



KARINA COUTINHO FERRAZ

**“EFEITOS DA INFUSÃO INTRAVENOSA DE
METALOPROTEINASE-2 DA MATRIZ
RECOMBINANTE HUMANA (rhMMP-2) EM
RESPOSTAS β -ADRENÉRGICAS”**

***“EFFECTS OF INTRAVENOUS INFUSION OF
RECOMBINANT HUMAN MATRIX
METALLOPROTEINASE-2 (rhMMP-2) IN β -
ADRENERGIC RESPONSES”***

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

KARINA COUTINHO FERRAZ

**“EFEITOS DA INFUSÃO INTRAVENOSA DE
METALOPROTEINASE-2 DA MATRIZ RECOMBINANTE HUMANA
(rhMMP-2) EM RESPOSTAS β -ADRENÉRGICAS”**

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

***“EFFECTS OF INTRAVENOUS INFUSION OF RECOMBINANT
HUMAN MATRIX METALLOPROTEINASE-2 (rhMMP-2) IN β -
ADRENERGIC RESPONSES”***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Doutora em Farmacologia.

Doctorate thesis presented to the Pharmacology Postgraduation Programme of the School of Medical Sciences of the University of Campinas to obtain the Ph.D grade in Pharmacology.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA KARINA COUTINHO FERRAZ E ORIENTADA PELO PROF. DR. JOSÉ EDUARDO TANUS DOS SANTOS.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

F413e Ferraz, Karina Coutinho, 1986-
Efeitos da infusão intravenosa de metaloproteinase-2
da matriz recombinante humana (rhMMP-2) em
respostas β -adrenérgicas / Karina Coutinho Ferraz. --
Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : José Eduardo Tanus dos Santos.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Metaloproteinase 2 da matriz. 2. Receptores beta
adrenérgicos. 3. Hemodinâmica. 4. Doxíciclina. 5.
Coração. I. Santos, José Eduardo Tanus dos. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Effects of intravenous infusion of recombinant human matrix metalloproteinase-2 (rhMMP-2) in β -adrenergic responses.

Palavras-chave em inglês:

Matrix metalloproteinase-2
Receptors, Adrenergic, beta
Hemodynamics
Doxycycline
Heart

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutora em Farmacologia

Banca examinadora:

José Eduardo Tanus dos Santos [Orientador]
Fabíola Taufic Monica Iglesias
Wilson Nadruz Junior
André Sampaio Pupo
Marcus Vinicius Simões

Data da defesa: 29-11-2012

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

Banca Examinadora de Tese de Doutorado

KARINA COUTINHO FERRAZ

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Membros:

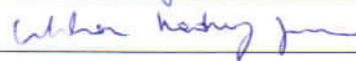
Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos



Profª. Dra. Fabiola Taufic Monica Iglesias



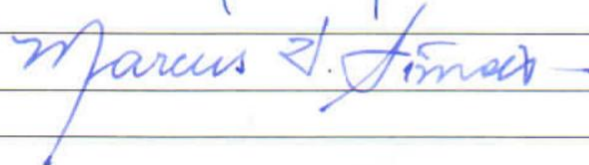
Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior



Prof. Dr. André Sampaio Pupo



Prof. Dr. Marcus Vinicius Simões



Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29/11/2012

DEDICATÓRIA

À minha família, meu tesouro, pelo carinho, amor, apoio e confiança. Ao meu namorado Sérgio, pela amizade, incentivo e compreensão. E aos meus queridos amigos, pelos inúmeros momentos de alegria que se tornarão inesquecíveis.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, princípio e fim de todas as coisas, pela presença marcante em minha vida e por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais que foram verdadeiros instrumentos da Vossa paz, fundamentais para o fortalecimento da minha fé. “Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele a glória por toda a eternidade! Amém.” Rm 11, 36.

À minha família, em especial meus pais Sebastião e Maria Aparecida, minhas irmãs Karen e Karoline e meu sobrinho Álvaro pelo amor, carinho, incentivo, compreensão e por trazerem alegria e conforto nos momentos difíceis.

Ao meu grande amor, meu namorado Sérgio, pela compreensão, companherismo, dedicação, incentivo, força e pelo seu amor e antecção, tornando meus dias mais lindos e felizes.

Ao meu orientador prof. Dr. José Eduardo, pela orientação e oportunidade de realização de um sonho; pelo entusiasmo, por acreditar em mim e compartilhar comigo seus conhecimentos.

À prof^a Dr^a Raquel Gerlach, pela confiança, aprendizado e pela oportunidade de realização de experimentos fundamentais para este trabalho.

Às grandes amigadas conquistadas, especialmente Pâmela, Vanessa, Lorena, Danielle, Valzinha, Flávia e Jóice pelas palavras, sorrisos, lembranças, pelo ombro amigo, pelos momentos felizes e tristes, angústias e conquistas compartilhadas. Vocês são muito muito queridas! “Um amigo fiel é uma poderosa proteção: quem o achou, descobriu um tesouro” Eclo 6, 14

Aos grandes amigos e colaboradores deste trabalho Elen, Jóice, e em especial Evandro e Ozélia, pela convivência, amizade, grandes idéias, incentivo, apoio e aprendizado. Sou muito grata a vocês!

Aos amigos do laboratório de Farmacologia Cardiovascular Carla, Alisson, Stéfany, Vanessa Fontana, Ana Carol, Marcelão, Marcelo Montenegro, Jefferson, Lucas, Rafael, César, Gustavo e Jonas pelos momentos especiais vividos que ficarão guardados pra sempre com muito carinho.

À técnica querida Sandra Conde, pela imensa ajuda, boa vontade e bom humor, sempre disposta a ajudar com seu melhor sorriso.

Aos amigos do Laboratório da prof^a Raquel, especialmente Alejandro e Aline. Sem palavras pra agradecer a imensa ajuda de vocês.

Ao Prof. Dr. Paulo Barbosa Évora, por ter cedido seu laboratório para a realização dos experimentos hemodinâmicos e aos funcionários da cirurgia experimental pela boa convivência.

À professora Isis Kettelhut e aos seus alunos Silvia e Leandro, pela oportunidade de colaboração e aprendizado.

Ao secretário Bruno, pela solicitude e boa vontade de sempre.

E a todos os professores e amigos que de alguma forma contribuíram para minha formação pessoal, intelectual e profissional.

“Por não saber que era impossível

Ele foi lá e fez”.

(Jean Cocteau)

RESUMO

Evidências clínicas e experimentais indicam o envolvimento de metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) na patogênese de diversas doenças, incluindo as doenças cardiovasculares. Particularmente, alterações na atividade da MMP-2 parecem desempenhar um importante papel na hipertensão, na insuficiência cardíaca e em outras alterações do sistema cardiovascular. Diversos estudos mostram vários alvos não relacionados à matriz extracelular para a MMP-2, incluindo proteínas intracelulares e mediadores vasoativos. Adicionalmente, diversos trabalhos indicam o envolvimento desta enzima na clivagem proteolítica de receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos. Embora alguns estudos tenham sugerido que a MMP-2 possa afetar o tônus vascular e prejudicar a função dos β -adrenoreceptores, nenhum estudo prévio examinou os efeitos hemodinâmicos agudos desta enzima. Nós verificamos os efeitos da MMP-2 recombinante humana (rhMMP-2), administrada por via intravenosa (i.v.), a carneiros anestesiados sob condições basais e durante estimulação β -adrenérgica com dobutamina. Vinte e seis carneiros machos anestesiados foram utilizados em dois protocolos experimentais. Primeiramente, rhMMP-2 ($220 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ durante 60 min) ou salina foi infundida e nenhuma alteração hemodinâmica foi encontrada. No segundo protocolo, infundiu-se dobutamina ($5 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, i.v., durante 180 min) ou salina em carneiros que haviam recebido a mesma infusão descrita acima de rhMMP-2 ou salina precedida pelo tratamento com doxiciclina (10 mg.kg^{-1} , i.v., durante 15 min) ou salina. Os níveis plasmáticos e cardíacos de MMP-2 foram avaliados por zimografia e a atividade gelatinolítica foi analisada por espectrofluorimetria. Nós observamos que, enquanto a infusão de rhMMP-2 não aumentou os níveis plasmáticos e cardíacos de MMP-2, produziu um aumento na atividade gelatinolítica do coração, e a doxiciclina preveniu este efeito. A dobutamina reduziu o índice de resistência vascular sistêmico (IRVS) e aumentou o índice cardíaco (IC) e a dP/dt_{max} no ventrículo esquerdo. Entretanto, a co-infusão de rhMMP-2 e dobutamina foi associada com uma menor redução no IRVS e com menores aumentos no IC e na dP/dt_{max} induzidos pela dobutamina. O pré-tratamento com doxiciclina impediu estas alterações induzidas pela rhMMP-2 na

resposta à dobutamina. Adicionalmente, verificou-se que a rhMMP-2 reduziu a formação de AMP cíclico em cardiomiócitos e que os inibidores de MMPs doxíciclina e ONO-4817 impediram esta redução. Nossos resultados mostram que a rhMMP-2, sob condições basais, não exerce efeitos hemodinâmicos em carneiros. Entretanto, a rhMMP-2, sob estimulação cardíaca, prejudica a resposta cardiovascular induzida pela ativação de receptores β -adrenérgicos.

ABSTRACT

Experimental and clinical evidence indicate the involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathogenesis of many disease conditions, including cardiovascular diseases. Particularly, imbalanced MMP-2 activity apparently plays a critical role in hypertension, heart failure and in other alterations of the cardiovascular system. Various studies show many targets unrelated to the extracellular matrix for MMP-2, including intracellular proteins and vasoactive mediators. Additionally, recent studies indicate the involvement of this enzyme in proteolytic cleavage of β_1 - and β_2 -adrenoreceptors. Although some studies have suggested that MMP-2 may affect the vascular tone and impair β -adrenoreceptor function, no previous study has examined the acute hemodynamic effects of this enzyme. We examined the effects of recombinant human MMP-2 (rhMMP-2) administered intravenously (i.v.) to anesthetized lambs at baseline conditions and during β -adrenergic stimulation with dobutamine. Twenty-six anesthetized male lambs were used in two study protocols. Firstly, rhMMP-2 ($220 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ over 60 min) or vehicle was infused and no significant hemodynamic changes were found. In the second protocol, we infused dobutamine ($5 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, i.v., over 180 min) or saline in lambs that had received the same rhMMP-2 infusion preceded by treatment with doxycycline (10 mg.kg^{-1} , i.v., during 15 min) or saline. Plasma and cardiac MMP-2 levels were assessed by gelatin zymography and gelatinolytic activity was assessed by spectrofluorimetry. We found that, while the infusion of rhMMP-2 did not increase plasma and cardiac MMP-2 levels, it increased cardiac gelatinolytic activity, and doxycycline blunted this effect. Dobutamine decreased systemic vascular resistance index (SVRI) and increased the cardiac index (CI) and left ventricular $\text{dP/dt}_{\text{max}}$. However, co-infusion of rhMMP-2 and dobutamine was associated with lower dobutamine-induced decrease in SVRI and with lower dobutamine-induced increase in CI and $\text{dP/dt}_{\text{max}}$. Pre-treatment with doxycycline blunted rhMMP-2-induced changes in dobutamine responses. Additionally, we found that rhMMP-2 decreased cyclic AMP levels in cardiomyocytes and that the inhibitors of MMPs doxycycline and ONO-4817

prevented this reduction. Our findings show that rhMMP-2, at baseline conditions, exerts no major hemodynamic effects in lambs. However, rhMMP-2, during cardiac stimulation, impairs the responses elicited by activation of β -adrenoreceptors.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A2M: α 2-macroglobulina

AMP: adenosina 3',5'-monofosfato

ANOVA: análise de variância

ASC: área de superfície corpórea

bats: batimentos

Big ET-1: big endotelina 1

BL: basal

cDNA: DNA complementar

cm: centímetro

CETEA-FMRP: Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

CGRP: *calcitonin gene-related peptide* ou peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

din: dínamo

dP/dt_{max}: velocidade máxima de elevação da pressão ventricular esquerda durante a sístole

DC: débito cardíaco

DMEM: *dulbecco's modified eagle medium*

DNA: *deoxyribonucleic acid* ou ácido desoxirribonucléico

ECG: eletrocardiograma

EPM: erro padrão da média

ETCO₂: *end tidal of carbon dioxide* ou pressão parcial de gás carbônico ao final da expiração

FC: frequência cardíaca

FDA: Food and Drug Administration

g: grama

G: força centrífuga

HS: *horse serum* ou soro de cavalo

iv: intravenosa

IC: índice cardíaco

IL-1 β : interleucina-1 β

IPTG: *isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside* ou isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

IRVP: índice de resistência vascular pulmonar

IRVS: índice de resistência vascular sistêmico

kDa: quilodalton

kg: quilograma

L: litro

LB: Lúria-Bertani

m: metro

mA: miliampère

mg: miligrama

min: minuto

mL: mililitro

mmHg: milímetros de mercúrio

mM: milimolar

M: molar

µg: micrograma

µL: microlitro

µM: micromolar

MLC-1: *myosin light chain-1* ou miosina de cadeia leve 1

MMPs: *matrix metalloproteinases* ou metaloproteinases da matriz extracelular

MMP-2: metaloproteinase da matriz extracelular 2

MT-MMPs: *membrane-type matrix metalloproteinase* ou MMPs de membrana

ng: nanograma

nm: nanômetro

NCS: *newborn calf serum* ou soro bovino de recém-nascido

pH: potencial de hidrogênio

pmol: picomol

PAM: pressão arterial média

PAP: pressão arterial pulmonar

PCR: *polymerase chain reaction* ou reação em cadeia da polimerase

PMAP: pressão média da artéria pulmonar

PMSF: *phenylmethylsulfonyl fluoride* ou fluoreto de fenilmetilsulfato

Poap: pressão de oclusão da artéria pulmonar

PVC: pressão venosa central

rhMMP-2: *recombinant human MMP-2* ou MMP-2 recombinante humana

rpm: rotações por minuto

RNA: *ribonucleic acid* ou ácido ribonucléico

RT-PCR: *reverse transcription polymerase chain reaction* ou reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa

s: segundo

SDS: *sodium dodecyl sulfate* ou dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* ou eletroforese em gel de poliacrilamida e de dodecil sulfato de sódio

tRNA: *transfer RNA* ou RNA transportador

TIMPs: *tissue inhibitors of metalloproteinases* ou inibidores teciduais de metaloproteinases

Tnl: troponina I

TNF- α : *tumor necrosis factor* ou fator de necrose tumoral

VE: ventrículo esquerdo

VEGFR-2: *vascular endothelial growth factor receptor 2* ou receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2

° C: grau celsius

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Principais grupos e características estruturais das MMPs	24
Figura 2 – Ativação proteolítica e não-proteolítica da MMP-2.	27
Figura 3 – Degradação de proteínas contráteis do coração pela MMP-2.....	29
Figura 4 – MMPs envolvidas na proteólise e regulação de receptores β -adrenérgicos.....	30
Figura 5 – Ilustração esquemática do desenho experimental.....	44
Figura 6 – Expressão e atividade da rhMMP-2.....	51
Figura 7 – Atividade gelatinolítica da rhMMP-2 por espectrofluorimetria.....	52
Figura 8 – Efeitos da rhMMP-2 na Pressão Arterial Média (PAM) e no Índice de Resistência Vascular Sistêmico (IRVS)	54
Figura 9 – Efeitos da rhMMP-2 na Pressão Média da Artéria Pulmonar (PMAP) e no Índice de Resistência Vascular Pulmonar (IRVP)	55
Figura 10 – Efeitos da rhMMP-2 na Frequência Cardíaca (FC) e no Índice Cardíaco (IC).....	56
Figura 11 – Efeitos da rhMMP-2 na dP/dt_{max} do ventrículo esquerdo.....	57
Figura 12 – Efeitos da rhMMP-2 na Pressão Arterial Média (PAM) durante estimulação β -adrenérgica	58
Figura 13 – Efeitos da rhMMP-2 no Índice de Resistência Vascular Sistêmico (IRVS) durante estimulação β -adrenérgica	59

Figura 14 – Efeitos da rhMMP-2 na Pressão Média da Artéria Pulmonar (PMAP) e no Índice de Resistência Pulmonar Sistêmico (IRVP) durante estimulação β -adrenérgica	60
Figura 15 – Efeitos da rhMMP-2 na Frequência Cardíaca (FC) durante estimulação β -adrenérgica	61
Figura 16 – Efeitos da rhMMP-2 no Índice Cardíaco (IC) durante estimulação β -adrenérgica	62
Figura 17 – Efeitos da rhMMP-2 na dp/dt_{max} do ventrículo esquerdo durante estimulação β -adrenérgica	63
Figura 18 – Efeitos da rhMMP-2 no delta da dp/dt_{max} do ventrículo esquerdo durante estimulação β -adrenérgica	65
Figura 19 – Efeitos da rhMMP-2 nos níveis plasmáticos de MMP-2	66
Figura 20 – Efeitos da rhMMP-2 na concentração cardíaca de MMP-2	67
Figura 21 – Efeitos da rhMMP-2 na atividade gelatinolítica do coração	68
Figura 22 – Efeitos da rhMMP-2 na formação de AMP cíclico em cardiomiócitos	69
Figura 23 – Efeitos dos inibidores de MMPs doxíclicina e ONO-4817 na formação de AMP cíclico em cardiomiócitos	70

SUMÁRIO

	Pag.
RESUMO	<i>viii</i>
ABSTRACT	<i>xi</i>
1- INTRODUÇÃO	22
1.1- As metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs)	23
1.2- A MMP-2	26
1.3- MMP-2: alvos além da matriz extracelular	28
1.4- Inibição de MMPs como estratégia terapêutica	31
2- HIPÓTESE	34
3- OBJETIVOS	36
4- MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1- Clonagem, expressão, purificação e verificação da expressão e atividade da rhMMP-2	39
4.2- Preparo animal	40
4.3- Protocolos e grupos experimentais	42

4.4- Desenho experimental e avaliações hemodinâmicas.....	43
4.5- Quantificação de MMP-2 por zimografia no plasma e no ventrículo esquerdo.....	45
4.6- Ensaio de atividade gelatinolítica no tecido cardíaco.....	46
4.7- Cultura primária de cardiomiócitos.....	47
4.8- Determinação do AMP cíclico em cultura de cardiomiócitos.....	48
4.9. Análise estatística.....	49
5- RESULTADOS.....	50
5.1- Avaliação da expressão e atividade da rhMMP-2.....	51
5.2- Avaliação dos efeitos hemodinâmicos da rhMMP-2 (Protocolo I).....	53
5.3- Avaliação dos efeitos hemodinâmicos da rhMMP-2 durante estímulo β-adrenérgico (Protocolo II).....	58
5.4- Avaliação da MMP-2 plasmática.....	66
5.5- Avaliação da MMP-2 no tecido cardíaco.....	67
5.6- Avaliação da atividade gelatinolítica no coração.....	68
5.7- Concentração de AMP cíclico em cardiomiócitos.....	69
6- DISCUSSÃO.....	71
7- CONCLUSÃO.....	78
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
9- ANEXO.....	87

1 – INTRODUÇÃO

1.1- As metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs)

As metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) são um grupo de endopeptidases cálcio e zinco dependentes amplamente conhecidas por degradar componentes da matriz extracelular, tais como colágeno, laminina, elastina e fibronectina (Chow, Cena e Schulz, 2007).

Descobertas em 1962 quando *Gross* e *Lapierre* relataram a atividade colagenolítica liberada durante o processo de morfogênese da cauda de girinos, as MMPs são responsáveis pelo remodelamento tecidual e constituem uma importante classe reguladora de diversas funções fisiológicas (Gross e Lapierre, 1962; Schulz, 2007).

Atualmente as MMPs compreendem uma família de 28 enzimas classificadas de acordo com o substrato que degradam em 5 grupos principais os quais são: colagenases (MMP-1, -8 e -13), estromelisinases (MMP-3 e -10), matrilisinas (MMP-7 e -26), MMPs de membrana (MT-MMPs-1 a -8) e gelatinases (MMP-2 e -9).

Quanto à estrutura, as MMPs são compostas por domínios estruturais semelhantes que se diferem basicamente pela especificidade em relação aos seus substratos. Conforme mostrado na figura 1, o peptídeo sinal na região N-terminal contendo uma sequência sinalizadora permite o transporte da enzima para o meio extracelular. Em seguida, estão o propeptídeo, um domínio autoinibitório de oclusão do sítio catalítico, e o domínio catalítico que constitui o domínio de ligação do substrato e que contém zinco no seu sítio ativo. Particularmente, no caso das gelatinases, representadas pelas MMP-2 e MMP-9, o domínio catalítico contém três domínios tipo fibronectina que formam um domínio de ligação do colágeno, permitindo a ligação e subsequente clivagem do colágeno tipo IV ou colágeno denaturado (gelatina), principais substratos deste grupo de MMPs (Chow, Cena e Schulz, 2007). Com exceção das matrilisinas (MMP-7 e -26), as MMPs também possuem uma região de dobradiça e um domínio hemopexina ligados à região caudal C-terminal. Adicionalmente, um domínio transmembrana e um domínio

citossólico também compõem a estrutura das MMPs de membrana (MT-MMPs-1 a -8) (Chow, Cena e Schulz, 2007; Kandasamy, Chow *et al.*, 2010).

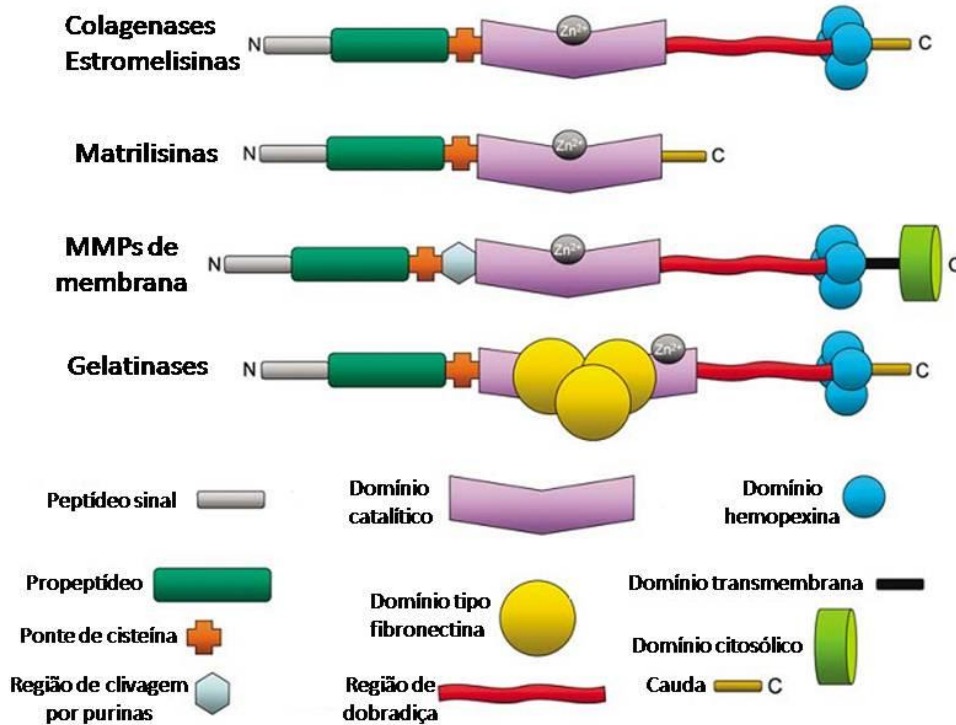


Figura 1: Principais grupos e características estruturais das MMPs. (Modificado de Chow, Cena *et al.* 2007).

