinases in non-neoplastic disorders. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 7, p. 1178, 2016.

VANDENABEELE, Peter et al. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 11, n. 10, p. 700-714, 2010.

VERMA, Rajeshwar P.; HANSCH, Corwin. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical–biological functions and (Q) SARs. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 15, n. 6, p. 2223-2268, 2007.

VISSE, Robert; NAGASE, Hideaki. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation research**, v. 92, n. 8, p. 827-839, 2003.

WANG, Wenjie et al. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. **Circulation**, v. 106, n. 12, p. 1543-1549, 2002.

WANG, Mingyi et al. Angiotensin II activates matrix metalloproteinase type II and mimics age-associated carotid arterial remodeling in young rats. **The American journal of pathology**, v. 167, n. 5, p. 1429-1442, 2005.

WANG, Mingyi et al. Matrix metalloproteinase 2 activation of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and TGF- β 1–type II receptor signaling within the aged arterial wall. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 26, n. 7, p. 1503-1509, 2006.

WANG, Mingyi et al. Chronic matrix metalloproteinase inhibition retards age-associated arterial proinflammation and increase in blood pressure. **Hypertension**, v. 60, n. 2, p. 459-466, 2012.

WANG, Mingyi et al. Proinflammation: the key to arterial aging. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 25, n. 2, p. 72-79, 2014.

WANG, Qian et al. Anti-fibrotic actions of Ghrelin by inhibition of the NADPH oxidase–ROS signaling pathway. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 2018.

Wheeler, C.R., Salzman, J.A., Elsayed, N.M., Omaye, S.T., Korte, D.W., Jr., 1990. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. **Analytical biochemistry** 184, 193-199.

WILCOX, Christopher S.; PEARLMAN, Adam. Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. **Pharmacological reviews**, v. 60, n. 4, p. 418-469, 2008.

WILCOX, Christopher S. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. **Pharmacology & therapeutics**, v. 126, n. 2, p. 119-145, 2010.

WIN, Sanda et al. JNK interaction with Sab mediates ER stress induced inhibition of mitochondrial respiration and cell death. **Cell death & disease**, v. 5, n. 1, p. e989-e989, 2014.

YANG, Chengzhi et al. Procollagen type I carboxy-terminal propeptide (PICP) and MMP-2 are potential biomarkers of myocardial fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. **Cardiovascular Pathology**, v. 43, p. 107150, 2019.

YUAN, Shuai et al. Effects of tumour necrosis factor on cardiovascular disease and cancer: A two-sample Mendelian randomization study. **EBioMedicine**, v. 59, p. 102956, 2020.

ZHANG, Hong-Sheng; WANG, Sheng-Qi. Salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* inhibits tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced MMP-2 upregulation in human aortic smooth muscle cells via suppression of NAD (P) H oxidase-derived reactive oxygen species. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 41, n. 1, p. 138-148, 2006.

ZHAO, Wenyuan et al. Oxidative stress mediates cardiac fibrosis by enhancing transforming growth factor-beta1 in hypertensive rats. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 317, n. 1-2, p. 43-50, 2008.

ZHOU, H.Z., X. Ma, M.O. Gray, B.Q. Zhu, A.P. Nguyen, A.J. Baker, U. Simonis, G. Cecchini, D.H. Lovett, and J.S. Karliner. Transgenic MMP-2 expression induces latent cardiac mitochondrial dysfunction. **Biochemical and biophysical research communications**. 358:189-195, 2007.