As MMPs podem ser reguladas a níveis transcricional, traducional e também através de modificações pós-traducionais. Dentre esta última se encontra o processo de ativação das MMPs. Como proteases, as MMPs são sintetizadas na sua forma inativa ou de zimogênio e necessitam ser ativadas para exercerem sua função e degradar seus respectivos substratos. Esta ativação ocorre de 2 formas principais. Primeiramente, pode ocorrer uma clivagem proteolítica na qual ocorre a remoção do propeptídeo e exposição do sítio ativo do domínio catalítico que contém o zinco. Diversas proteases e também as próprias MMPs, como as MMPs de membrana (MT-MMPs) podem ser responsáveis pela clivagem proteolítica.

Além disso, vários estudos mostram que as MMPs também podem sofrer ativação não-proteolítica na qual não há remoção, mas mudanças conformacionais no propeptídeo inibitório, permitindo assim o acesso do substrato ao sítio catalítico do zinco. Este processo pode ocorrer pelo estresse oxidativo e tem sido descrito para as MMPs-1, -2, -8 e -9. O ânion peroxinitrito (ONOO⁻), por exemplo, pode ativar diretamente as MMPs por um mecanismo não-proteolítico que envolve a S-glutatiolização do grupamento sulfidril (presente nos resíduos de cisteína) do propeptídeo. Esta dissociação do propeptídeo do sítio catalítico pode ocorrer na presença de concentrações micromolares de ONOO⁻ e níveis intracelulares normais de glutathione (Okamoto, Akaike *et al.*, 2001; Kandasamy, Chow *et al.*, 2010).

A atividade das MMPs também pode ser modulada pela interação destas proteases com seus inibidores endógenos. Dentre estes estão os inibidores teciduais de metaloproteinases (*TIMPs; tissue inhibitors of metalloproteinases*) e a α 2-macroglobulina (A2M), um inibidor inespecífico de proteases circulantes (Nagase, Visse *et al.*, 2006). Os TIMPs, pequenas moléculas protéicas (de aproximadamente 23 kDa), se ligam às MMPs com diferentes afinidades numa proporção estequiométrica de 1:1. A família dos TIMPs é composta por 4 membros (TIMP-1, -2, -3 e -4) e esses, em geral, não demonstram especificidade por nenhuma MMP, embora o TIMP-1 tenha maior afinidade pela MMP-9 e o TIMP-2 se ligue preferencialmente à MMP-2 (Brew, Dinakarandian *et al.*, 2000).

Além dos inibidores endógenos, as MMPs também podem ser reguladas por inibidores farmacológicos. Estes atuam pela habilidade em quelar o cátion zinco, fundamental para a atividade das MMPs. Dentre os inibidores farmacológicos estão, por exemplo, os antibióticos da classe das tetraciclina, os quais têm sido utilizados como ferramenta experimental para o estudo das MMPs e constituem agentes terapêuticos potenciais para o tratamento de diversas doenças (Peterson, 2004).

Uma vez na forma ativa, as MMPs participam da regulação de vários processos fisiológicos, incluindo a embriogênese (Vu e Werb, 2000), angiogênese (Roy, Zhang *et al.*, 2006), involução uterina e reabsorção óssea (Rouet-Benzineb,

Buhler *et al.*, 1999). Porém, a atividade excessiva das MMPs pode estar relacionada à patogênese de diversas doenças como metástases de tumores (Deryugina e Quigley, 2006), doenças inflamatórias (Mohammed, Smookler *et al.*, 2003) e doenças cardiovasculares (Dollery, Mcewan *et al.*, 1995; Spinale, Coker *et al.*, 2000; Creemers, Cleutjens *et al.*, 2001; Ceron, Rizzi *et al.*, 2012; Marson, Poli De Figueiredo *et al.*, 2012). Dentre a família das MMPs, particular atenção tem sido dada à MMP-2, uma MMP do grupo das gelatinases que frequentemente tem sido associada a diversas doenças que afetam o sistema cardiovascular (Schulz, 2007).

1.2- A MMP-2

A MMP-2, também conhecida como gelatinase A, é uma enzima expressa abundantemente em várias células e tecidos, incluindo as células do músculo liso vascular, as células do endotélio vascular, fibroblastos e as células do músculo cardíaco (Wang, Schulze *et al.*, 2002). Embora seja considerada uma proteína constitutiva, alguns trabalhos mostram que a expressão da MMP-2 pode ser regulada a nível transcricional. *Siwik* e *colaboradores* mostraram que fibroblastos cardíacos expostos a interleucina-1 β (IL-1 β) e ao fator de necrose tumoral (TNF- α) apresentaram um aumento significativo na expressão de MMP-2 (Siwik, Chang *et al.*, 2000).

Quanto à estrutura e ação, a MMP-2 possui, além dos domínios comuns às MMPs, três domínios tipo fibronectina que conferem a ela a capacidade de clivar elastina, fibronectina e principalmente colágeno tipo IV e colágeno desnaturado (gelatina) (Murphy e Nagase, 2008).

A MMP-2 humana, inicialmente expressa em sua forma latente de tamanho molecular de 72 kDa, é processada à sua forma enzimaticamente ativa de 64 kDa pela ação combinada da MMP-14 e do TIMP-2, processo denominado de ativação proteolítica. Entretanto, conforme ilustrado na figura 2, a MMP-2 também pode se tornar ativa pela ação do estresse oxidativo sem remoção proteolítica do

propeptídeo, permanecendo com o peso molecular de 72 kDa, processo denominado de ativação não-proteolítica (Kandasamy, Chow *et al.*, 2010).

Um aumento significativo na expressão e/ou atividade da MMP-2 no soro, plasma ou nos tecidos vasculares e cardíacos tem sido demonstrado em diferentes estudos clínicos e modelos experimentais de hipertensão (Yasmin, Mceniery *et al.*, 2005; Castro, Rizzi *et al.*, 2009; Ceron, Castro *et al.*, 2010; Guimaraes, Rizzi *et al.*, 2010; Rizzi, Castro *et al.*, 2011). Além da hipertensão, a atividade aumentada da MMP-2 também desenvolve papel importante na insuficiência cardíaca (Boixel, Fontaine *et al.*, 2003; Yamazaki, Lee *et al.*, 2004), no infarto do miocárdio (Peterson, Li *et al.*, 2000; Chen, Tung *et al.*, 2005; Martinez, Rizzi *et al.*, 2008; Chung, Yang *et al.*, 2009) e em outras doenças relacionadas ao sistema cardiovascular, como pré-eclâmpsia e diabetes (Martinez, Rizzi *et al.*, 2008; Chung, Yang *et al.*, 2009; Palei, Sandrim *et al.*, 2012).

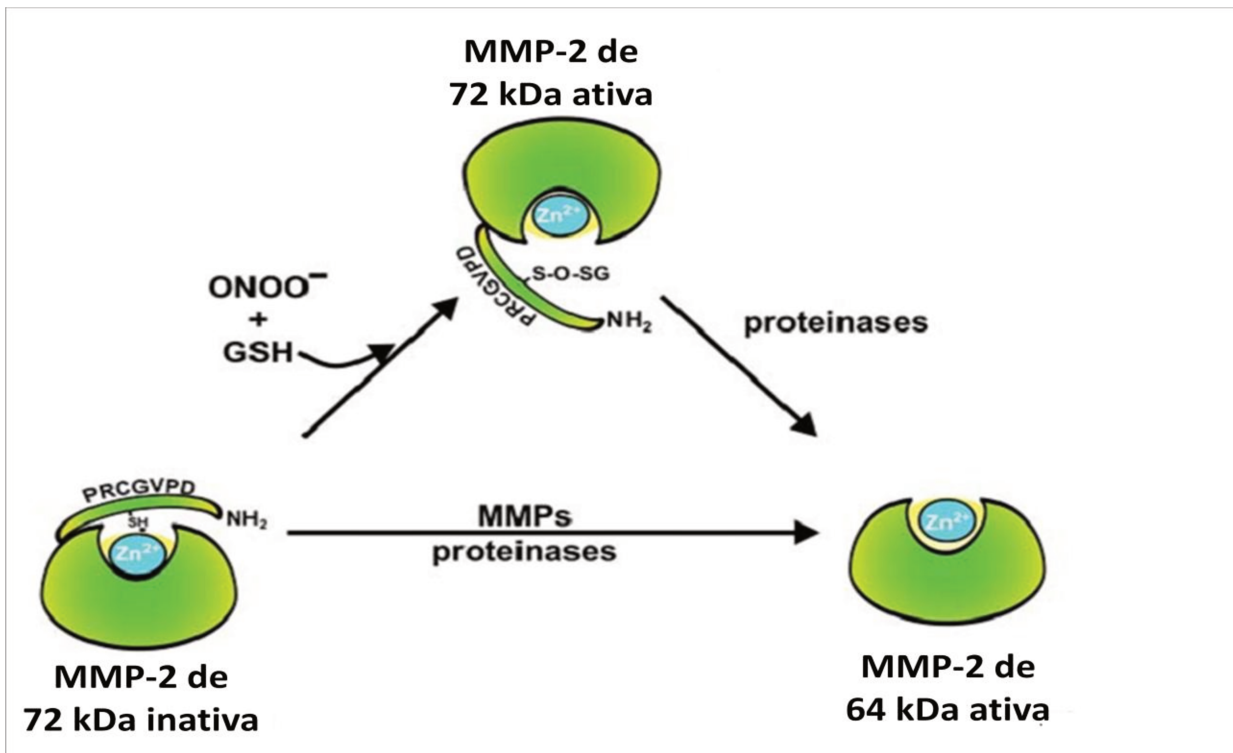


Figura 2: Ativação proteolítica e não-proteolítica da MMP-2. (Modificado de Kandasamy, Chow *et al.* 2010).

1.3- MMP-2: alvos além da matriz extracelular

Embora as MMPs sejam conhecidas por suas ações no remodelamento da matriz extracelular, vários estudos têm demonstrado um número crescente de novos substratos e ações biológicas para estas proteases, em especial para a MMP-2 (Mccawley e Matrisian, 2001; Chow, Cena e Schulz, 2007; Schulz, 2007; Kandasamy, Chow *et al.*, 2010). Sabe-se, por exemplo, que a MMP-2 pode modular o tônus vascular por clivar peptídeos vasoativos tais como a big endotelina-1 (big ET-1), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a adrenomedulina. Foi demonstrado que a MMP-2 contribui para os efeitos vasoconstritores da big ET-1 pela clivagem desta, originando o peptídeo vasoconstritor endotelina-1-32 com ação vasoconstritora mais potente que a própria endotelina-1 (Fernandez-Patron, Radomski *et al.*, 1999). *Fernandez-Patron e colaboradores* também verificaram que a MMP-2 cliva o CGRP abolindo sua atividade vasodilatadora (Fernandez-Patron, Stewart *et al.*, 2000). Adicionalmente, foi observado que a MMP-2 cliva o peptídeo vasodilatador adrenomedulina, resultando na formação de peptídeos com efeitos vasodilatador e vasoconstritor (Martinez, Oh *et al.*, 2004).

Além dos efeitos descritos acima, diversos trabalhos têm demonstrado um importante papel intracelular para a MMP-2 (Mccawley e Matrisian, 2001; Schulz, 2007). Sabe-se que esta protease, além de estar presente na matriz extracelular, também se localiza no citoplasma dos cardiomiócitos, interagindo com diversas proteínas responsáveis pelo funcionamento da maquinaria contrátil do coração. A atividade aumentada da MMP-2 tem sido associada a um déficit na função cardíaca possivelmente como resultado da degradação de proteínas sarcoméricas e do citoesqueleto tais como troponina I (TnI), miosina de cadeia leve-1 (MLC-1), α -actinina e titina, conforme ilustrado na figura 3 (Wang, Schulze *et al.*, 2002; Gao, Sawicki *et al.*, 2003; Sawicki, Leon *et al.*, 2005; Sung, Schulz *et al.*, 2007; Ali, Cho *et al.*, 2010). Estes trabalhos também mostram que a inibição da MMP-2 impede a

degradação destas proteínas e auxilia na recuperação da função mecânica de corações sujeitos a iquemia (Kandasamy, Chow *et al.*, 2010).

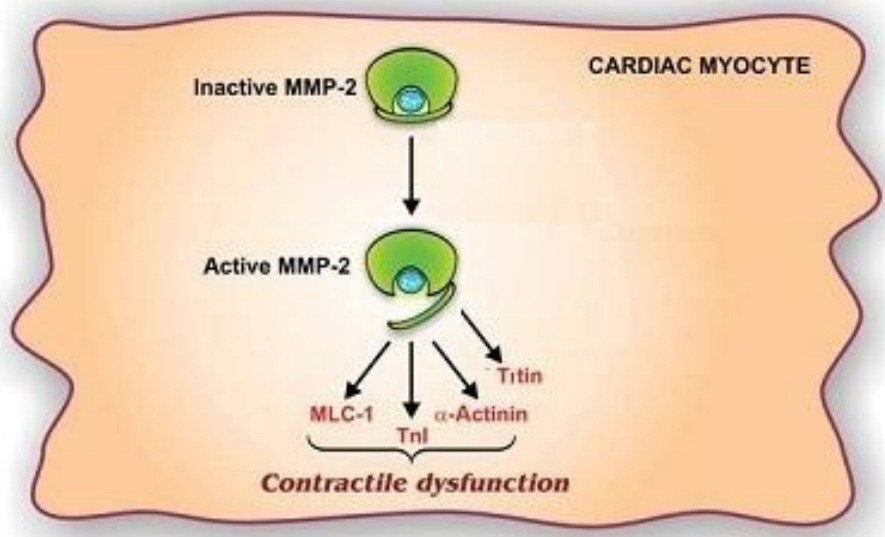


Figura 3: Degradação de proteínas contráteis do coração pela MMP-2. (Modificado de Kandasamy, Chow *et al.* 2010).

Recentemente, alguns estudos têm mostrado que as MMPs também estão envolvidas na clivagem proteolítica de diversos receptores de membrana (Rietz e Spiers, 2012). A clivagem do domínio extracelular de receptores pelas MMPs tais como o receptor de insulina e o receptor do fator de crescimento endotelial vascular-2 (VEGFR-2) tem sido associada à importantes alterações como à resistência à insulina e à apoptose e rarefação capilar, respectivamente (Delano e Schmid-Schonbein, 2008; Rodrigues, Tran *et al.*, 2010; Tran, Delano *et al.*, 2010). Sabe-se também que as MMPs, particularmente a MMP-2, estão envolvidas na proteólise de adrenoreceptores, dentre estes os receptores β_2 -adrenérgicos como ilustrado na figura 4. Rodrigues e colaboradores mostraram ocorrer uma redução significativa na densidade de receptores β_2 -adrenérgicos em células endoteliais submetidas ao plasma de ratos hipertensos com níveis elevados de MMPs. Os

autores demonstraram também que a inibição de MMPs com doxíciclina ou EDTA impediu a perda destes receptores, indicando uma possível clivagem dos receptores β_2 -adrenérgico mediada por MMPs (Rodrigues, Tran *et al.*, 2010). De acordo com esta evidência, outro trabalho mostrou que a MMP-2 está envolvida na proteólise de receptores β_2 -adrenérgicos nos rins de ratos hipertensos (Wu e Schmid-Schonbein, 2011). Além disso, *Hakalahti e colaboradores* verificaram que o GM6001, um inibidor não seletivo de MMPs, impediu a clivagem da região N-terminal do receptor β_1 -adrenérgico tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sugerindo que esta clivagem pode ser mediada por MMPs (Hakalahti, Vierimaa *et al.*, 2010).

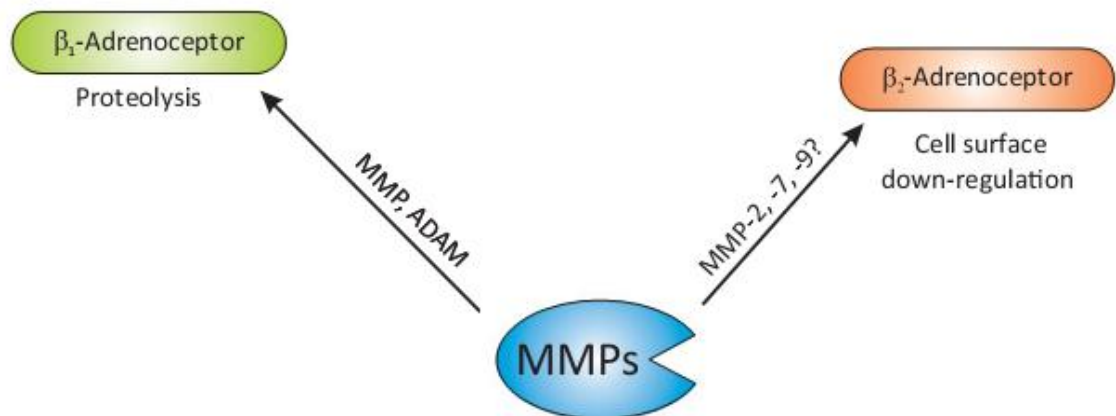


Figura 4: MMPs envolvidas na proteólise e regulação de receptores β - adrenérgicos. (Modificado de (Rietz e Spiers, 2012).

Adicionalmente, alguns trabalhos têm sugerido que a MMP-2 por si só, ou seja, na ausência de qualquer condição de doença é capaz de produzir alterações cardíacas características do remodelamento ventricular e de insuficiência contrátil. *Berman e colaboradores* verificaram que camundongos transgênicos que superexpressam a forma ativa da MMP-2 especificamente no coração desenvolveram hipertrofia dos miócitos, fibrose e dilatação da câmara ventricular esquerda, demonstrando que a MMP-2 é um determinante direto de desenvolvimento do remodelamento e falência ventricular (Bergman, Teerlink *et*

al., 2007). Consistente com estes resultados, *Wang e colaboradores* mostraram que, além do remodelamento cardíaco e do comprometimento da função contrátil, camundongos que superexpressam a MMP-2 também apresentaram uma resposta reduzida à estimulação inotrópica com isoproterenol (*Wang, Bergman et al.*, 2006).

Além disso, a fim de avaliar se uma diminuição na MMP-2 poderia contribuir para a redução das alterações cardíacas produzidas por esta protease, um estudo com animais “*knockouts*” para MMP-2 foi conduzido em um modelo experimental de coarctação de aorta. Verificou-se que a hipertrofia e disfunção ventricular esquerda induzidas pela sobrecarga de pressão foram reduzidas nos animais “*knockouts*” demonstrando a efetiva contribuição da MMP-2 para hipertrofia cardíaca e indicando que a inibição da MMP-2 pode ser uma importante estratégia terapêutica em doenças cardiovasculares associadas à hipertensão (*Matsusaka, Ide et al.*, 2006).

1.4- Inibição de MMPs como estratégia terapêutica

A inibição de MMPs têm se constituído como uma importante estratégia terapêutica para diversas doenças. Os inibidores farmacológicos de MMPs atualmente disponíveis possuem significativa utilidade, não apenas como ferramenta experimental, mas também como agentes terapêuticos potenciais para o tratamento como por exemplo, do câncer, de doenças inflamatórias, bem como de doenças cardiovasculares (*Peterson*, 2004).

Os antibióticos da classe das tetraciclina constituem-se como importantes inibidores de MMPs. Além da propriedade antibiótica, algumas ações não relacionadas à atividade antimicrobiana (efeitos pleiotrópicos) têm sido relatadas para as tetraciclina. Entre elas está a habilidade de inibir MMPs devido à capacidade das tetraciclina de quelarem os íons zinco presentes no sítio catalítico destas proteases (*Griffin, Ceballos et al.*, 2011). Adicionalmente, outros inibidores

de MMPs não relacionados à classe das tetraciclinas tais como fenantrolina, batimastat, marimastat, GM-6001 (ilomastat ou gelardin), PD-166793 e ONO-4817 compartilham a ação inibitória de MMPs devido suas propriedades quelantes de íons zinco (Peterson, 2004). Entretanto, a propriedade quelante de zinco destes agentes, faz deles inibidores não seletivos dentre as MMPs, uma vez que o zinco está presente na estrutura de todas as MMPs (Castro, Kandasamy *et al.*, 2011).

As tetraciclinas são antibióticos de amplo espectro e possuem como mecanismo de ação antibacteriano a inibição da síntese de proteínas bacterianas através de sua ligação as subunidades 30S e 50S do ribossomo bacteriano, impedindo o acesso do aminoacil-tRNA ao local acceptor. Possuem como principais representantes da classe a tetraciclina, a oxitetraciclina, a doxiciclina e a minociclina. Dentre essas, a doxiciclina constitui-se como inibidor mais potente e atualmente é o único inibidor de MMPs aprovado para uso clínico pelo FDA (Food and Drug Administration), produzindo inibição de MMPs a níveis plasmáticos menores que os necessários para produzir efeito antimicrobiano. Com o nome comercial de Periostat®, a doxiciclina é utilizada clinicamente na dose de 20 mg duas vezes por dia para o tratamento de doença periodontal (Schulz, 2007; Griffin, Ceballos *et al.*, 2011).

A inibição de MMPs pelas tetraciclinas se mostrou benéfica em várias condições de doença nas quais as MMPs produzem seus efeitos de degradação da matriz extracelular como no remodelamento cardíaco, na invasão tumoral e em diversos processos inflamatórios (Griffin, Ceballos *et al.*, 2011). Além disso, vários trabalhos mostraram os efeitos benéficos da doxiciclina em situações em que as MMPs (principalmente a MMP-2) produzem degradação de proteínas contráteis e disfunção cardíaca (Wang, Schulze *et al.*, 2002; Ali, Fan *et al.*, 2011).

Portanto, embora muitos estudos tenham mostrado atividade ou níveis elevados de MMP-2 em diversas condições de doença (Yamazaki, Lee *et al.*, 2004; Yasmin, Mceniery *et al.*, 2005; Chung, Yang *et al.*, 2009; Guimaraes, Rizzi *et al.*, 2010; Rizzi, Castro *et al.*, 2010; Palei, Sandrim *et al.*, 2012), e de que a

MMP-2 por si só é capaz de produzir importantes alterações cardíacas (Wang, Bergman *et al.*, 2006; Bergman, Teerlink *et al.*, 2007), os efeitos da infusão de MMP-2 e de sua inibição com doxiciclina ainda são desconhecidos.

2 – HIPÓTESE

Levando-se em consideração que:

- a) a MMP-2 degrada mediadores vasoativos, proteínas contráteis e receptores de membrana importantes para o sistema cardiovascular,
- b) a MMP-2 está elevada em diversas doenças cardiovasculares,
- c) a MMP-2, por si só, é capaz de produzir disfunção cardíaca,
- d) e de que não há trabalhos avaliando os efeitos hemodinâmicos da MMP-2 na ausência de qualquer condição de doença,

a hipótese deste trabalho é que a infusão intravenosa de MMP-2 recombinante humana (rhMMP-2) produza um aumento nos níveis e/ou atividade da MMPs capaz de produzir alterações hemodinâmicas em carneiros anestesiados, tanto em condições basais quanto de estimulação β -adrenérgica com dobutamina.

3 - OBJETIVOS

- 1- Investigar os efeitos hemodinâmicos da infusão intravenosa da rhMMP-2 em carneiros anestesiados,
- 2- Avaliar se a administração de rhMMP-2 prejudica a resposta cardiovascular produzida pela ativação de receptores β -adrenérgicos,
- 3- Verificar se a inibição de MMPs com doxiciclina é capaz de atenuar possíveis alterações hemodinâmicas.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Clonagem, expressão, purificação e verificação da expressão e atividade da rhMMP-2

A clonagem, expressão e purificação, bem como a verificação da expressão e atividade da rhMMP-2 produzida foram realizadas conforme descrito anteriormente (Goncalves, Meschiari *et al.*, 2012). Resumidamente, para a clonagem da MMP-2 humana, realizou-se o cultivo de células (linhagem primária de fibroblasto gengival humano) que expressam constitutivamente a MMP-2. Após a extração do RNA das células e obtenção do cDNA (DNA complementar) por RT-PCR (“*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*” ou reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa), seguiu-se a amplificação do gene que codifica a MMP-2 por PCR convencional utilizando a *Taq DNA polimerase*. Uma vez obtido várias cópias do DNA de interesse (DNA da MMP-2 humana), realizou-se a clonagem propriamente dita a partir do vetor de expressão pET5a, dando origem ao plasmídeo recombinante pET5a-hMMP-2. O DNA do plasmídeo foi isolado e a sequência do DNA confirmada pelo “*DNA Sequencing Facility*”. O plasmídeo recombinante foi então transformado (por choque térmico) a partir da linhagem de bactérias previamente competentes *Escherichia coli*: cepa *BL21 (DE3)/pLysS*. Após a recuperação do choque, as bactérias transformadas foram plaqueadas em meio Lúria-Bertani ágar (LB-ágar), contendo os antibióticos de resistência do vetor (ampicilina) e da bactéria (cloranfenicol). As colônias isoladas foram coletadas, inoculadas em meio LB e submetidas ao crescimento sob agitação de 180 rpm a 37° C overnight. Após os clones de maior expressão serem selecionados, os níveis de expressão foram testados sob diferentes condições de temperatura, de tempo de crescimento bacteriano e de concentrações de IPTG (“*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*”), um indutor da expressão gênica. Uma vez obtida as condições ideais de cultivo para uma maior expressão da proteína de interesse, seguiu-se a expansão da mini-cultura em meio LB. Após o cultivo bacteriano ter atingido a densidade óptica adequada (absorbância no espectrofotômetro entre 0,5 e 0,7 a 600 nm), acrescentou-se IPTG e o cultivo

bacteriano foi submetido ao crescimento (sob agitação de 150 rpm a 18° C por 18 horas). Após o crescimento, os meios foram centrifugados e o pellet formado foi sonificado em ultrassom para a lise celular. O lisado celular, contendo a proteína recombinante de interesse (a rhMMP-2) foi então centrifugado, o sobrenadante filtrado e submetido à purificação em coluna por cromatografia de afinidade com a Gelatin Sepharose® (resina modificada que contém gelatina). Por ser uma gelatinase e possuir afinidade por gelatina, a rhMMP-2 produzida fica retida na coluna. Após eluição da amostra em solução de DMSO, a rhMMP-2 purificada foi liofilizada e armazenada à -80° C. Uma vez obtida a proteína rhMMP-2, realizou-se a verificação da expressão em géis de SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* ou eletroforese em gel de poliacrilamida e de dodecil sulfato de sódio) e a avaliação da atividade gelatinolítica por zimografia e espectrofluorimetria.

4.2- Preparo animal

Este estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CETEA-FMRP) (nº 020/2007).

Vinte e seis carneiros mestiços machos (peso médio \pm desvio padrão = 20 \pm 2,8 kg), provenientes de criador particular, foram anestesiados, via intramuscular com cetamina (15 mg.kg⁻¹, União Química Farmacêutica®) e xilazina (0,2 mg.kg⁻¹, União Química Farmacêutica®). A manutenção da anestesia foi realizada a cada hora com cetamina (5 mg.kg⁻¹) e midazolam (0,3 mg.kg⁻¹, União Química Farmacêutica®) por via intramuscular.

Após a indução da anestesia, a veia femoral esquerda foi dissecada e canulada para ser utilizada como via de administração de drogas. Posteriormente, os animais foram entubados (sonda endotraqueal 7,0 com balão inflável) e

ventilados mecanicamente (Ventilador EFRA ROAD C.F., Palmer SWZ Ltda., London, UK), utilizando-se ar ambiente e volume corrente de 12-15 mL.kg⁻¹ (Westphal, Rehberg *et al.*, 2011). Para que a ventilação mecânica ocorresse de forma passiva, evitando-se competições respiratórias, foi administrado o bloqueador neuromuscular brometo de pancurônio (0,1 mg.kg⁻¹, Cristália[®]) por via intravenosa e doses de manutenção (0,05 mg.kg⁻¹) foram realizadas a cada hora até o término do experimento. A frequência respiratória foi ajustada de modo a se obter níveis fisiológicos (30-40 mmHg) da pressão parcial de gás carbônico ao final da expiração (ETCO₂).

Em seguida, os animais tiveram outros vasos sanguíneos dissecados e canulados. Um cateter foi introduzido na artéria femoral direita até sua extremidade posicionar-se na aorta abdominal a fim de obter-se uma medida direta da pressão arterial média (PAM). Um cateter de Swan-Ganz 7,5-F (Edwards Lifesciences, USA) foi introduzido na veia femoral direita até sua extremidade distal posicionar-se num dos ramos da artéria pulmonar, objetivando-se monitorar a pressão média da artéria pulmonar (PMAP) e a pressão de oclusão da artéria pulmonar (Poap). O lúmen proximal do cateter posicionou-se na veia cava caudal e foi utilizado para medir a pressão venosa central (PVC) e para determinar o débito cardíaco (DC) pelo método da termodiluição com o auxílio de um termistor também presente na extremidade do cateter. Todos os cateteres de pressão foram acoplados a transdutores de pressão de um monitor hemodinâmico (Dixtal modelo DX2010, Dixtal do Brasil, Manaus, Brasil). A frequência cardíaca (FC) foi avaliada por eletrocardiograma (ECG) de superfície (derivação DII).

Por fim, outro cateter foi inserido na câmara ventricular esquerda via artéria femoral esquerda a fim de monitorar a pressão do ventrículo esquerdo através de um sistema de aquisição (MP150CE, Biopac system, Goleta, CA) conectado a um computador (Acknowledge 3.2 para Windows; Microsoft, Redmond, WA). A velocidade máxima de elevação da pressão ventricular esquerda durante a sístole (dP/dt_{max} VE em mmHg/s) foi obtida e utilizada como índice de função sistólica do ventrículo esquerdo (VE).

4.3- Protocolos e grupos experimentais

Dois protocolos experimentais foram realizados a fim de avaliar as ações da rhMMP-2 sob condições basais (Protocolo I) e durante estimulação β -adrenérgica com dobutamina (Protocolo II). No protocolo I, os animais foram aleatoriamente distribuídos em 2 grupos experimentais: grupo Veículo (n=4), no qual foi administrado apenas salina; e o grupo rhMMP-2 (n=5) que recebeu infusão intravenosa de rhMMP-2 ($220 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) durante 60 minutos.

Quanto ao protocolo II, os animais aleatoriamente escolhidos foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- i) grupo Veículo (n=4): animais que receberam apenas infusões de salina;
- ii) grupo Dobut (n=4): animais que receberam infusões de salina seguida por infusão intravenosa de dobutamina ($5 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, Hipolabor Farmacêutica[®]) durante 180 minutos;
- iii) grupo rhMMP-2 + Dobut (n=7): animais pré-tratados com salina que receberam infusão intravenosa de rhMMP-2 ($220 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) durante 60 minutos seguida por infusão intravenosa de dobutamina ($5 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) durante 180 minutos; e
- iv) grupo Doxi + rhMMP-2 + Dobut (n=6): animais que receberam pré-tratamento com doxiciclina (10 mg.kg^{-1} , Rhobifarma Indústria Farmacêutica[®]) por via intravenosa durante 15 minutos seguido por infusão intravenosa de rhMMP-2 ($220 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) durante 60 minutos e seguida por infusão intravenosa de dobutamina ($5 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) durante 180 minutos.

As doses de doxiciclina e dobutamina administradas neste estudo foram determinadas com base em trabalhos prévios que mostraram efeitos hemodinâmicos benéficos e inibição de MMPs pela doxiciclina (Fortuna, Figueiredo-Lopes *et al.*, 2007; Rizzi, Castro *et al.*, 2010; Neto-Neves, Dias-Junior *et al.*, 2011) e efeito de estimulação β -adrenérgica em carneiros pela dobutamina (Yerebakan, Klopsch *et al.*, 2010). Já a dose de rhMMP-2 foi estabelecida a partir dos níveis fisiológicos circulantes de MMP-2 comumente encontrados em

indivíduos saudáveis, uma vez que em carneiros estes níveis são desconhecidos (Singh, Haridas *et al.*; Muhl, Nagy *et al.*, 2011; Palei, Sandrim *et al.*, 2012). Cerca de 260 µg de MMP-2 foram administradas em cada animal (220 ng x 20 kg x 60 min), de modo a obter-se uma concentração sanguínea de rhMMP-2 capaz de dobrar os níveis circulantes de MMP-2, considerando-se que o volume sanguíneo de um animal de 20 kg é em torno de 1,6 litros (8% do peso corporal), e desconsiderando-se a diferença de concentração de MMP-2 entre espécies e a degradação da enzima administrada.

4.4- Desenho experimental e avaliações hemodinâmicas

Após anestesia, monitoramento e estabilização hemodinâmica por pelo menos 20 minutos, foi realizada a avaliação hemodinâmica basal (BL). Em seguida, avaliações hemodinâmicas foram realizadas 15 minutos após o término da infusão de doxiciclina (ou salina) (dado não mostrado), 30 e 60 minutos após o início da infusão de rhMMP-2 (ou salina) e a cada 30 minutos durante a infusão de dobutamina (ou salina) ao longo de 180 minutos.

Amostras de sangue arterial foram coletadas durante os momentos basal e final (240), e o plasma foi separado e armazenado a -80°C para posterior análise bioquímica. Após a avaliação hemodinâmica final, os animais foram eutanaziados por meio de injeção intravenosa de sobredose de anestésicos (cetamina e xilazina). Foi realizada toracotomia pela qual o coração foi rapidamente acessado e amostras do tecido do ventrículo esquerdo (VE) foram coletadas, lavadas em salina, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C para as análises bioquímicas. O desenho experimental está esquematicamente ilustrado na figura 5.

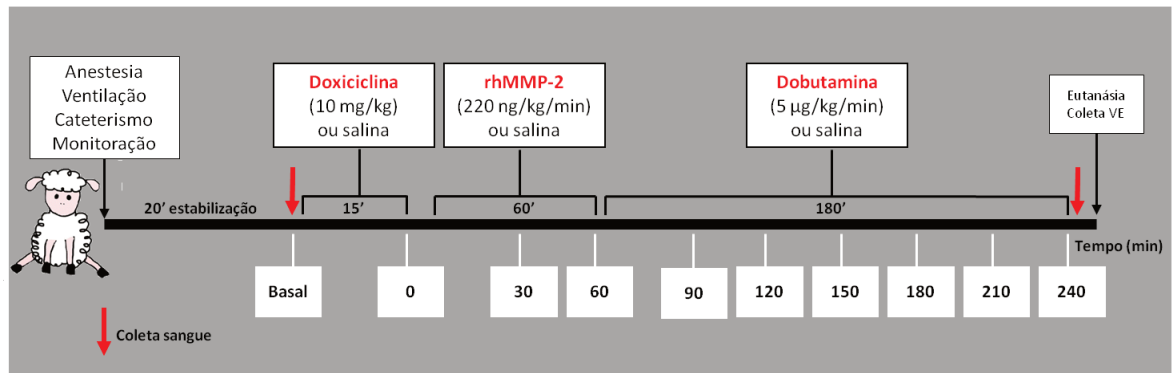


Figura 5: Ilustração esquemática do desenho experimental.

As medidas hemodinâmicas avaliadas no estudo foram as seguintes: pressão arterial média (PAM) e índice de resistência vascular sistêmica (IRVS), pressão média da artéria pulmonar (PMAP) e índice de resistência vascular pulmonar (IRVP), frequência cardíaca (FC) e índice cardíaco (IC), e dP/dt máxima do ventrículo esquerdo (dP/dt_{max} VE). Os parâmetros hemodinâmicos IC, IRVS e IRVP foram calculados através das fórmulas a seguir:

$$IC = \frac{DC}{ASC^*}$$

* área de superfície corpórea, calculada segundo a fórmula abaixo:

$$ASC = \{ \text{peso (kg)} \}^{0,425} \times \{ \text{altura(m)} \}^{0,007184}$$

$$IRVS = \frac{PAM - PVC}{IC} \times 80^*$$

$$IRVP = \frac{PMAP - Poap}{IC} \times 80^*$$

* constante que converte mmHg/L/min em $\text{din.s/cm}^5/\text{m}^2$.

Uma vez obtido os parâmetros hemodinâmicos em estudo, fez-se o cálculo da diferença destas medidas entre cada momento em análise e o momento basal (Δ) a fim de melhor avaliar possíveis alterações hemodinâmicas em relação ao basal decorrentes da infusão das drogas estudadas.

4.5- Quantificação de MMP-2 por zimografia no plasma e no ventrículo esquerdo

Os níveis plasmáticos de MMP-2 e as concentrações de MMP-2 no ventrículo esquerdo foram determinados por zimografia, técnica que consiste em uma eletroforese em gel desnaturante de acrilamida co-polimerizado com gelatina (substrato para a MMP-2). Resumidamente, amostras do ventrículo esquerdo foram trituradas e homogeneizadas em tampão de extração (50 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM CaCl_2 , 1 mM de 1,10-fenantrolina, 1 mM de PMSF (“*phenylmethylsulfonyl fluoride*” ou fluoreto de fenilmetilsulfato) e 1 mM de NEM (“*N-Ethylmaleimide*” ou N-etilmaleimida)), e incubadas overnight por aproximadamente 16 horas. Os extratos dos tecidos foram centrifugados (1000 G por 15 minutos) e o sobrenadante recolhido para determinação protéica pelo método de Bradford. Em seguida, as amostras de plasma e do ventrículo esquerdo (20 μg), juntamente com o tampão de corrida (SDS 2%, Tris-HCl 125 mM, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,001%) foram aquecidas em banho-maria (40°C) por 15 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 7% co-polimerizado com gelatina a 1% como substrato. A corrida eletroforética ocorreu em uma corrente eletroforética de 13 mA (miliampère) por gel durante 4 horas à 4°C. Após eletroforese, os géis foram submetidos a 2 banhos de Triton X-100 a 2% à temperatura ambiente por 30 minutos para a renaturação protéica e incubados em estufa a 37°C por 18 horas em tampão Tris-HCl, pH 7,4, contendo 10 mM de CaCl_2 . Posteriormente, os géis foram fixados e corados em 30% de metanol, 10% em ácido acético e 0,05% de Coomassie

Brilliant Blue G-250 por 3 horas, e subsequentemente descorados em solução de metanol a 30% e ácido acético 10%. Os géis foram escaneados e as imagens digitais gravadas. A atividade gelatinolítica foi detectada como as bandas não coradas contra o fundo azul correspondente à gelatina corada com Coomassie blue. A forma da MMP-2 foi identificada pela banda de 72 kDa e a intensidade das bandas foi avaliada por densitometria utilizando o programa ImageJ, versão 1.43u (NIH – National Institutes of Health). A análise entre os géis foi possível após a normalização da atividade gelatinolítica com um padrão interno (soro fetal bovino).

4.6- Ensaio de atividade gelatinolítica no tecido cardíaco

A atividade gelatinolítica das MMPs no ventrículo esquerdo foi avaliada por espectrofluorimetria utilizando o Kit EnzChek® Gelatinase/Collagenase (E12055, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA). Inicialmente, amostras do ventrículo esquerdo foram trituradas e homogeneizadas em tampão de extração (50 mM de Tris-HCl, pH 7,4 e 10 mM de CaCl₂) e incubadas overnight por aproximadamente 16 horas. Os extratos dos tecidos foram centrifugados (1000 G por 15 minutos) e o sobrenadante recolhido para determinação protéica pelo método de Bradford. Posteriormente, 500 µg do extrato do tecido e 12,5 µg/mL do substrato (Dq gelatin) juntamente com o tampão (Tris-HCl a 50 mM e CaCl₂ a 10 mM) foram aplicados, em duplicata, em cada poço de uma microplaca. A atividade gelatinolítica foi determinada em um espectrofluorímetro de microplaca ($\lambda_{excitação}$ 485, $\lambda_{emissão}$ 520 nm; Gemini EM, Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA), após 120 minutos de incubação a 37°C. Uma curva padrão de atividade gelatinolítica utilizando colagenase purificada de *Clostridium histolyticum* como padrão foi preparada como recomendado pelo fabricante. Ensaios com inibidores de proteases como a fenantrolina 1 mM (inibidor de metaloproteinases) e PMSF 1mM + NEM 1 mM (inibidores de serina e cisteína proteases, respectivamente)

foram realizados para determinar a atividade referente às MMPs no ventrículo esquerdo.

4.7- Cultura primária de cardiomiócitos

A fim de melhor investigar os efeitos da MMP-2 sobre o coração, utilizou-se um modelo *in vitro* de cultivo de células cardíacas, isoladas e preparadas por desagregação enzimática como descrito previamente (Kim, Villarreal *et al.*, 1995). Resumidamente, neonatos (1 dia de vida) de ratos Wistar foram sacrificados por degola, os corações foram rapidamente retirados e os ventrículos cortados em pequenos pedaços e transferidos para o tampão ADS (116,4 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 5,6 mM d-glicose, 10,9 mM NaH₂PO₄, 405,7 μM MgSO₄, 20 mM HEPES, pH 7,3). Em seguida, os tecidos foram submetidos a sucessivas digestões enzimáticas a 37°C por 12 minutos cada utilizando a enzima colagenase (CLS-2, Worthington Biochemical®, Lakewood, New Jersey, EUA). A solução obtida de cada digestão foi transferida para um tubo contendo 1 mL de NCS (“*Newborn Calf Serum*” ou soro bovino de recém-nascido), centrifugada (1000 G por 5 minutos) e o pellet celular ressuspensionado em 2 mL de NCS. Para separar os miócitos dos fibroblastos, a suspensão celular foi transferida para tubos contendo gradientes de Percoll de 2 fases. Após centrifugação (3000 G por 30 minutos), as bandas de miócitos separadas foram retiradas cuidadosamente e lavadas em tampão ADS para a remoção de traços de Percoll. Por fim, o pellet contendo os miócitos foi ressuspensionado no meio de cultivo DMEM (“*Dulbecco's Modified Eagle Medium*”) contendo 5% de NCS e 10% de HS (“*Horse Serum*” ou soro de cavalo), plaqueados e mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

4.8- Determinação do AMP cíclico em cultura de cardiomiócitos

A fim de investigar se a MMP-2 afeta a responsividade de receptores β -adrenérgicos no coração, avaliou-se a concentração de AMP cíclico em cultura de cardiomiócitos estimulada com dobutamina na presença de rhMMP-2.

Para analisar a concentração de AMP cíclico, os miócitos cardíacos foram plaqueados em placas de 6 poços na densidade de 6×10^5 células/poço e mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 3 a 5 dias ou até atingirem a confluência de cerca de 80%. Uma vez confluentes, as células tiveram o meio de cultivo substituído por DMEM livre de soro pelo menos 1 hora antes dos miócitos serem submetidos aos diferentes tratamentos. Seguiram-se então os tratamentos. Primeiramente, os cardiomiócitos (n=6 por grupo) foram pré-tratados com os inibidores de MMPs doxíciclina (10 μ M), ONO-4817 (10 μ M) ou veículo durante 30 minutos. Em seguida, realizou-se o tratamento das células com rhMMP-2 (12, 40 e 120 nM) ou veículo por 60 minutos e posteriormente as células foram estimuladas com diferentes concentrações de dobutamina (0,1, 1, 10 e 100 μ M) ou veículo durante 15 minutos. Após estes tratamentos, o meio celular foi aspirado e os miócitos cardíacos incubados com HCl 0,1 M por 20 minutos para a lise celular. As células foram então desprendidas da placa com o auxílio de um rodo de borracha e a suspensão celular homogeneizada com pipeta, centrifugada (1000 G por 10 minutos) e o sobrenadante coletado para a avaliação das concentrações de AMP cíclico por EIA (Enzyme Immunoassay) utilizando o kit Cyclic AMP EIA (581001; Cayman Chemical, MI, USA).

4.9- Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism, versão 5.01 para Windows (GraphPad software). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Os resultados hemodinâmicos foram analisados por ANOVA (análise de variância) de 2 vias (tratamentos vs tempo) seguida pelo teste post hoc Bonferroni. Já os dados bioquímicos foram analisados por ANOVA de 1 via seguida pelo teste post hoc Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média) e um valor de probabilidade menor que 0,05 foi considerado o nível mínimo de significância estatística.

5 – RESULTADOS

5.1. Avaliação da expressão e atividade da rhMMP-2

A expressão da rhMMP-2 purificada foi avaliada a partir de géis de SDS-PAGE. Estes géis revelaram uma proteína com algumas bandas, sendo a banda mais intensa o correspondente à MMP-2 de 72 kDa (Figura 6A). Já os géis de zimografia revelaram uma proteína com significativa atividade gelatinolítica apresentando uma banda intensa referente à MMP-2 de 72 kDa e outras bandas menores provavelmente referentes aos produtos de degradação da rhMMP-2 (Figura 6B).

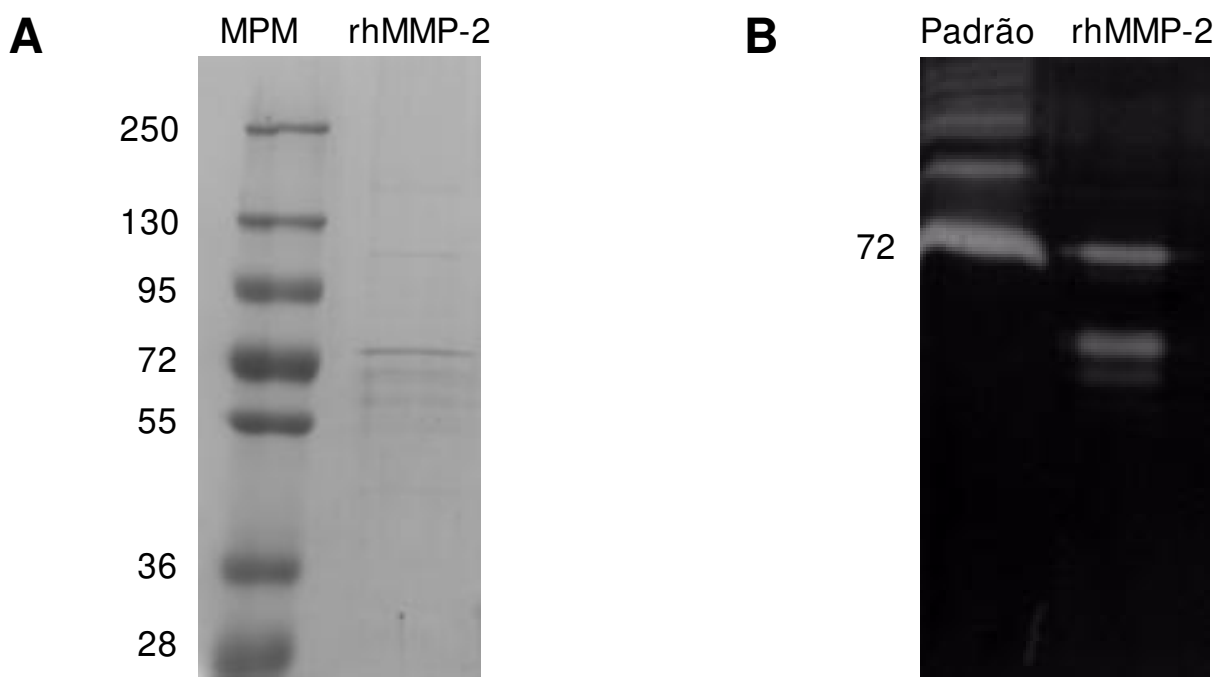


Figura 6: (A) Gel representativo de SDS-PAGE evidenciando a banda de 72 kDa da rhMMP-2. MPM = Marcador de peso molecular. (B) Zimograma representativo mostrando a banda de 72 kDa da rhMMP-2. Soro Fetal Bovino foi utilizado como padrão.

Quanto ao ensaio de atividade por espectrofluorimetria, foi observado um aumento gradual e de modo tempo-dependente na atividade gelatinolítica da rhMMP-2 purificada, sendo esta semelhante a atividade obtida pelo padrão. Adicionalmente, verificou-se que a fenantrolina, um inibidor sintético de MMPs, inibiu a atividade gelatinolítica da rhMMP-2 (Figura 7).

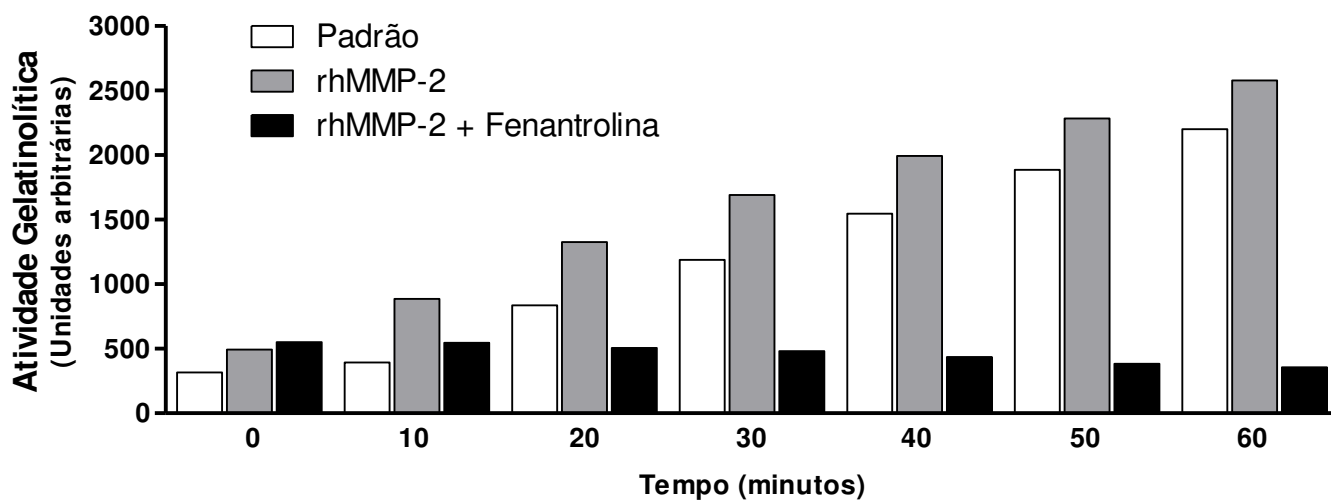


Figura 7: Avaliação da atividade gelatinolítica da rhMMP-2 e da inibição da atividade gelatinolítica com fenantrolina (100 μ M) ao longo de 60 minutos. Colagenase purificada de *Clostridium histolyticum* foi utilizada como padrão.

5.2. Avaliação dos efeitos hemodinâmicos da rhMMP-2 (Protocolo I)

Quanto aos resultados hemodinâmicos do protocolo I, foi observado que a infusão intravenosa de rhMMP-2 não foi capaz de produzir alterações significativas nas medidas hemodinâmicas de pressão arterial média (PAM) e índice de resistência vascular sistêmico (IRVS) (Figura 8), pressão média da artéria pulmonar (PMAP) e índice de resistência vascular pulmonar (IRVP) (Figura 9), e tampouco na frequência cardíaca (FC) e índice cardíaco (IC) (Figura 10). Da mesma forma, nenhuma mudança significativa foi observada na dP/dt máxima do ventrículo esquerdo (dP/dt_{\max} VE) quando a rhMMP-2 foi administrada (Figura 11).

Todos os parâmetros hemodinâmicos foram semelhantes no momento basal entre os dois grupos experimentais estudados. Pequenas flutuações nas medidas hemodinâmicas foram observadas entre os diferentes momentos, porém não foram estatisticamente significativas (Figuras 8-11).

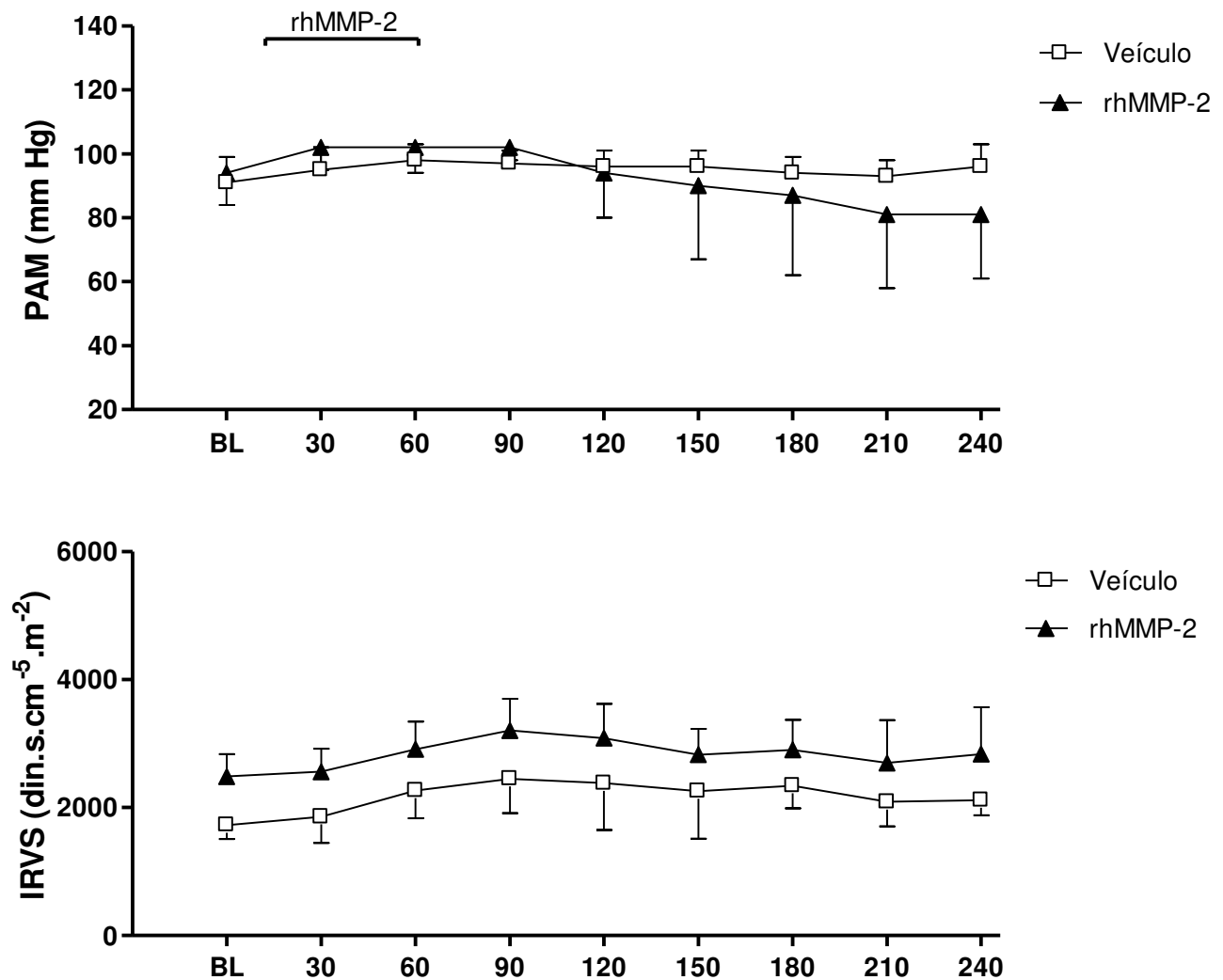


Figura 8: Avaliação da Pressão Arterial Média (PAM) e do Índice de Resistência Vascular Sistêmico (IRVS) no momento basal (BL), durante e após a infusão de $220 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ de rhMMP-2 (momentos 30 e 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240) ou salina nos grupos rhMMP-2 ($n=5$) ou Veículo ($n=4$), respectivamente. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M.

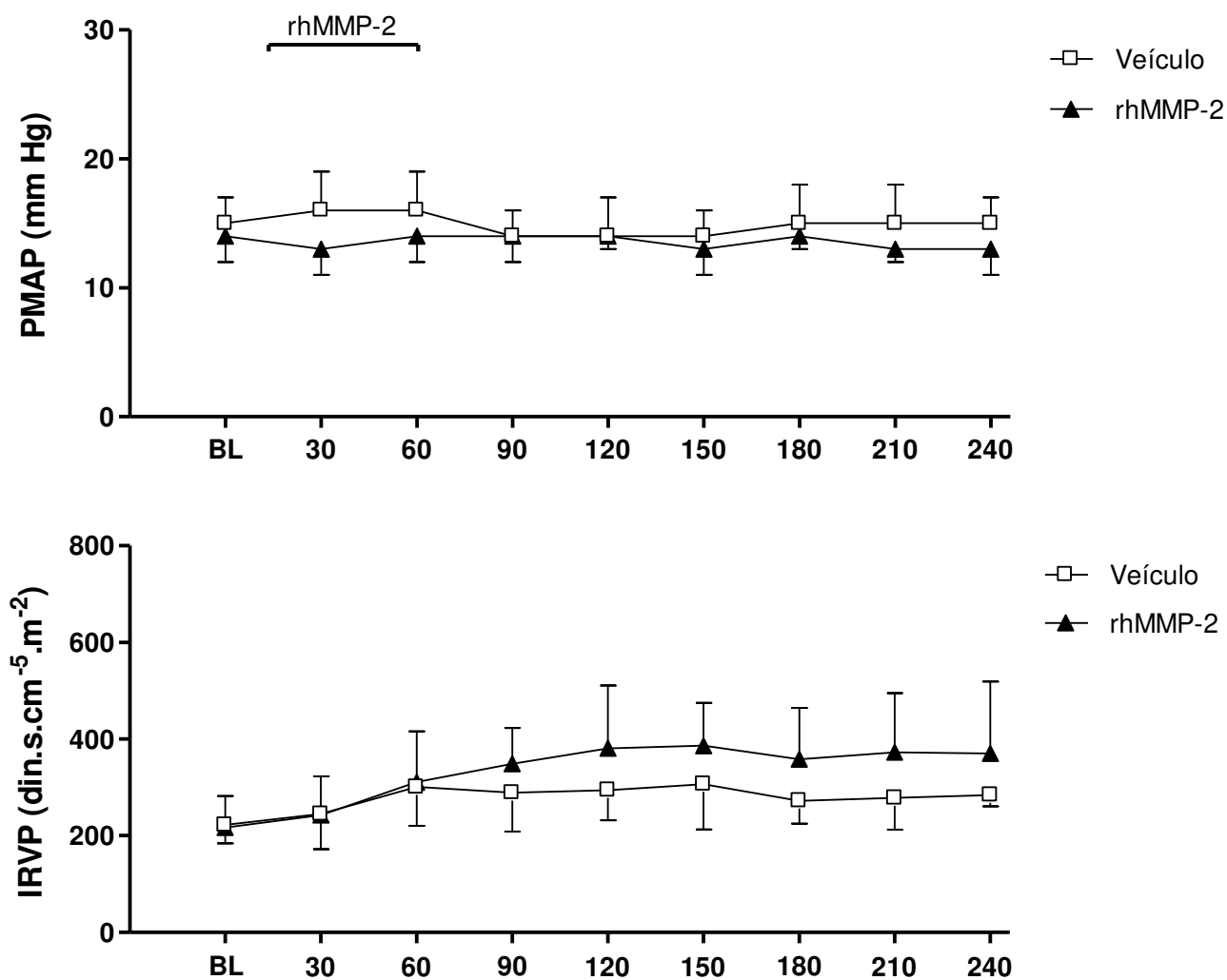


Figura 9: Avaliação da Pressão Média da Artéria Pulmonar (PMAP) e do Índice de Resistência Vascular Pulmonar (IRVP) no momento basal (BL), durante e após a infusão de $220 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ de rhMMP-2 (momentos 30 e 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240) ou salina nos grupos rhMMP-2 ($n=5$) ou Veículo ($n=4$), respectivamente. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M.

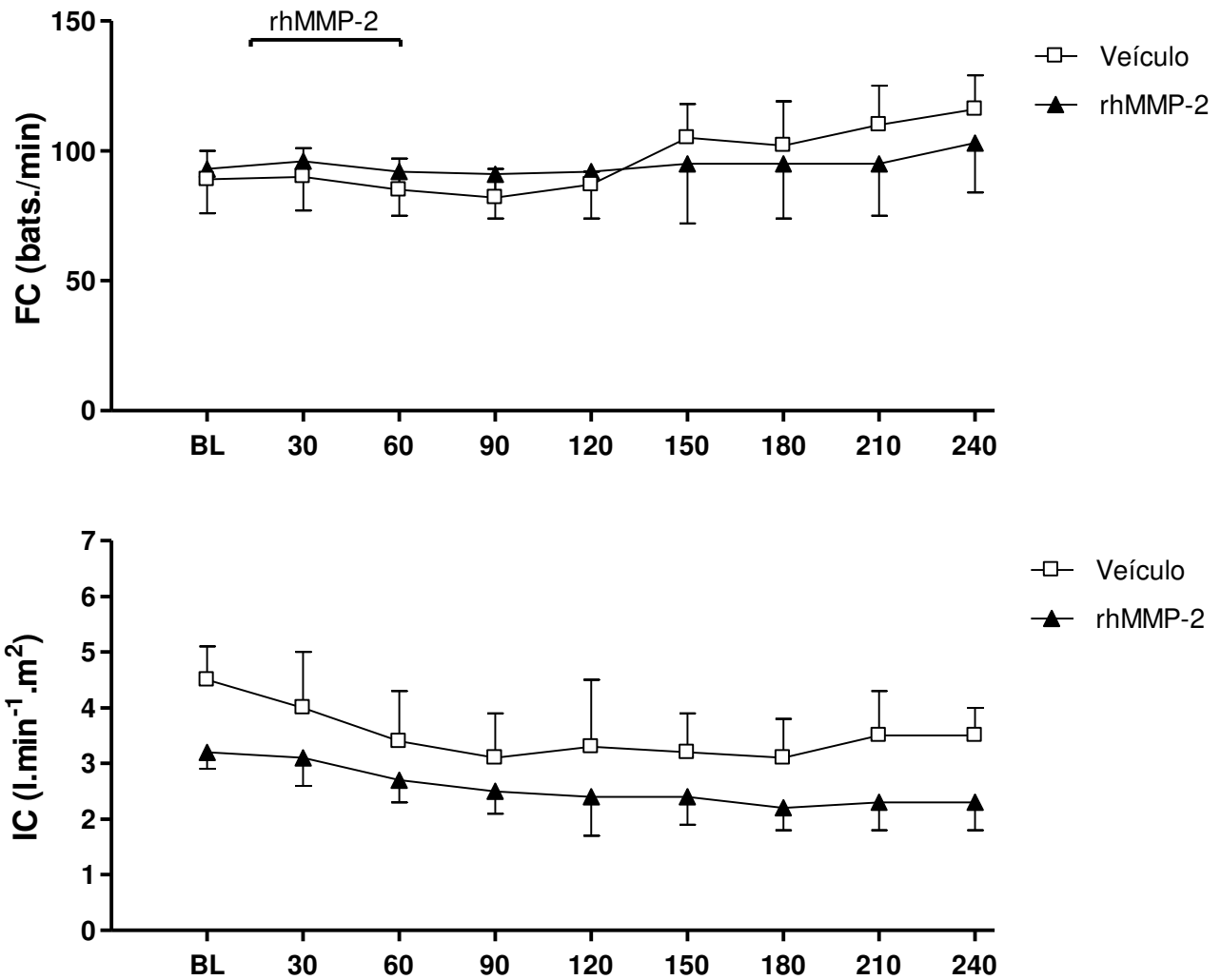


Figura 10: Avaliação da Frequência Cardíaca (FC) e Índice Cardíaco (IC) no momento basal (BL), durante e após a infusão de $220 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ de rhMMP-2 (momentos 30 e 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240) ou salina nos grupos rhMMP-2 ($n=5$) ou Veículo ($n=4$), respectivamente. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M.

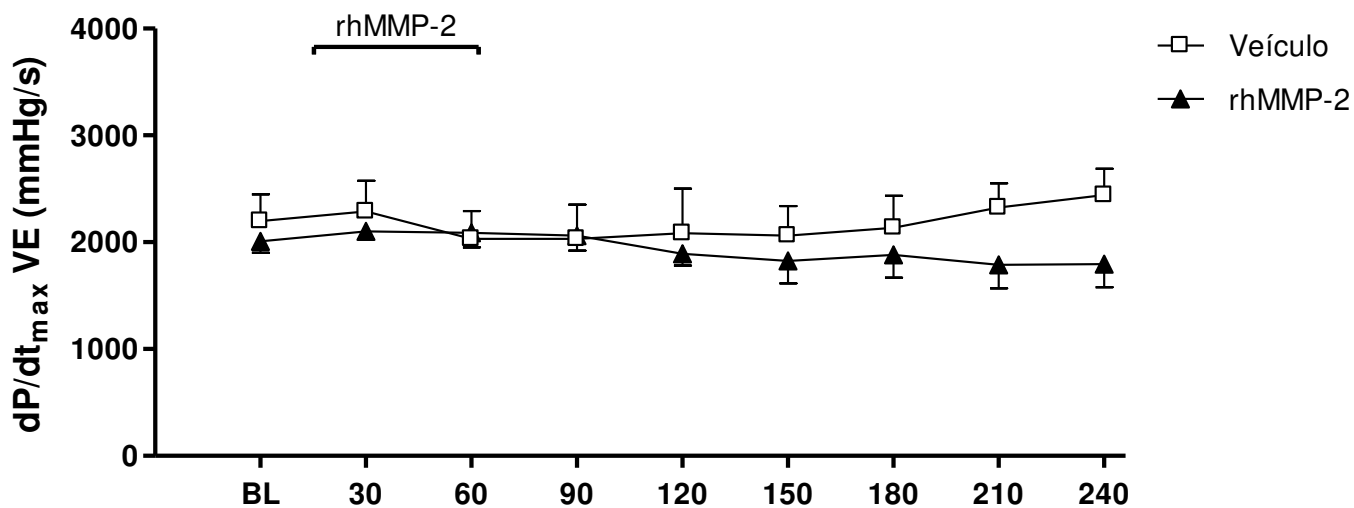


Figura 11: Avaliação da velocidade máxima de elevação da pressão ventricular esquerda durante a sístole ($dP/dt_{max} VE$) no momento basal (BL), durante e após a infusão de $220 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ de rhMMP-2 (momentos 30 e 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240) ou salina nos grupos rhMMP-2 ($n=5$) ou Veículo ($n=4$), respectivamente. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M.

5.3. Avaliação dos efeitos hemodinâmicos da rhMMP-2 durante estímulo β -adrenérgico (Protocolo II)

Em relação aos resultados hemodinâmicos do protocolo II, verificou-se, primeiramente, que todas as medidas hemodinâmicas no momento basal (BL) foram similares entre os grupos experimentais. Além disso, os parâmetros hemodinâmicos dos animais que receberam somente infusões de salina (grupo Veículo) não apresentaram nenhuma mudança significativa durante os 240 minutos de monitoramento (Figuras 12-17).

A figura 12 mostra que, em relação à pressão arterial média (PAM), tanto a infusão de dobutamina isoladamente quanto a co-infusão de rhMMP-2 e dobutamina não foram capazes de produzir alterações significativas nesta medida.

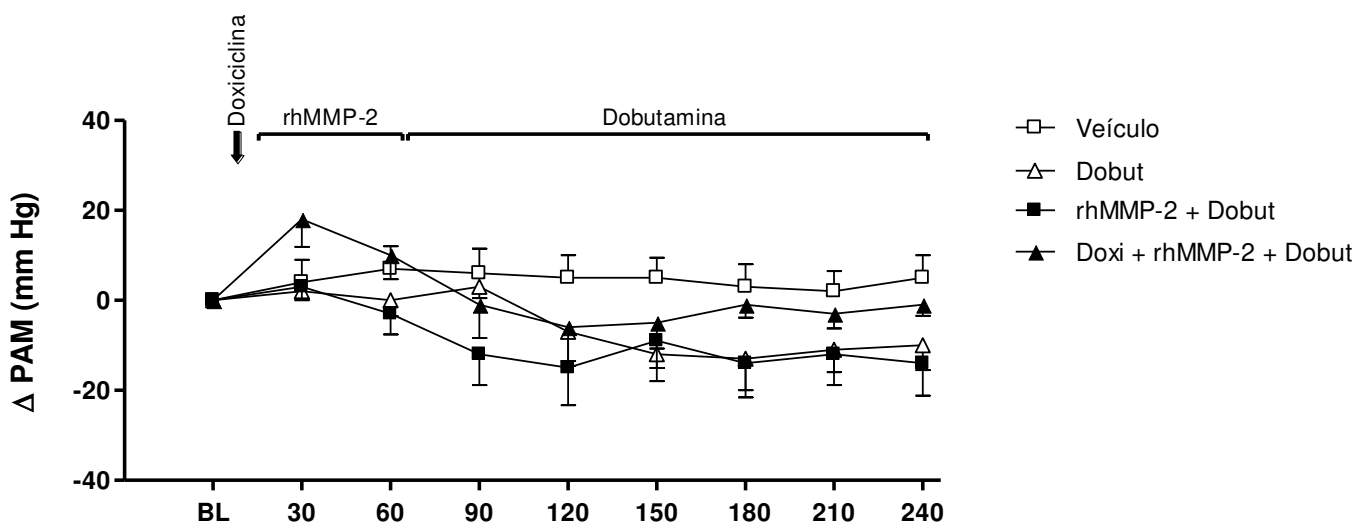


Figura 12: Avaliação do delta da Pressão Arterial Média (Δ PAM) ao longo do tempo nos grupos Veículo (n=4), Dobut (n=4), rhMMP-2+Dobut (n=7) e Doxi+rhMMP-2+Dobut (n=6) no momento basal (BL), durante a infusão de $220 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ de rhMMP-2 (momentos 30 e 60) ou salina, e durante a infusão de $5 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ de dobutamina (momentos 90, 120, 150, 180, 210 e 240) ou salina. A seta indica a infusão de 10 mg.kg^{-1} de doxiciclina ou salina por 15 min. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M.

Quanto ao índice de resistência vascular sistêmico (IRVS), diferentemente da PAM, observou-se uma queda significativa nesta medida quando a dobutamina foi infundida durante os momentos 90, 120, 150 e 180 nos grupos *Dobut* e *Doxi+rhMMP-2+Dobut* ($P < 0,05$). Por outro lado, a co-infusão de rhMMP-2 e dobutamina prejudicou esta queda no IRVS induzida pela dobutamina, particularmente no momento final (240 min) como visto no grupo *rhMMP-2+Dobut* ($P < 0,05$). Entretanto, como pode ser observado no grupo *Doxi+rhMMP-2+Dobut*, o pré-tratamento com doxiciclina impediu este efeito da rhMMP-2 em resposta à dobutamina, principalmente no momento 240 ($P < 0,01$; Figura 13).

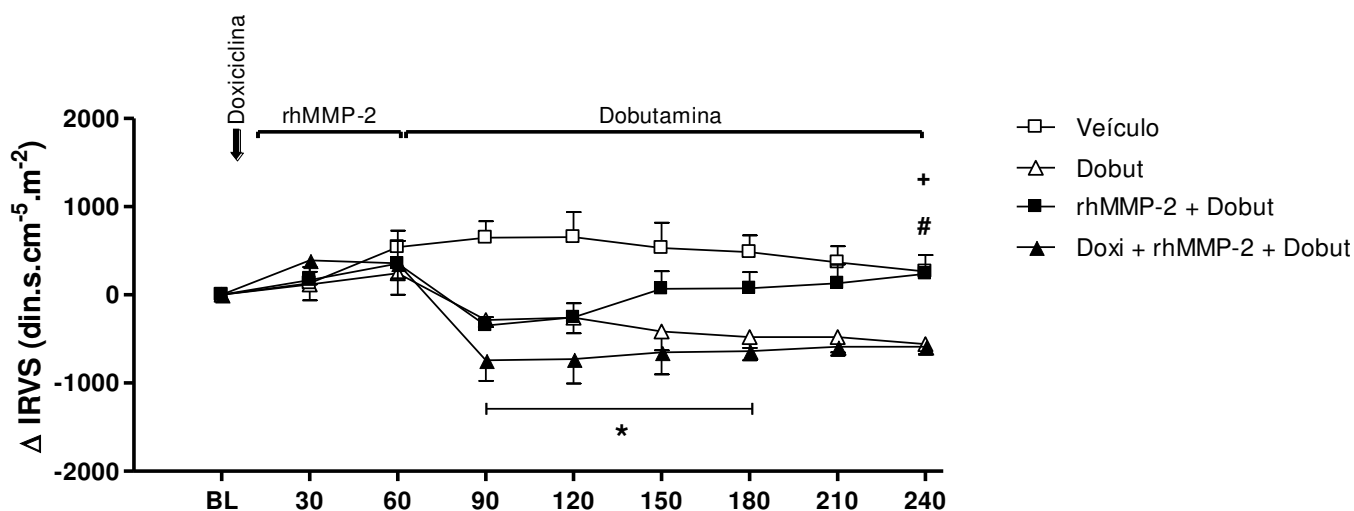


Figura 13: Avaliação do delta do Índice de Resistência Vascular Sistêmico (Δ IRVS) ao longo do tempo nos grupos Veículo ($n=4$), Dobut ($n=4$), rhMMP-2+Dobut ($n=7$) e Doxi+rhMMP-2+Dobut ($n=6$) no momento basal (BL), durante a infusão de $220 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ de rhMMP-2 (momentos 30 e 60) ou salina, e durante a infusão de $5 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ de dobutamina (momentos 90, 120, 150, 180, 210 e 240) ou salina. A seta indica a infusão de 10 mg.kg^{-1} de doxiciclina ou salina por 15 min. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. Grupos Veículo vs Dobut e Doxi+rhMMP-2+Dobut ($* P < 0,05$); Dobut vs rhMMP-2+Dobut ($\# P < 0,05$); rhMMP-2+Dobut vs Doxi+rhMMP-2+Dobut ($+ P < 0,05$).

Em relação ao leito pulmonar, não foram encontradas diferenças significativas nas medidas de pressão média da artéria pulmonar (PMAP) e do índice de resistência vascular pulmonar (IRVP) com a administração das drogas em estudo (Figura 14).

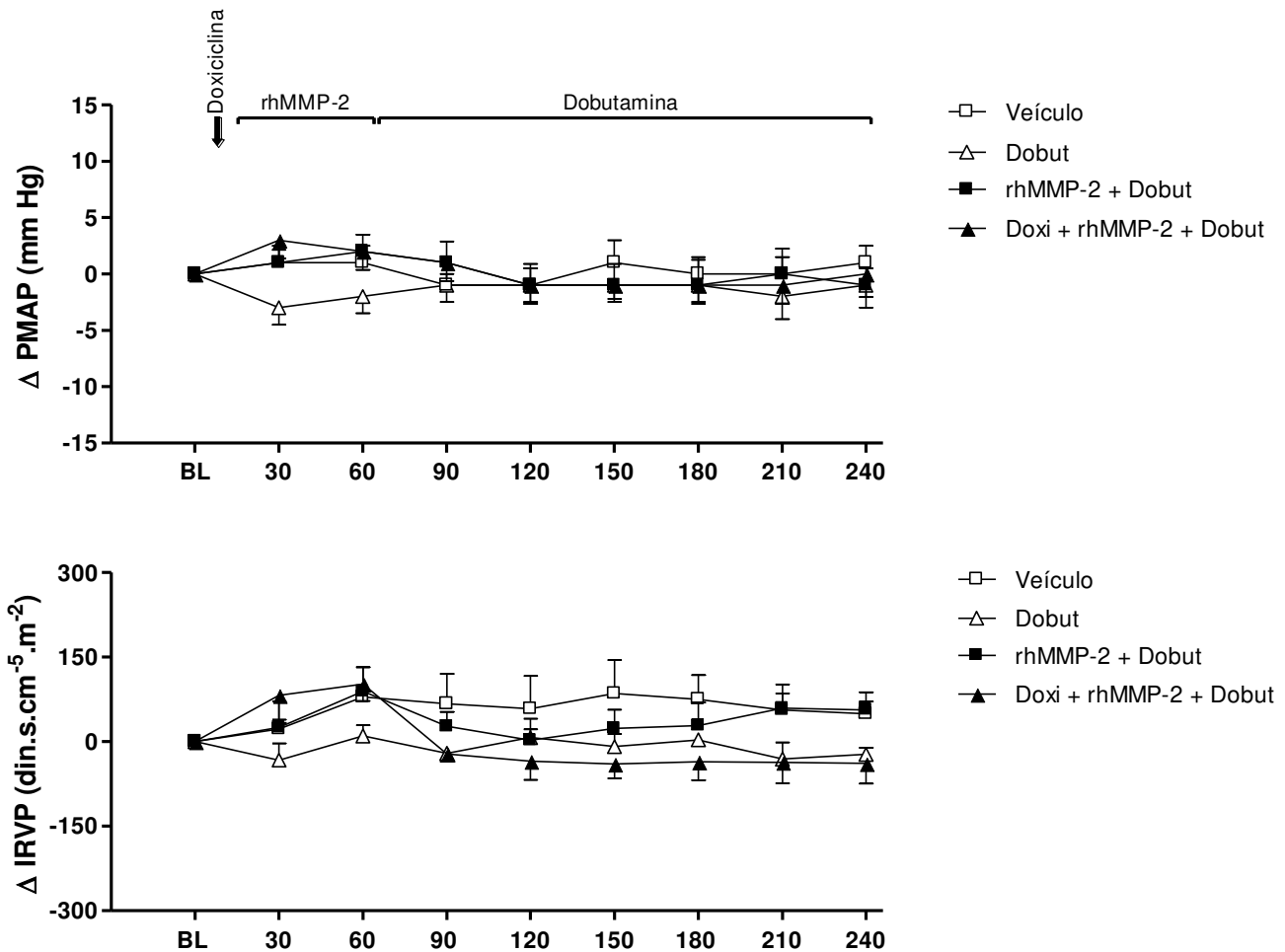


Figura 14: Avaliação do delta da Pressão Média da Artéria Pulmonar (Δ PMAP) e do Índice de Resistência Pulmonar Sistêmico (Δ IRVP) ao longo do tempo nos grupos Veículo (n=4), Dobut (n=4), rhMMP-2+Dobut (n=7) e Doxi+rhMMP-2+Dobut (n=6) no momento basal (BL), durante a infusão de $220 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ de rhMMP-2 (momentos 30 e 60) ou salina, e durante a infusão de $5 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ de dobutamina (momentos 90, 120, 150, 180, 210 e 240) ou salina. A seta indica a infusão de 10 mg.kg^{-1} de doxiciclina ou salina por 15 min. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M.

Adicionalmente, foram observados aumentos significativos e sustentados na frequência cardíaca (FC) em resposta a infusão de dobutamina nos grupos *Dobut*, *rhMMP-2+Dobut* e *Doxi+rhMMP-2+Dobut* ($P < 0,001$). Estas elevações na FC não sofreram alterações com a administração de rhMMP-2 e doxíciclina (Figura 15).

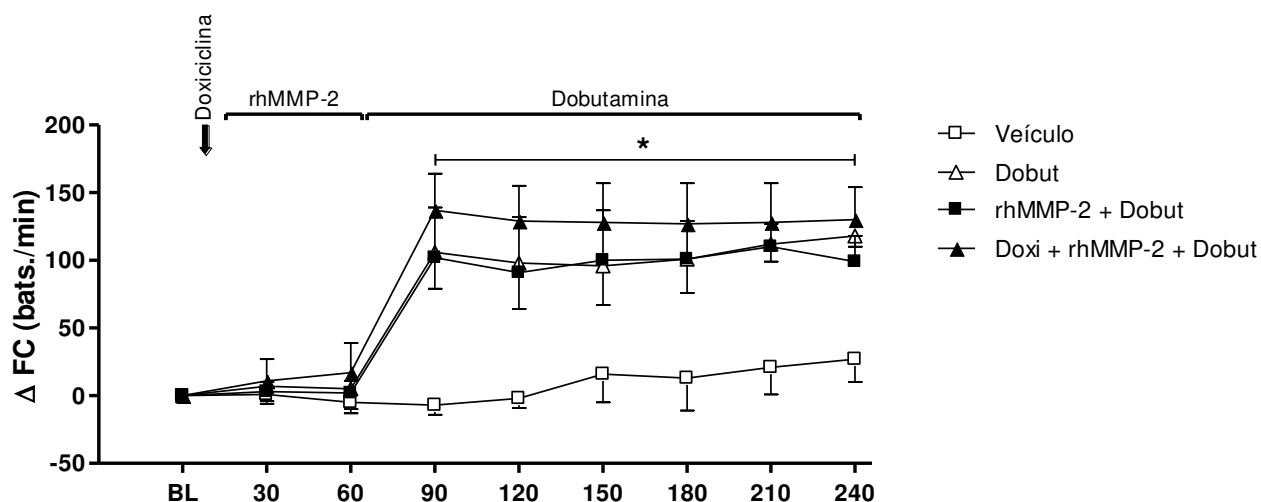


Figura 15: Avaliação do delta da Frequência Cardíaca (ΔFC) ao longo do tempo nos grupos Veículo ($n=4$), Dobut ($n=4$), rhMMP-2+Dobut ($n=7$) e Doxi+rhMMP-2+Dobut ($n=6$) no momento basal (BL), durante a infusão de $220 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ de rhMMP-2 (momentos 30 e 60) ou salina, e durante a infusão de $5 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ de dobutamina (momentos 90, 120, 150, 180, 210 e 240) ou salina. A seta indica a infusão de 10 mg.kg^{-1} de doxíciclina ou salina por 15 min. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. Grupos Veículo vs Dobut, rhMMP-2+Dobut e Doxi+rhMMP-2+Dobut (* $P < 0,05$).

Quanto ao índice cardíaco (IC), este tendeu a aumentar com a infusão de dobutamina, porém a alteração não foi significativa. Entretanto, a co-infusão de rhMMP-2 e dobutamina foi associada com um menor aumento no IC induzido pela dobutamina, principalmente nos momentos 210 e 240 ($P < 0,05$). A administração prévia de doxiciclina foi capaz de impedir os efeitos da rhMMP-2 frente a estimulação β -adrenérgica ($P < 0,05$; Figura 16).

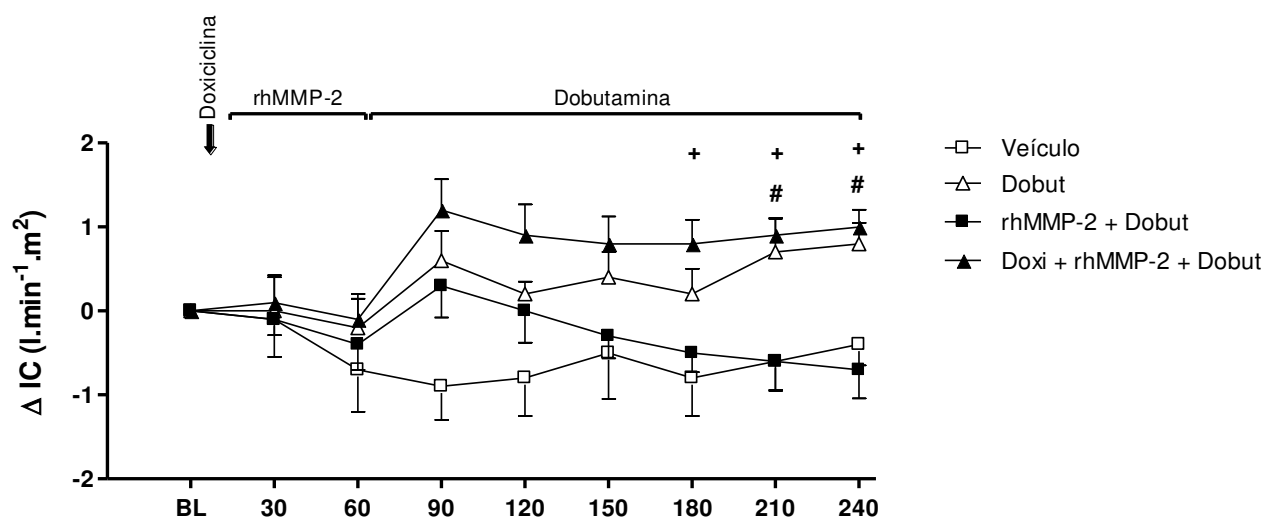


Figura 16: Avaliação do delta do Índice Cardíaco (Δ IC) ao longo do tempo nos grupos Veículo ($n=4$), Dobut ($n=4$), rhMMP-2+Dobut ($n=7$) e Doxi+rhMMP-2+Dobut ($n=6$) no momento basal (BL), durante a infusão de $220 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ de rhMMP-2 (momentos 30 e 60) ou salina, e durante a infusão de $5 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ de dobutamina (momentos 90, 120, 150, 180, 210 e 240) ou salina. A seta indica a infusão de 10 mg.kg^{-1} de doxiciclina ou salina por 15 min. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. Grupos Dobut vs rhMMP-2+Dobut ($\# P < 0,05$); rhMMP-2+Dobut vs Doxi+rhMMP-2+Dobut ($\dagger P < 0,05$).

Em relação à função contrátil do coração, verificou-se que a infusão de dobutamina produziu um aumento de, em média, 80% na dP/dt_{\max} VE como observado no grupo *Dobut* ($P < 0,001$). Interessantemente e em paralelo com o IC, a co-infusão de rhMMP-2 e dobutamina foi associada com menores aumentos induzidos pelo agonista β -adrenérgico na dP/dt_{\max} VE, principalmente nos momentos finais (150, 180, 210 e 240) ($P < 0,05$). E, novamente, o pré-tratamento com doxiciclina foi capaz de impedir os efeitos da rhMMP-2 na resposta à dobutamina ($P < 0,05$) (Figura 17).

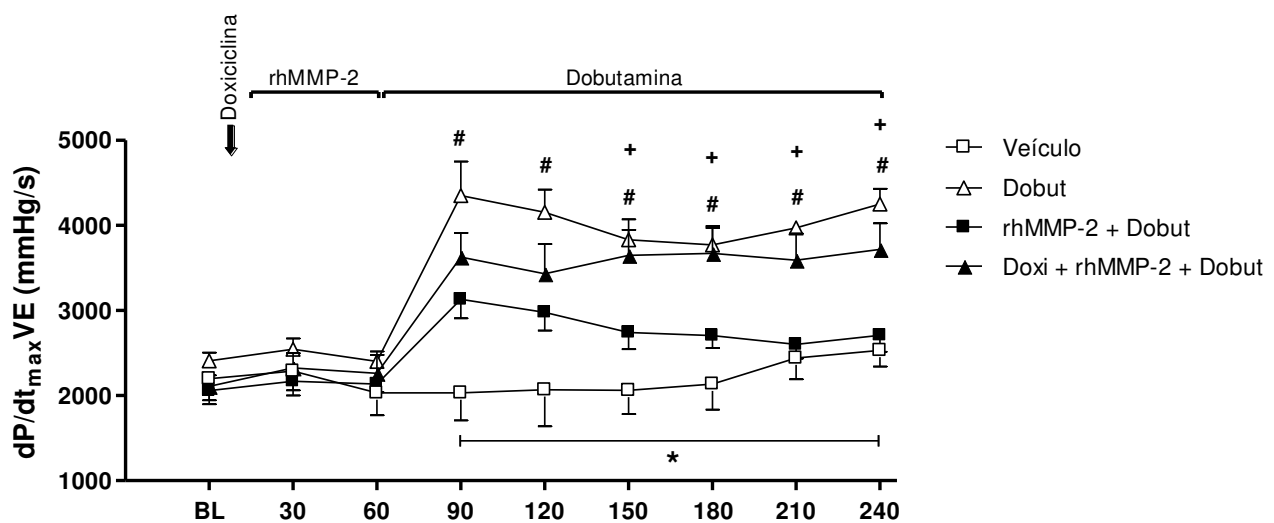


Figura 17: Avaliação da velocidade máxima de elevação da pressão ventricular esquerda durante a sístole (dP/dt_{\max} VE) ao longo do tempo nos grupos Veículo ($n=4$), Dobut ($n=4$), rhMMP-2+Dobut ($n=7$) e Doxi+rhMMP-2+Dobut ($n=6$) no momento basal (BL), durante a infusão de $220 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ de rhMMP-2 (momentos 30 e 60) ou salina, e durante a infusão de $5 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ de dobutamina (momentos 90, 120, 150, 180, 210 e 240) ou salina. A seta indica a infusão de 10 mg.kg^{-1} de doxiciclina ou salina por 15 min. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. Grupos Veículo vs Dobut e Doxi+rhMMP-2+Dobut (* $P < 0,05$); Dobut vs rhMMP-2+Dobut (# $P < 0,05$); rhMMP-2+Dobut vs Doxi+rhMMP-2+Dobut (+ $P < 0,05$).

A fim de melhor analisar os efeitos da rhMMP-2 na função sistólica do coração, foi avaliada as diferenças na dP/dt_{\max} VE entre os momentos *90* e *basal* ($\Delta 90$) e entre os momentos *final* e *basal* ($\Delta 240$) conforme mostrado na figura 18. Em relação ao $\Delta 90$, observou-se que a infusão de dobutamina aumentou significativamente a dP/dt_{\max} VE em todos os grupos que receberam a respectiva droga (Dobut, rhMMP-2+Dobut e Doxi+rhMMP-2+Dobut) ($P < 0,05$). A co-infusão de rhMMP-2 não foi capaz de alterar significativamente este aumento produzido pela dobutamina. Já em relação ao $\Delta 240$, observou-se que enquanto a função sistólica do VE foi significativamente elevada pela dobutamina no grupo *Dobut* ($P < 0,05$), a co-infusão de rhMMP-2 e dobutamina prejudicou significativamente este aumento na dP/dt_{\max} VE induzido pela dobutamina ($P < 0,05$). Adicionalmente, o pré-tratamento com doxiciclina impediu este efeito da rhMMP-2 frente a estimulação β -adrenérgica ($P < 0,05$).

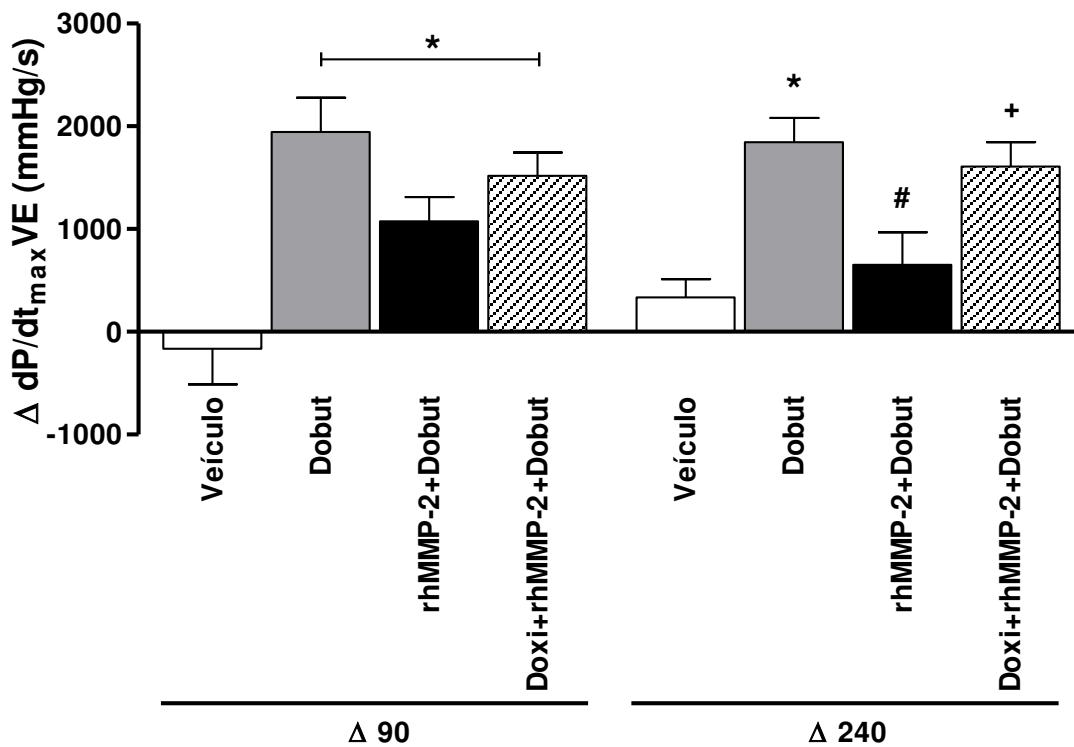


Figura 18: Avaliação do delta da velocidade máxima de elevação da pressão ventricular esquerda durante a sístole ($\Delta dP/dt_{max} VE$) entre os momentos 90 e basal ($\Delta 90$) e entre os momentos final e basal ($\Delta 240$) nos grupos Veículo ($n=4$), Dobut ($n=4$), rhMMP-2+Dobut ($n=7$) e Doxi+rhMMP-2+Dobut ($n=6$), após a administração de doxiciclina (10 mg.kg^{-1}), rhMMP-2 ($220 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) e dobutamina ($5 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$). Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. Grupos Veículo vs Dobut, rhMMP-2+Dobut e Doxi+rhMMP-2+Dobut (* $P < 0,05$); Dobut vs rhMMP-2+Dobut (# $P < 0,05$); rhMMP-2+Dobut vs Doxi+rhMMP-2+Dobut (+ $P < 0,05$).

5.4- Avaliação da MMP-2 plasmática

Os géis de zimografia do plasma de carneiros revelaram bandas correspondentes à MMP-2 de 72 kDa (Figura 19A). Como observado na figura 19B, não foi possível detectar mudanças significativas nos níveis plasmáticos de MMP-2 entre os grupos com a infusão de rhMMP-2.

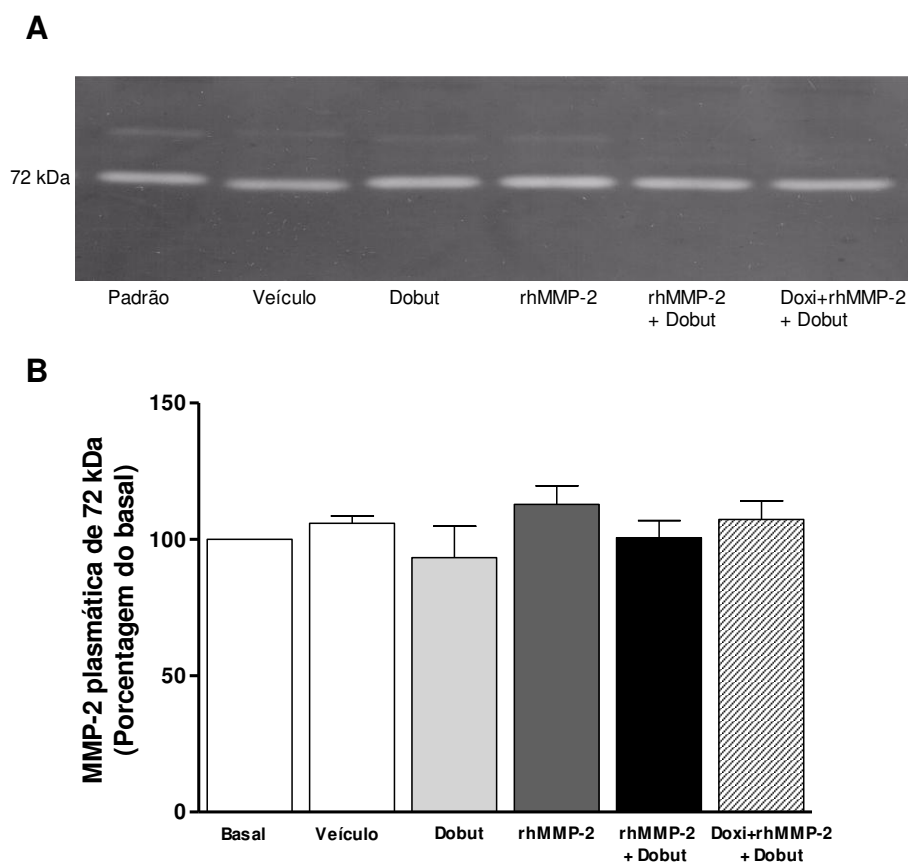


Figura 19: (A) Zimograma representativo de amostras do plasma coletado no momento 240 mostrando a banda de MMP-2 de 72 kDa. Soro Fetal Bovino foi utilizado como padrão. (B) Quantificação dos níveis plasmáticos da MMP-2 de 72 kDa em carneiros que receberam salina (Grupo Veículo; n=4), dobutamina ($5\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) intravenosa (Grupo Dobut.; n=4), rhMMP-2 ($220\text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) intravenosa (Grupo rhMMP-2; n=5), rhMMP-2 ($220\text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) seguida por dobutamina ($5\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) intravenosa (Grupo rhMMP-2 + Dobut.; n=7) e em carneiros pré-tratados com doxiciclina ($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e que receberam as mesmas doses acima de rhMMP2 e dobutamina (Grupo Doxi + rhMMP-2 + Dobut.; n=6). Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M.

5.5. Avaliação da MMP-2 no tecido cardíaco

Da mesma forma, os géis de zimografia de amostras do ventrículo esquerdo revelaram bandas correspondentes à MMP-2 de 72 kDa (Figura 20A). Como observado na quantificação (Figura 20B), não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quanto às concentrações de MMP-2 no coração.

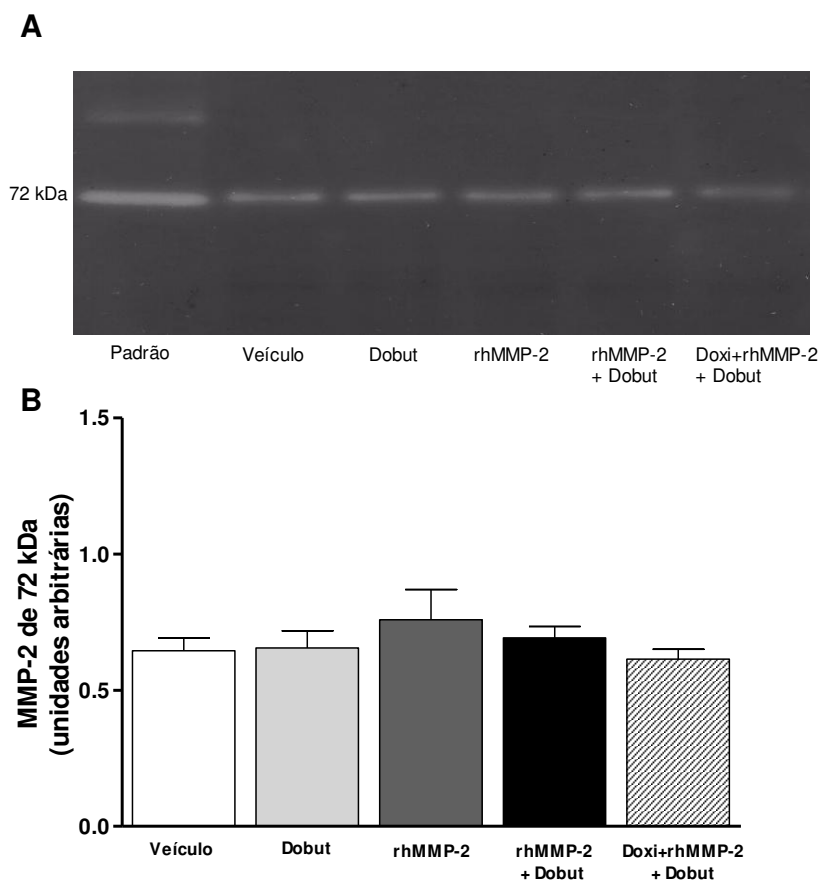


Figura 20: (A) Zimograma representativo de amostras do ventrículo esquerdo evidenciando a banda de MMP-2 de 72 kDa. Soro Fetal Bovino foi utilizado como padrão. (B) Quantificação das concentrações plasmáticas da MMP-2 de 72 kDa em carneiros que receberam salina (Grupo Veículo; n=4), dobutamina ($5\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) intravenosa (Grupo Dobut.; n=4), rhMMP-2 ($220\text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) intravenosa (Grupo rhMMP-2; n=5), rhMMP-2 ($220\text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) seguida por dobutamina ($5\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) intravenosa (Grupo rhMMP-2 + Dobut.; n=7) e em carneiros pré-tratados com doxiciclina ($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e que receberam as mesmas doses acima de rhMMP2 e dobutamina (Grupo Doxi + rhMMP-2 + Dobut.; n=6). Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M.

5.6. Avaliação da atividade gelatinolítica no coração

Verificou-se que a infusão intravenosa de rhMMP-2 aumentou significativamente a atividade gelatinolítica no coração dos animais pertencentes aos grupos *rhMMP-2* e *rhMMP-2+Dobut* ($P < 0,05$). Além disso, observou-se que o pré-tratamento com doxiciclina impediu, pelo menos em parte, estes aumentos na atividade gelatinolítica induzidos pela administração de rhMMP-2 ($P < 0,001$; Figura 21A). A figura 21B mostra que a fenantrolina inibiu aproximadamente 50% da atividade gelatinolítica encontrada no coração, indicando que aproximadamente metade desta atividade gelatinolítica corresponde à atividade de MMPs no coração.

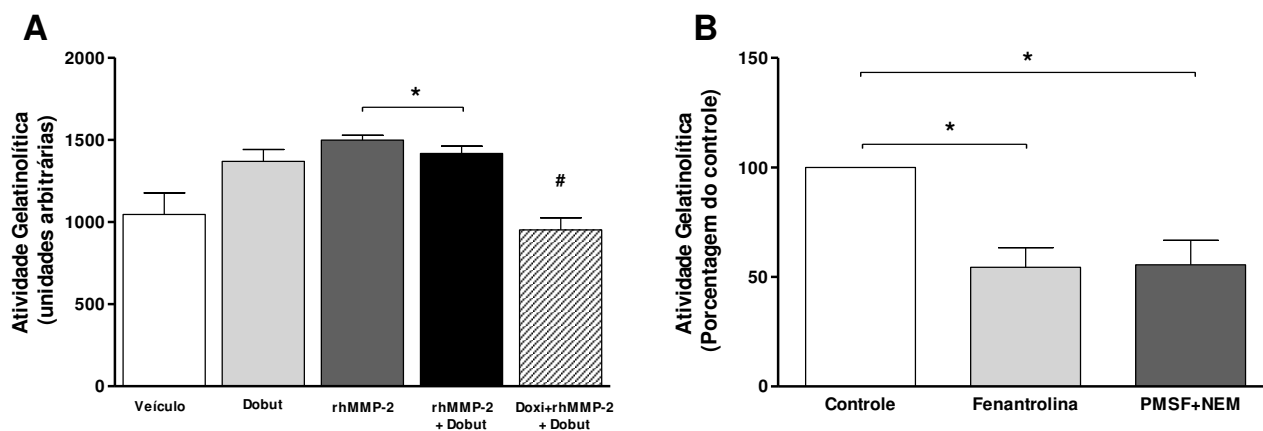


Figura 21: (A) Atividade gelatinolítica avaliada por espectrofluorimetria no ventrículo esquerdo de carneiros que receberam salina (Grupo Veículo; $n=4$), dobutamina ($5\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) intravenosa (Grupo Dobut.; $n=4$), rhMMP-2 ($220\text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) intravenosa (Grupo rhMMP-2; $n=5$), rhMMP-2 ($220\text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) seguida por dobutamina ($5\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) intravenosa (Grupo rhMMP-2 + Dobut.; $n=7$) e em carneiros pré-tratados com doxiciclina ($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e que receberam as mesmas doses acima de rhMMP2 e dobutamina (Grupo Doxi + rhMMP-2 + Dobut.; $n=6$). (B) Inibição da atividade gelatinolítica com fenantrolina $100\text{ }\mu\text{M}$ e com phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) $100\text{ }\mu\text{M}$ + N-ethylmaleimide (NEM) $100\text{ }\mu\text{M}$. Controle = grupo veículo. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ vs Veículo/Controle. Grupos Doxi+rhMMP-2+Dobuta vs rhMMP-2 e rhMMP-2+Dobutamina ($\# P < 0,05$).

5.7. Concentração de AMP cíclico em cardiomiócitos

A figura 22A mostra que a estimulação dos cardiomiócitos com dobutamina apenas nas concentrações de 10 e 100 μM foi capaz de elevar significativamente os níveis intracelulares de AMP cíclico ($P < 0,05$). A figura 22B mostra que no experimento seguinte, da mesma forma, a dobutamina na concentração de 10 μM produziu um aumento significativo nas concentrações de AMP cíclico nos cardiomiócitos e o tratamento das células com rhMMP-2 nas concentrações de 12, 40 e 120 nM prejudicou significativamente e de maneira concentração-dependente estes aumentos nos níveis de AMP cíclico produzidos pela dobutamina ($P < 0,05$).

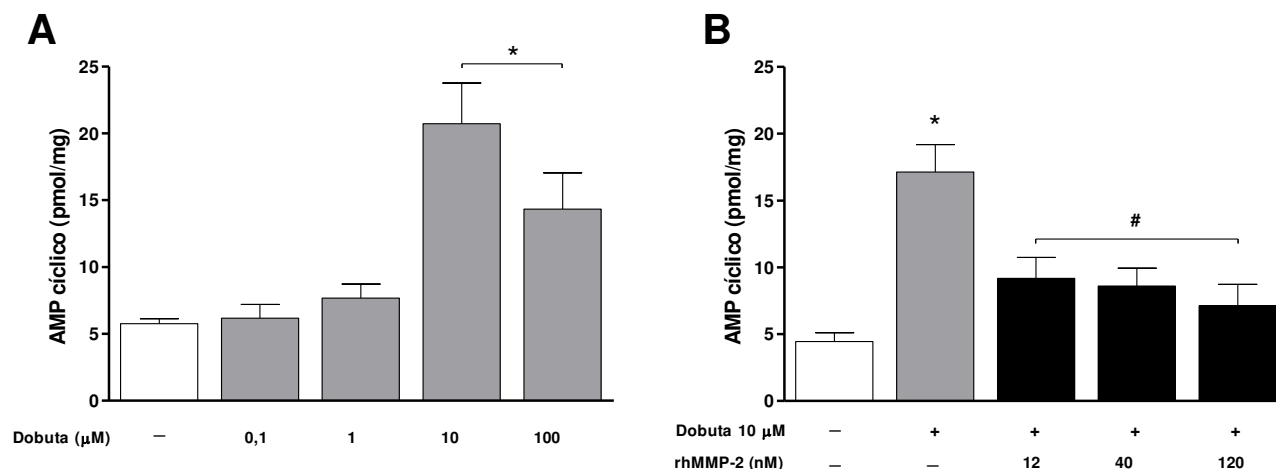


Figura 22: (A) Concentrações de AMP cíclico em cultura de cardiomiócitos estimulados com diferentes concentrações de dobutamina e (B) tratados com diferentes concentrações de rhMMP-2 (12, 40 e 120 nM) na presença do estímulo de 10 μM de dobutamina. $N = 8/\text{grupo}$. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ vs Controle. # $P < 0,05$ vs Dobuta 10 μM .

Adicionalmente e de modo semelhante aos experimentos anteriores, observou-se que a dobutamina na concentração de 10 μM elevou significativamente os níveis de AMP cíclico nos cardiomiócitos ($P < 0,001$), e que o tratamento com rhMMP-2 nas concentrações de 40 e 120 nM prejudicou de forma significativa estes aumentos produzidos pela dobutamina ($P < 0,05$). Além disso, verificou-se que o pré-tratamento das células com os inibidores de MMPs doxíciclina (10 μM) e ONO-4817 (10 μM) foi capaz de impedir significativamente os efeitos da rhMMP-2 ($P < 0,05$) (Figura 23).

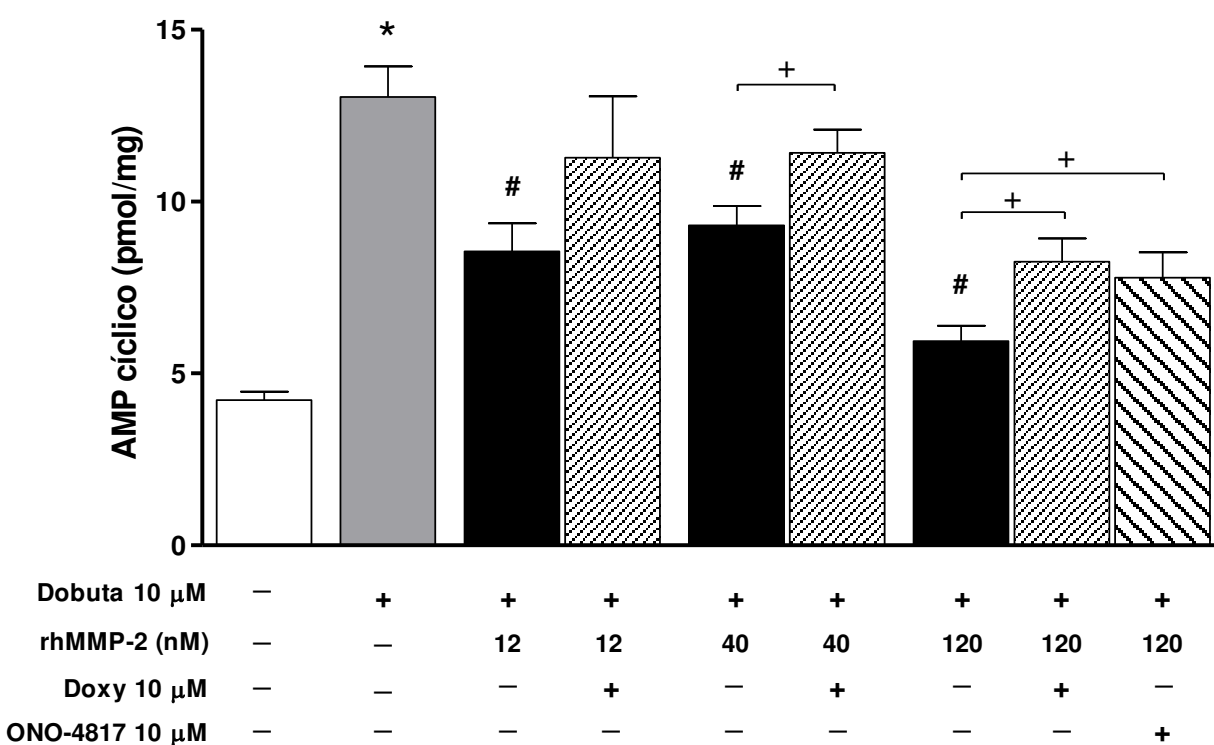


Figura 23: Concentrações de AMP cíclico em cultura de cardiomiócitos pré-tratados com doxíciclina (10 μM) ou ONO-4817 (10 μM) e tratados com diferentes concentrações de rhMMP-2 (12, 40 e 120 nM) na presença do estímulo de 10 μM de dobutamina. N = 8/grupo. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. * $P < 0,0001$ vs Controle. # $P < 0,05$ vs Dobuta 10 μM . + $P < 0,05$ vs tratamentos.

6 – DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho a mostrar os efeitos hemodinâmicos agudos da infusão de rhMMP-2. Foi demonstrado pela primeira vez que a rhMMP-2, administrada agudamente, prejudica a resposta cardiovascular induzida pela ativação de receptores β -adrenérgicos e que estes efeitos foram prevenidos, pelo menos em parte, pelo pré-tratamento com o inibidor de MMPs doxiciclina. Além disso, este estudo também mostrou pela primeira vez que a infusão aguda de rhMMP-2, em condições basais, não exerce efeitos hemodinâmicos significativos em animais sem evidência de qualquer condição de doença.

Embora as MMPs sejam conhecidas por suas ações na matriz extracelular, diversos trabalhos têm apontado um número crescente de novos substratos para estas proteases, em especial para a MMP-2 (Mccawley e Matrisian, 2001; Chow, Cena e Schulz, 2007; Schulz, 2007; Kandasamy, Chow *et al.*, 2010). Estudos prévios sugerem que a MMP-2 pode afetar o tônus vascular por modular as concentrações de peptídeos vasoativos devido sua ação proteolítica sobre as endotelinas (Fernandez-Patron, Radomski *et al.*, 1999), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (Fernandez-Patron, Stewart *et al.*, 2000) e sobre a adrenomedulina (Martinez, Oh *et al.*, 2004). Entretanto, diferentemente destas evidências, os resultados encontrados no primeiro protocolo deste estudo (no qual foi mostrado que a rhMMP-2 não exerceu nenhum efeito hemodinâmico significativo em condições basais) sugerem que a MMP-2 não afeta significativamente as concentrações destes peptídeos vasoativos *in vivo*. Embora não tenham sido avaliadas as concentrações teciduais ou plasmáticas desses peptídeos, acreditamos que, ou a MMP-2 não é capaz de afetar seus níveis *in vivo* ou as alterações em suas concentrações induzidas pela administração aguda de rhMMP-2 não são hemodinamicamente relevantes, pelo menos em animais aparentemente saudáveis. Esta hipótese, porém, pode não ser válida em modelos experimentais de doença.

Por outro lado, sabe-se que as MMPs, particularmente a MMP-2, estão envolvidas na clivagem proteolítica de adrenoreceptores incluindo os receptores β_2 -adrenérgicos (Hakalahti, Vierimaa *et al.*, 2010; Rodrigues, Tran *et al.*, 2010; Wu

e Schmid-Schonbein, 2011; Rietz e Spiers, 2012). O resultado observado em nosso estudo de que a infusão de rhMMP-2 prejudicou significativamente a queda do índice de resistência vascular sistêmico (IRVS) induzida pela dobutamina é consistente com um comprometimento na vasodilatação mediada pelos receptores β_2 -adrenérgicos, possivelmente resultante de um aumento na atividade da MMP-2. Corroborando esta hipótese está o fato de que a inibição de MMPs com doxiciclina preveniu esta alteração no IRVS induzida pela rhMMP-2. Ainda de acordo com esta sugestão, *Wu e colaboradores* mostraram que a atividade aumentada da MMPs pode ser responsável pela clivagem da porção N-terminal de receptores β_2 -adrenérgicos em vasos do rim (Wu e Schmid-Schonbein, 2011). Adicionalmente, *Rodrigues e colaboradores* verificaram que, além da clivagem dos β_2 -adrenoreceptores, as MMPs podem contribuir para a elevação do tônus arteriolar em ratos e que o uso do inibidor de MMPs doxiciclina impediu a clivagem destes receptores possivelmente mediada pelas MMPs (Rodrigues, Tran *et al.*, 2010). Enquanto nenhum trabalho examinou as conseqüências hemodinâmicas deste efeito da MMP-2 nos vasos, nossos resultados sugerem que esta protease pode afetar o tônus vascular por prejudicar a resposta induzida pela ativação dos receptores β_2 -adrenérgicos, possivelmente por estar envolvida na clivagem destes receptores. Por outro lado, não se pode descartar a hipótese de que esta elevação no IRVS resultante da co-infusão de rhMMP-2 e dobutamina seja decorrente de quedas significativas no índice cardíaco (IC) observadas no grupo *rhMMP-2+Dobut* e que coincidem com os momentos de aumento do IRVS encontrados no mesmo grupo. Ainda assim, outros estudos devem ser realizados a fim de examinar as conseqüências de aumentos crônicos nos níveis ou atividade da MMP-2 nos vasos sanguíneos e os mecanismos pelos quais estes aumentos podem estar associados a uma menor responsividade aos receptores β_2 -adrenérgicos.

Com relação aos efeitos cardíacos, nossos resultados mostraram que a rhMMP-2 prejudicou os aumentos no índice cardíaco (IC) e na contratilidade cardíaca (avaliada pela dP/dt_{max}) induzidos pela dobutamina. De forma

complementar, também foi demonstrado que a inibição de MMPs com doxiciclina foi capaz de impedir estes efeitos da rhMMP-2 na função cardíaca. Estes resultados que mostraram a MMP-2 prejudicando a resposta cardíaca frente à estimulação β -adrenérgica são consistentes com a sugestão de que a MMP-2 pode contribuir de forma significativa para a disfunção contrátil do coração. Confirmando esta sugestão, foi observado que a superexpressão de MMP-2 em camundongos transgênicos na ausência de qualquer condição de doença é capaz de prejudicar a força contrátil do coração (Bergman, Teerlink *et al.*, 2007). Além disso, de acordo com o trabalho anterior, Wang e colaboradores mostraram um comprometimento da função mecânica cardíaca em camundongos transgênicos com a superexpressão de MMP-2 (Wang, Bergman *et al.*, 2006). Adicionalmente e ainda de acordo com estas sugestões, foi demonstrado que animais “knockouts” para MMP-2 apresentaram uma redução significativa da hipertrofia e disfunção ventricular induzidas pela sobrecarga de pressão, indicando que a MMP-2 pode estar envolvida nestas alterações cardíacas e de que a inibição de MMPs pode ser uma possível estratégia terapêutica em doenças relacionadas ao sistema cardiovascular (Matsusaka, Ide *et al.*, 2006).

Um aumento significativo na expressão e/ou atividade da MMP-2 tem sido descrito em diversos modelos experimentais de doenças cardiovasculares (Chen, Tung *et al.*, 2005; Castro, Rizzi *et al.*, 2008; Martinez, Rizzi *et al.*, 2008; Rizzi, Castro *et al.*, 2011; Ceron, Rizzi *et al.*, 2012; Martins-Oliveira, Castro *et al.*, 2012) e também em pacientes, incluindo aqueles com insuficiência cardíaca (Altieri, Brunelli *et al.*, 2003; Boixel, Fontaine *et al.*, 2003; Yamazaki, Lee *et al.*, 2004; Yasmin, Mceniery *et al.*, 2005; Chung, Yang *et al.*, 2009; Palei, Sandrim *et al.*, 2012). Embora não haja informações claras quanto à origem da MMP-2 avaliada em amostras de plasma, uma vez que as MMPs circulantes podem derivar de diferentes tipos celulares em variadas condições de doença (Fontana, Silva *et al.*, 2012), nossos resultados são consistentes com a idéia de que a MMP-2 circulante pode desempenhar um importante papel no sistema cardiovascular por afetar a resposta aos receptores β -adrenérgicos.

Interessantemente, nós encontramos que a infusão de rhMMP-2 aumentou de forma significativa a atividade das MMPs no ventrículo esquerdo dos animais. A atividade de MMPs aumentada no coração também foi descrita em alguns estudos que utilizaram um modelo experimental agudo de isquemia e reperfusão (Schulze, Wang *et al.*, 2003; Chow, Cena, El-Yazbi *et al.*, 2007; Fert-Bober, Leon *et al.*, 2008; Chow, Daniel *et al.*, 2010) e em trabalhos realizados em um modelo crônico de hipertensão renovascular (Rizzi, Castro *et al.*, 2010; Rizzi, Castro *et al.*, 2011). Entretanto, estes aumentos na atividade das MMPs no coração não foram acompanhados por elevações nos níveis de MMP-2 tanto plasmáticos quanto cardíacos avaliados por zimografia. Surpreendentemente, a infusão intravenosa de rhMMP-2 não foi capaz de produzir aumentos detectáveis nas concentrações plasmáticas de MMP-2. Embora nós não tenhamos uma explicação precisa para estes achados, aumentos na atividade da MMP-2 no coração têm sido encontrados em associação com uma depleção e menores concentrações de MMP-2 cardíaca em um modelo experimental de isquemia e reperfusão (Cheung, Sawicki *et al.*, 2000). Adicionalmente, sabe-se que aumentos na atividade das MMPs em miócitos cardíacos também podem ser decorrentes da perda de TIMP-4 (inibidor endógeno de MMPs abundante no tecido cardíaco), sem necessariamente ocorrer alterações nas concentrações de MMP-2 (Schulze, Wang *et al.*, 2003). Além disso, é possível que a rhMMP-2 administrada, uma vez presente na corrente sanguínea, possa sofrer uma importante distribuição pelos diversos tecidos corpóreos, reduzindo assim de forma significativa sua concentração no plasma. Também é possível que 3 horas após o término da infusão de rhMMP-2, momento em que ocorre a retirada do sangue e dos tecidos dos animais para as análises posteriores, a enzima administrada possa ter sofrido uma extensiva ação de proteases e assim ter seus níveis plasmáticos e cardíacos consideravelmente reduzidos no momento da análise bioquímica. Por outro lado, não se pode descartar a hipótese de que a rhMMP-2, logo após sua infusão, possa se complexar com inibidores de proteases circulantes como por exemplo a α 2-macroglobulina, principal inibidor da atividade das MMPs no plasma (Sottrup-Jensen e Birkedal-Hansen, 1989). Entretanto, considerando que muito pouco se

conhece sobre a cinética *in vivo* da MMP-2, muitos outros estudos ainda são necessários para melhor explicar os resultados encontrados.

Juntos, estes resultados indicam que a MMP-2 com atividade elevada no coração pode diretamente prejudicar a função cardíaca. De forma complementar a estes resultados hemodinâmicos que mostraram um comprometimento da resposta cardíaca à dobutamina em animais que receberam rhMMP-2 e que estes efeitos da rhMMP-2 foram impedidos pela doxiciclina; foi demonstrado que cardiomiócitos estimulados com dobutamina e submetidos ao tratamento com rhMMP-2 apresentaram uma redução significativa na resposta frente a estimulação β -adrenérgica, demonstrada por uma redução significativa nos aumentos nas concentrações intracelulares de AMP cíclico induzidos pela dobutamina. Adicionalmente, foi verificado que os inibidores de MMPs doxiciclina e ONO-4817 foram capazes de impedir significativamente estas alterações produzidas pela rhMMP-2.

Dessa forma, todos estes achados que mostram as alterações cardíacas produzidas pela rhMMP-2 claramente sugerem que a MMP-2 pode afetar a responsividade dos receptores β_1 -adrenérgicos, estando de acordo com estudos anteriores com os de Wang e colaboradores. Foi demonstrado pelos autores que a superexpressão de MMP-2 em camundongos transgênicos produziu uma significativa redução na resposta cardíaca frente à estimulação inotrópica com isoproterenol (Wang, Bergman *et al.*, 2006). Embora nós não tenhamos determinado os mecanismos moleculares pelos quais ocorre esta redução na responsividade dos receptores β_1 -adrenérgicos, é possível sugerir, a partir dos nossos resultados *in vivo* e *in vitro*, que a MMP-2 pode estar envolvida numa possível clivagem de receptores β_1 -adrenérgicos. Esta hipótese é consistente com um estudo recente mostrando que o GM6001 (um inibidor inespecífico de MMPs) impediu a clivagem da região N-terminal dos receptores β_1 -adrenérgicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Hakalahti, Vierimaa *et al.*, 2010).

Portanto, estes resultados indicam que a MMP-2 pode afetar diretamente a resposta induzida pela ativação de receptores β_1 -adrenérgicos, podendo prejudicar a função contrátil do coração. De forma semelhante a que ocorre em outros receptores celulares incluindo os β_2 -adrenoreceptores, podemos sugerir que a MMP-2 pode estar envolvida numa possível clivagem de receptores β_1 -adrenérgicos.

Por fim, algumas limitações deste trabalho devem ser consideradas. Visto que os efeitos cardíacos da infusão de rhMMP-2 foram mais pronunciados nos momentos finais, seria interessante estender o monitoramento hemodinâmico por um período de tempo maior. Adicionalmente, embora a doxiciclina tenha sido utilizada como inibidor de MMPs em nosso estudo, essa é um inibidor não seletivo e, portanto, pode inibir outras MMPs que não a MMP-2. Além disso, sabe-se que a doxiciclina possui outras ações não relacionadas à inibição de MMPs uma vez que é uma droga com reconhecida propriedade antibiótica e que recentemente têm mostrado ações antioxidantes (Castro, Rizzi *et al.*, 2012). Dessa forma, seria interessante testar inibidores mais seletivos para a MMP-2. Entretanto, apesar destas limitações, a doxiciclina é uma droga segura, aprovada para uso e que tem sido utilizada por décadas na clínica médica. Finalmente, nós examinamos os efeitos do doxiciclina como um pré-tratamento, administrada anteriormente a qualquer alteração produzida. Porém, do ponto de vista clínico, seria interessante avaliar os potenciais efeitos terapêuticos deste inibidor de MMPs durante um tratamento, no qual a doxiciclina seja administrada após a ocorrência e instalação da alteração ou doença estudada.

7 – CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados mostraram pela primeira vez que a infusão de rhMMP-2, sob condições basais, não exerce efeitos hemodinâmicos em carneiros. Entretanto, a rhMMP-2 prejudica a resposta induzida pela ativação de receptores β -adrenérgicos, possivelmente comprometendo a vasodilatação e a função contrátil do coração mediada por estes receptores. Os resultados sugerem que uma possível clivagem proteolítica de receptores β_1 -adrenérgicos possa ocorrer e ser mediada por MMPs. Adicionalmente, inibidores de MMPs como a doxiciclina podem atenuar a disfunção cardiovascular associada à atividade elevada de MMPs.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali, M. A., W. J. Cho, *et al.* Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. Circulation, v.122, n.20, Nov 16, p.2039-47. 2010.

Ali, M. A., X. Fan, *et al.* Cardiac sarcomeric proteins: novel intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in heart disease. Trends Cardiovasc Med, v.21, n.4, May, p.112-8. 2011.

Altieri, P., C. Brunelli, *et al.* Metalloproteinases 2 and 9 are increased in plasma of patients with heart failure. Eur J Clin Invest, v.33, n.8, Aug, p.648-56. 2003.

Bergman, M. R., J. R. Teerlink, *et al.* Cardiac matrix metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic dysfunction. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.292, n.4, Apr, p.H1847-60. 2007.

Boixel, C., V. Fontaine, *et al.* Fibrosis of the left atria during progression of heart failure is associated with increased matrix metalloproteinases in the rat. J Am Coll Cardiol, v.42, n.2, Jul 16, p.336-44. 2003.

Brew, K., D. Dinakarpanian, *et al.* Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. Biochim Biophys Acta, v.1477, n.1-2, Mar 7, p.267-83. 2000.

Castro, M. M., A. D. Kandasamy, *et al.* Matrix metalloproteinase inhibitor properties of tetracyclines: therapeutic potential in cardiovascular diseases. Pharmacol Res, v.64, n.6, Dec, p.551-60. 2011.

Castro, M. M., E. Rizzi, *et al.* Doxycycline ameliorates 2K-1C hypertension-induced vascular dysfunction in rats by attenuating oxidative stress and improving nitric oxide bioavailability. Nitric Oxide, v.26, n.3, Mar 31, p.162-8. 2012.

_____. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. Atherosclerosis, v.198, n.2, Jun, p.320-31. 2008.

_____. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. Free Radic Biol Med, v.46, n.9, May 1, p.1298-307. 2009.

Ceron, C. S., M. M. Castro, *et al.* Spironolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and expression in a model of renovascular hypertension. Br J Pharmacol, v.160, n.1, May, p.77-87. 2010.

Ceron, C. S., E. Rizzi, *et al.* Time course involvement of matrix metalloproteinases in the vascular alterations of renovascular hypertension. Matrix Biol, v.31, n.4, May, p.261-70. 2012.

Chen, J., C. H. Tung, *et al.* Near-infrared fluorescent imaging of matrix metalloproteinase activity after myocardial infarction. Circulation, v.111, n.14, Apr 12, p.1800-5. 2005.

Cheung, P. Y., G. Sawicki, *et al.* Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. Circulation, v.101, n.15, Apr 18, p.1833-9. 2000.

Chow, A. K., J. Cena, *et al.* Caveolin-1 inhibits matrix metalloproteinase-2 activity in the heart. J Mol Cell Cardiol, v.42, n.4, Apr, p.896-901. 2007.

_____. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. Br J Pharmacol, v.152, n.2, Sep, p.189-205. 2007.

Chow, A. K., E. E. Daniel, *et al.* Cardiac function is not significantly diminished in hearts isolated from young caveolin-1 knockout mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.299, n.4, Oct, p.H1183-9. 2010.

Chung, A. W., H. H. Yang, *et al.* Matrix metalloproteinase-2 and -9 exacerbate arterial stiffening and angiogenesis in diabetes and chronic kidney disease. Cardiovasc Res, v.84, n.3, Dec 1, p.494-504. 2009.

Creemers, E. E., J. P. Cleutjens, *et al.* Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? Circ Res, v.89, n.3, Aug 3, p.201-10. 2001.

Delano, F. A. e G. W. Schmid-Schonbein. Proteinase activity and receptor cleavage: mechanism for insulin resistance in the spontaneously hypertensive rat. Hypertension, v.52, n.2, Aug, p.415-23. 2008.

Deryugina, E. I. e J. P. Quigley. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. Cancer Metastasis Rev, v.25, n.1, Mar, p.9-34. 2006.

Dollery, C. M., J. R. Mcewan, *et al.* Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. Circ Res, v.77, n.5, Nov, p.863-8. 1995.

Fernandez-Patron, C., M. W. Radomski, *et al.* Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. Circ Res, v.85, n.10, Nov 12, p.906-11. 1999.

Fernandez-Patron, C., K. G. Stewart, *et al.* Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. Circ Res, v.87, n.8, Oct 13, p.670-6. 2000.

Fert-Bober, J., H. Leon, *et al.* Inhibiting matrix metalloproteinase-2 reduces protein release into coronary effluent from isolated rat hearts during ischemia-reperfusion. Basic Res Cardiol, v.103, n.5, Sep, p.431-43. 2008.

- Fontana, V., P. S. Silva, *et al.* Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension. Clin Chim Acta, v.413, n.7-8, Apr 11, p.656-62. 2012.
- Fortuna, G. M., L. Figueiredo-Lopes, *et al.* A role for matrix metalloproteinase-9 in the hemodynamic changes following acute pulmonary embolism. Int J Cardiol, v.114, n.1, Jan 2, p.22-7. 2007.
- Gao, C. Q., G. Sawicki, *et al.* Matrix metalloproteinase-2 mediates cytokine-induced myocardial contractile dysfunction. Cardiovasc Res, v.57, n.2, Feb, p.426-33. 2003.
- Goncalves, A. N., C. A. Meschiari, *et al.* Expression of soluble and functional full-length human matrix metalloproteinase-2 in Escherichia coli. J Biotechnol, v.157, n.1, Jan, p.20-4. 2012.
- Griffin, M. O., G. Ceballos, *et al.* Tetracycline compounds with non-antimicrobial organ protective properties: possible mechanisms of action. Pharmacol Res, v.63, n.2, Feb, p.102-7. 2011.
- Gross, J. e C. M. Lapiere. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. Proc Natl Acad Sci U S A, v.48, Jun 15, p.1014-22. 1962.
- Guimaraes, D. A., E. Rizzi, *et al.* Doxycycline dose-dependently inhibits MMP-2-mediated vascular changes in 2K1C hypertension. Basic Clin Pharmacol Toxicol, v.108, n.5, May, p.318-25. 2010.
- Hakalahti, A. E., M. M. Vierimaa, *et al.* Human beta1-adrenergic receptor is subject to constitutive and regulated N-terminal cleavage. J Biol Chem, v.285, n.37, Sep 10, p.28850-61. 2010.
- Kandasamy, A. D., A. K. Chow, *et al.* Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. Cardiovasc Res, v.85, n.3, Feb 1, p.413-23. 2010.
- Kim, N. N., F. J. Villarreal, *et al.* Trophic effects of angiotensin II on neonatal rat cardiac myocytes are mediated by cardiac fibroblasts. Am J Physiol, v.269, n.3 Pt 1, Sep, p.E426-37. 1995.
- Marson, B. P., C. E. Poli De Figueiredo, *et al.* Imbalanced matrix metalloproteinases in cardiovascular complications of end-stage kidney disease: a potential pharmacological target. Basic Clin Pharmacol Toxicol, v.110, n.5, May, p.409-15. 2012.
- Martinez, A., H. R. Oh, *et al.* Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. Biochem J, v.383, n.Pt. 3, Nov 1, p.413-8. 2004.

Martinez, M. L., E. Rizzi, *et al.* Lercanidipine decreases vascular matrix metalloproteinase-2 activity and protects against vascular dysfunction in diabetic rats. Eur J Pharmacol, v.599, n.1-3, Dec 3, p.110-6. 2008.

Martins-Oliveira, A., M. M. Castro, *et al.* Contrasting effects of aliskiren versus losartan on hypertensive vascular remodeling. Int J Cardiol, Apr 5. 2012.

Matsusaka, H., T. Ide, *et al.* Targeted deletion of matrix metalloproteinase 2 ameliorates myocardial remodeling in mice with chronic pressure overload. Hypertension, v.47, n.4, p.711-7. 2006.

Mccawley, L. J. e L. M. Matrisian. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! Curr Opin Cell Biol, v.13, n.5, Oct, p.534-40. 2001.

Mohammed, F. F., D. S. Smookler, *et al.* Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis, v.62 Suppl 2, Nov, p.ii43-7. 2003.

Muhl, D., B. Nagy, *et al.* Dynamic changes of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in severe sepsis. J Crit Care, v.26, n.6, Dec, p.550-5. 2011.

Murphy, G. e H. Nagase. Progress in matrix metalloproteinase research. Mol Aspects Med, v.29, n.5, Oct, p.290-308. 2008.

Nagase, H., R. Visse, *et al.* Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc Res, v.69, n.3, Feb 15, p.562-73. 2006.

Neto-Neves, E. M., C. A. Dias-Junior, *et al.* Metalloproteinase inhibition protects against cardiomyocyte injury during experimental acute pulmonary thromboembolism. Crit Care Med, v.39, n.2, Feb, p.349-56. 2011.

Okamoto, T., T. Akaike, *et al.* Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. J Biol Chem, v.276, n.31, Aug 3, p.29596-602. 2001.

Palei, A. C., V. C. Sandrim, *et al.* Association between matrix metalloproteinase (MMP)-2 polymorphisms and MMP-2 levels in hypertensive disorders of pregnancy. Exp Mol Pathol, v.92, n.2, Apr, p.217-21. 2012.

Peterson, J. T. Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery. Heart Fail Rev, v.9, n.1, Jan, p.63-79. 2004.

Peterson, J. T., H. Li, *et al.* Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat. Cardiovasc Res, v.46, n.2, May, p.307-15. 2000.

- Rietz, A. e J. Spiers. The relationship between the MMP system, adrenoceptors and phosphoprotein phosphatases. Br J Pharmacol, v.166, n.4, Jun, p.1225-43. 2012.
- Rizzi, E., M. M. Castro, *et al.* Tempol inhibits TGF-beta and MMPs upregulation and prevents cardiac hypertensive changes. Int J Cardiol, Sep 12. 2011.
- _____. Matrix metalloproteinase inhibition improves cardiac dysfunction and remodeling in 2-kidney, 1-clip hypertension. J Card Fail, v.16, n.7, Jul, p.599-608. 2010.
- Rodrigues, S. F., E. D. Tran, *et al.* Matrix metalloproteinases cleave the beta2-adrenergic receptor in spontaneously hypertensive rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.299, n.1, Jul, p.H25-35. 2010.
- Rouet-Benzineb, P., J. M. Buhler, *et al.* Altered balance between matrix gelatinases (MMP-2 and MMP-9) and their tissue inhibitors in human dilated cardiomyopathy: potential role of MMP-9 in myosin-heavy chain degradation. Eur J Heart Fail, v.1, n.4, Dec, p.337-52. 1999.
- Roy, R., B. Zhang, *et al.* Making the cut: protease-mediated regulation of angiogenesis. Exp Cell Res, v.312, n.5, Mar 10, p.608-22. 2006.
- Sawicki, G., H. Leon, *et al.* Degradation of myosin light chain in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion injury: a new intracellular target for matrix metalloproteinase-2. Circulation, v.112, n.4, Jul 26, p.544-52. 2005.
- Schulz, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.47, p.211-42. 2007.
- Schulze, C. J., W. Wang, *et al.* Imbalance between tissue inhibitor of metalloproteinase-4 and matrix metalloproteinases during acute myocardial [correction of myoctardial] ischemia-reperfusion injury. Circulation, v.107, n.19, May 20, p.2487-92. 2003.
- Singh, R. D., N. Haridas, *et al.* Matrix metalloproteinases and their inhibitors: correlation with invasion and metastasis in oral cancer. Indian J Clin Biochem, v.25, n.3, Jul, p.250-9.
- Siwik, D. A., D. L. Chang, *et al.* Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. Circ Res, v.86, n.12, Jun 23, p.1259-65. 2000.
- Sottrup-Jensen, L. e H. Birkedal-Hansen. Human fibroblast collagenase-alpha-macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian alpha-macroglobulins. J Biol Chem, v.264, n.1, Jan 5, p.393-401. 1989.

Spinale, F. G., M. L. Coker, *et al.* Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. Cardiovasc Res, v.46, n.2, May, p.225-38. 2000.

Sung, M. M., C. G. Schulz, *et al.* Matrix metalloproteinase-2 degrades the cytoskeletal protein alpha-actinin in peroxynitrite mediated myocardial injury. J Mol Cell Cardiol, v.43, n.4, Oct, p.429-36. 2007.

Tran, E. D., F. A. Delano, *et al.* Enhanced matrix metalloproteinase activity in the spontaneously hypertensive rat: VEGFR-2 cleavage, endothelial apoptosis, and capillary rarefaction. J Vasc Res, v.47, n.5, p.423-31. 2010.

Vu, T. H. e Z. Werb. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. Genes Dev, v.14, n.17, Sep 1, p.2123-33. 2000.

Wang, G. Y., M. R. Bergman, *et al.* Cardiac transgenic matrix metalloproteinase-2 expression directly induces impaired contractility. Cardiovasc Res, v.69, n.3, Feb 15, p.688-96. 2006.

Wang, W., C. J. Schulze, *et al.* Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. Circulation, v.106, n.12, Sep 17, p.1543-9. 2002.

Westphal, M., S. Rehberg, *et al.* Cardiopulmonary effects of low-dose arginine vasopressin in ovine acute lung injury. Crit Care Med, v.39, n.2, Feb, p.357-63. 2011.

Wu, K. I. e G. W. Schmid-Schonbein. Nuclear factor kappa B and matrix metalloproteinase induced receptor cleavage in the spontaneously hypertensive rat. Hypertension, v.57, n.2, Feb, p.261-8. 2011.

Yamazaki, T., J. D. Lee, *et al.* Circulating matrix metalloproteinase-2 is elevated in patients with congestive heart failure. Eur J Heart Fail, v.6, n.1, Jan, p.41-5. 2004.

Yasmin, C. M. Mceniery, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.25, n.2, Feb, p.372. 2005.

Yerebakan, C., C. Klopsch, *et al.* Acute and chronic response of the right ventricle to surgically induced pressure and volume overload--an analysis of pressure-volume relations. Interact Cardiovasc Thorac Surg, v.10, n.4, Apr, p.519-25. 2010.

9 - ANEXO

Recombinant Human Matrix Metalloproteinase-2 Impairs Cardiovascular β -Adrenergic Responses

Karina C. Ferraz¹, Ozélia Sousa-Santos², Evandro M. Neto-Neves², Elen Rizzi², Jaqueline J. Muniz¹, Raquel F. Gerlach³ and Jose E. Tanus-Santos²

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, Brazil, ²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil, and ³Department of Morphology, Stomatology and Physiology, School of Dentistry of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil

(Received 28 June 2012; Accepted 9 August 2012)

Abstract: Growing evidence supports the involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathogenesis of many cardiovascular diseases. Particularly, imbalanced MMP-2 activity apparently plays a critical role in cardiovascular remodelling. While some studies have suggested that MMP-2 may affect the vascular tone and impair β -adrenoreceptor function, no previous study has examined the acute haemodynamic effects of MMP-2. We examined the effects of recombinant human MMP-2 (rhMMP-2) administered intravenously to anaesthetized lambs at baseline conditions and during β_1 -adrenergic cardiac stimulation with dobutamine. We used 26 anaesthetized male lambs in two study protocols. First, rhMMP-2 (220 ng/kg/min. over 60 min.) or vehicle was infused in the lambs, and no significant haemodynamic changes were found. Therefore, we infused dobutamine at 5 μ g/kg/min. i.v. (or saline) over 180 min. in lambs that had received the same rhMMP-2 infusion preceded by doxycycline i.v. at 10 mg/kg (or saline). Plasma and cardiac MMP-2 levels were assessed by gelatin zymography, and gelatinolytic activity was assessed by spectrofluorimetry. Dobutamine decreased systemic vascular resistance index, and this effect was attenuated by rhMMP-2 infusion. Moreover, dobutamine increased the cardiac index and left ventricular dP/dt_{max} , and these effects were attenuated by rhMMP-2. The previous administration of doxycycline blunted rhMMP-2-induced changes in dobutamine responses. While the infusion of rhMMP-2 did not increase plasma and cardiac MMP-2 levels, it increased cardiac gelatinolytic activity, and doxycycline blunted this effect. Our findings show that rhMMP-2 exerts no major haemodynamic effects in lambs. However, rhMMP-2 impairs the responses elicited by activation of β -adrenoreceptors.

Growing evidence supports the involvement of a group of enzymes named matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathogenesis of many disease conditions, including diseases affecting the cardiovascular system [1–4]. Particular attention has been paid to MMP-2 because imbalanced MMP-2 activity apparently plays a critical role in cardiovascular remodelling [5–7] and in other alterations of the cardiovascular system [8–10]. However, recent studies are clearly showing that MMP-2 may have many other targets unrelated to the extracellular matrix, including intracellular substrates [11,12] and other mediators possibly affecting the vascular tone such as big-endothelin-1 [13], calcitonin gene-related peptide [14] and adrenomedullin [15]. Importantly, activated MMP-2 has been shown to impair cardiac function possibly as a result of its activity targeting sarcomeric and cytoskeletal proteins such as troponin I, myosin light chain-1, α -actinin and titin [16–20].

Recent studies indicate that MMPs, including MMP-2, are involved in proteolytic cleavage of β_1 - and β_2 -adrenoreceptors [21]. Rodrigues *et al.* [22] demonstrated that the labelling density of the extracellular domain of β_2 -adrenergic receptor in aortic endothelial cells from Wistar rats was reduced after treatment with plasma of spontaneously hypertensive rats with

increased MMPs levels, thus indicating cleavage of β_2 -adrenergic receptors. Supporting their findings, another study showed that MMP-2 is involved in the proteolysis of the extracellular domain of β_2 -adrenoreceptors in kidney from spontaneously hypertensive rats [23]. Furthermore, Hakalahti *et al.* [24] showed that GM6001 (a non-specific MMP inhibitor) prevented the cleavage of the *N*-terminus of the β_1 -adrenergic receptor.

While many studies implicate elevated MMP-2 levels in disease conditions, no previous study has examined the acute haemodynamic effects of MMP-2. Moreover, no previous study has examined the acute effects of MMP-2 on cardiac function. In this study, we examined the effects of recombinant human MMP-2 (rhMMP-2) [25] administered intravenously to anaesthetized lambs. Moreover, we have suggested that rhMMP-2 could impair β_1 -adrenergic cardiac stimulation with dobutamine.

Materials and Methods

Expression of full-length recombinant human MMP-2. We expressed rhMMP-2 in *Escherichia coli* as previously described [25]. In addition, we tested the functionality of this rhMMP-2 using gelatin zymography and a fluorimetric assay as described below [25].

Animal model and haemodynamic measurements. The study complied with the guidelines of the Faculty of Medicine of Ribeirao Preto,

Author for correspondence: Jose E. Tanus-Santos, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil (fax + 55 1636020220, e-mail tanus@fmp.usp.br; tanussantos@yahoo.com).

University of São Paulo, and the animals were handled according to the principles published by the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Twenty-six male mixed-bred lambs (20 ± 2.8 kg) were anaesthetized (ketamine 15 mg/kg and xylazine 0.1 mg/kg, i.m.), relaxed with pancuronium (0.1 mg/kg, i.v.), tracheally intubated, and their lungs were mechanically ventilated with room air using a volume-cycled respirator (C.F. Palmer, London, UK). The tidal volume was set at 15 ml/kg, and the respiratory rate was adjusted to maintain a baseline physiological arterial carbon dioxide tension. Anaesthesia was maintained with intramuscular injections of ketamine (5–7 mg/kg) and midazolam (0.5–1 mg/kg) every 30 min.

Saline-filled catheters were placed into the right femoral artery and left femoral vein for mean systemic arterial pressure (MAP) monitoring and fluid administration, respectively. A 7.5 F balloon-tipped Swan-Ganz thermodilution catheter was placed into the pulmonary artery via the right femoral vein to the monitoring of mean pulmonary artery pressure (MPAP), pulmonary artery occlusion pressure and central venous pressure. The catheters were connected to pressure transducers, and the measures recorded (DX2010 Monitor; Dixtal do Brasil, Manaus, Brazil). The heart rate (HR) was measured using a surface electrocardiogram (lead I), and the cardiac output was determined by thermodilution. The cardiac index (CI), systemic vascular resistance index (SVRI) and pulmonary vascular resistance index (PVRI) were calculated by standard formulae.

Another catheter was inserted into the left ventricle (LV) via the left femoral artery to monitor left ventricular pressure, which was recorded using a data acquisition system (MP150CE; Biopac Systems, Goleta, CA, USA) connected to a computer (Acknowledge 3.2 for Windows; Microsoft, Redmond, WA, USA). The first derivative of left ventricular pressure (dP/dt) was calculated, and values of the maximum rate of isovolumic pressure development (dP/dt_{\max}) were used as index of contractility.

Experimental protocols. Two experimental protocols were performed to assess the effects of rhMMP-2 at baseline conditions (Protocol I) and during dobutamine stress (Protocol II). In the first protocol, the animals were randomly assigned to two experimental groups: (i) Vehicle group ($n = 4$) that received only saline infusions and (ii) rhMMP-2 group ($n = 5$) that received intravenous infusion of rhMMP-2 (220 ng/kg/min. over 60 min.).

In the Protocol II, the animals were randomly assigned to four experimental groups: (i) Vehicle group ($n = 4$) that received only saline infusions; (ii) Dobut group ($n = 4$) that received infusion of dobutamine (Hipolabor Farmacêutica, SP, Brazil) at 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min.}$ over 180 min., intravenously; (iii) rhMMP-2 + Dobut group ($n = 7$) that received rhMMP-2 (220 ng/kg/min. over 60 min.), intravenously, followed by the same infusion of dobutamine described above; and (iv) Doxy + rhMMP-2 + Dobut group ($n = 6$) that received pre-treatment with doxycycline (Rhobifarma Indústria Farmacêutica, SP, Brazil) at 10 mg/kg, intravenously, followed by the same doses of rhMMP-2 and dobutamine described above. The dose of rhMMP-2 was chosen with basis on the circulating MMP-2 levels commonly found in human beings [26]. The doses of dobutamine and doxycycline were chosen based on previous studies showing significant β -adrenergic stimulation of dobutamine in sheep [27] and beneficial haemodynamic effects of doxycycline with MMP inhibition [28,29], respectively.

After at least 20 min. of stabilization, baseline haemodynamics were measured (BL time-point). Thereafter, haemodynamic evaluations were performed 15 min. after the doxycycline (or saline) infusion started, 30 and 60 min. after rhMMP-2 infusion started and then every 30 min. during dobutamine infusion. At the end of the experimental period, the animals were killed with an overdose of anaesthetics, and the LV was removed and frozen at -80°C .

Measurement of LV cardiac and plasma MMP-2 levels by gelatin zymography. Gelatin zymography of MMP-2 from LV and plasma samples was performed as previously described [30–32]. Briefly, tissues were homogenized in extraction buffer containing 10 mM CaCl_2 , 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM 1,10-phenanthroline, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM *N*-ethyl maleimide (NEM). Tissue extracts and plasma samples were subjected to electrophoresis on 7% SDS-PAGE co-polymerized with gelatin (1%) as the substrate. After electrophoresis, the gel was incubated for 1 hr at room temperature in a 2% Triton X-100 solution and incubated at 37°C for 18 hr in Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 10 mM CaCl_2 . The gels were stained with 0.05% Coomassie Brilliant Blue G-250 for 3 hr and destained with 30% methanol and 10% acetic acid. The gels were scanned, and the digital images were obtained from the scanner. Gelatinolytic activities were detected as unstained bands against the background of Coomassie blue-stained gelatin and assayed by densitometry with an image analysis software (Image J 1.43u; NIH, Bethesda, MD, USA). Intergel analysis was possible after normalization of gelatinolytic activity with an internal standard (foetal bovine serum). The form of MMP-2 was identified as band at 72 kDa.

Gelatinolytic activity assay. Matrix metalloproteinase activities in the LV were measured by spectrofluorimetry using a gelatinolytic activity kit (E12055; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) as previously described [6]. Briefly, LV samples were homogenized in extraction buffer (10 mM CaCl_2 , 50 mM Tris-HCl pH 7.4), placed on ice within a refrigerator overnight and then centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min. 500 μg of freshly extract and 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of DQ gelatin substrate (E12055; Molecular Probes) were added to each microplate well, and all determinations were carried out in duplicate. The protein content was measured using the Bradford method (Sigma). Gelatinolytic activity was measured with a microplate spectrofluorimeter (at $\lambda_{\text{Excitation}}$ 485, $\lambda_{\text{Emission}}$ 520 nm; Gemini EM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) after 2 hr of incubation at 37°C . A standard curve of gelatinolytic activity was prepared as recommended by the manufacturer of the kit. Inhibition of gelatinolytic activity with 1,10-phenanthroline (Phe) 100 μM and PMSF 100 μM + *N*-ethylmaleimide (NEM) 100 μM was evaluated to confirm the MMP activity in the ventricular homogenates.

Statistical analysis. Results are expressed as means \pm S.E.M. Two-way (treatments \times time) ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test or one-way ANOVA followed by the Tukey's *post hoc* test was used. A probability value <0.05 was considered the minimum level of statistical significance.

Results

Protocol I: haemodynamic effects of rhMMP-2.

We found that the infusion of rhMMP-2 exerted no significant effects on MAP and SVRI (fig. S1), MPAP and PVRI (fig. S2) and HR and CI (fig. S3). Moreover, rhMMP-2 did not significantly affect LV dP/dt_{\max} (fig. S4).

Protocol II: haemodynamic effects of rhMMP-2 during cardiac stress.

The haemodynamic parameters in animals that received only saline infusions (vehicle group) showed no significant changes during the 240 min. of monitoring (figs. 1–4). While dobutamine infusion had no significant effects on MAP, this drug decreased SVRI at 90, 120, 150 and 180 time-points

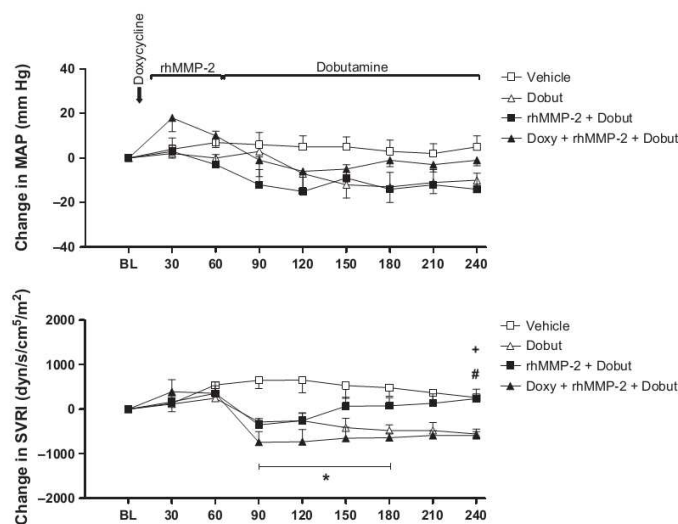


Fig. 1. Change in mean arterial pressure (MAP) and systemic vascular resistance index (SVRI) during infusion of rhMMP-2 220 ng/kg/min. (30 and 60 time-points) or saline and during infusion of dobutamine 5 μ g/kg/min. (at 90, 120, 150, 180, 210 and 240 time-points) or saline in the Vehicle (n = 4), Dobut (n = 4), rhMMP-2 + Dobut (n = 7) and Doxy + rhMMP-2 + Dobut (n = 6) groups. The black arrow indicates the intravenous administration doxycycline 10 mg/kg BL = baseline. Values are the mean \pm S.E.M. * p < 0.05 for Dobut versus Vehicle. # p < 0.05 for Dobut versus rhMMP-2 + Dobut. * p < 0.01 for rhMMP-2 + Dobut versus Doxy + rhMMP-2 + Dobut.

(p < 0.05; fig. 1). Interestingly, the co-infusion of rhMMP-2 partially prevented dobutamine-induced decreases in SVRI, especially at 240 time-point (p < 0.05; fig. 1). Moreover, the previous administration of doxycycline blunted the effects of rhMMP-2 on the dobutamine responses, particularly at 240 time-point (p < 0.01; fig. 1). No significant changes were found with respect to MPAP and PVRI (all p > 0.05; fig. 2).

While dobutamine infusion increased HR by >100% (p < 0.001; fig. 3), CI tended to increase, although this change was not significant (fig. 3). However, co-infusion of rhMMP-2 was associated with lower dobutamine-induced increases in CI, particularly at 210 and 240 time-points (p < 0.05; fig. 3). The previous administration of doxycycline blunted the effects of rhMMP-2 on the dobutamine-induced increases in CI (p < 0.01; fig. 3).

To assess cardiac contractility, we measured LV dP/dt_{max} . Dobutamine increased dP/dt_{max} by approximately 70% (p < 0.001; fig. 4). Interestingly, in parallel with CI, the infusion of rhMMP-2 was associated with lower dobutamine-induced increases in dP/dt_{max} at time-points from 90 to 240 (p < 0.05; fig. 4). Again, the previous administration of doxycycline blunted the effects of rhMMP-2 on the dobutamine-induced increases in dP/dt_{max} (p < 0.05; fig. 4).

Representative zymogram showed bands corresponding to 72 kDa molecular weight form of MMP-2 in LV and plasma samples (fig. 5A and fig. S5A, respectively). We were not able to detect significant changes in LV and plasma MMP-2 levels among study groups (fig. 5B and fig. S5B, respectively). However, the assessment of MMP activity showed that rhMMP-2 infusion significantly increased LV gelatinolytic activity, as revealed by higher gelatinolytic activity in LV

from animals in the rhMMP-2 and rhMMP-2 + Dobut groups (43% and 35% higher, respectively; p < 0.05; fig. 5C) compared with the vehicle group. Pre-treatment with doxycycline completely blunted rhMMP-2-induced increases in MMP activity (p < 0.001; fig. 5C). Fig. 5D shows that 1,10-phenanthroline 100 μ M inhibited approximately 50% of gelatinolytic activity in LV, thus indicating that approximately 50% of LV gelatinolytic activity corresponded to the MMP activity.

Discussion

This is the first study to show the acute haemodynamic effects of rhMMP-2 infusion. We showed for the first time that rhMMP-2 acutely impairs the cardiovascular responses to dobutamine and that these effects are prevented, at least in part, by pre-treatment with an MMP inhibitor (doxycycline). Moreover, we showed for the first time that an acute rhMMP-2 infusion does not exert significant haemodynamic effects, at least in animals without evidence of any disease condition.

Previous studies suggested that MMP-2 may affect the vascular tone by modulating the concentrations of various vasoactive peptides including endothelins [13], calcitonin gene-related peptide [14] and adrenomedullin [15]. In contrast with this suggestion, the results we found in the first protocol (which showed no significant haemodynamic effects for rhMMP-2) suggest that MMP-2 does not significantly affect the concentrations of these vasoactive peptides *in vivo*. Although we have not measured the tissue concentrations of these peptides, we believe that either MMP-2 does not affect their *in vivo* levels or the acute alterations induced in their tissue concentrations by the acute administration of rhMMP-2

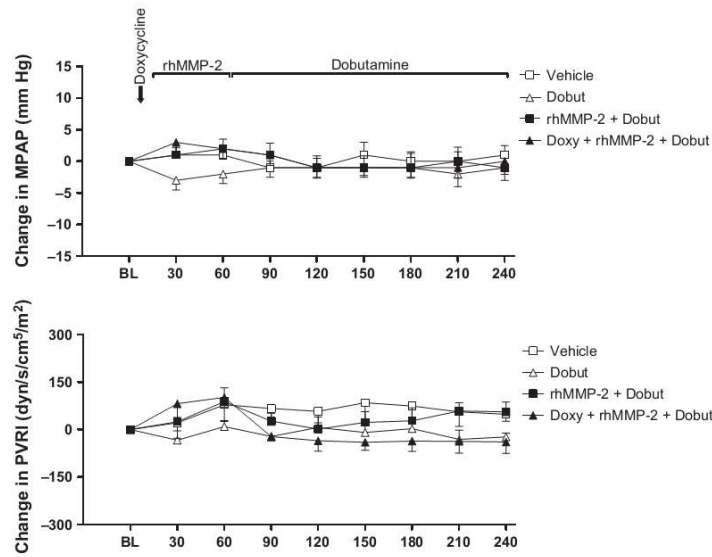


Fig. 2. Change in mean pulmonary arterial pressure (MPAP) and pulmonary vascular resistance index (PVRI) during infusion of rhMMP-2 220 ng/kg/min. (30 and 60 time-points) or saline and during infusion of dobutamine 5 µg/kg/min. (at 90, 120, 150, 180, 210 and 240 time-points) or saline in the Vehicle (n = 4), Dobut (n = 4), rhMMP-2 + Dobut (n = 7) and Doxy + rhMMP-2 + Dobut (n = 6) groups. The black arrow indicates the intravenous administration doxycycline 10 mg/kg BL = baseline. Values are the mean ± S.E.M.

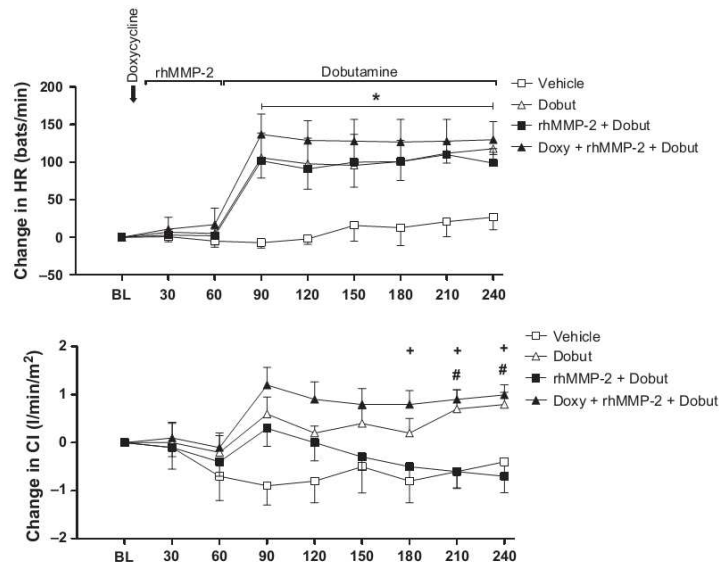


Fig. 3. Change in heart rate (HR) and cardiac index (CI) during infusion of rhMMP-2 220 ng/kg/min. (30 and 60 time-points) or saline and during infusion of dobutamine 5 µg/kg/min. (at 90, 120, 150, 180, 210 and 240 time-points) or saline in the Vehicle (n = 4), Dobut (n = 4), rhMMP-2 + Dobut (n = 7) and Doxy + rhMMP-2 + Dobut (n = 6) groups. The black arrow indicates the intravenous administration doxycycline 10 mg/kg. BL = baseline. Values are the mean ± S.E.M. * $p < 0.001$ for Dobut versus Vehicle. # $p < 0.05$ for Dobut versus rhMMP-2 + Dobut. + $p < 0.01$ for rhMMP-2 + Dobut versus Doxy + rhMMP-2 + Dobut.

are not haemodynamically relevant, at least in normal animals. However, this suggestion may not be true in animal models of disease conditions.

Matrix metalloproteinases, particularly MMP-2, are known to affect β_1 - and β_2 -adrenoreceptors [21–24]. The significant attenuation in dobutamine-induced reduction in SVRI after

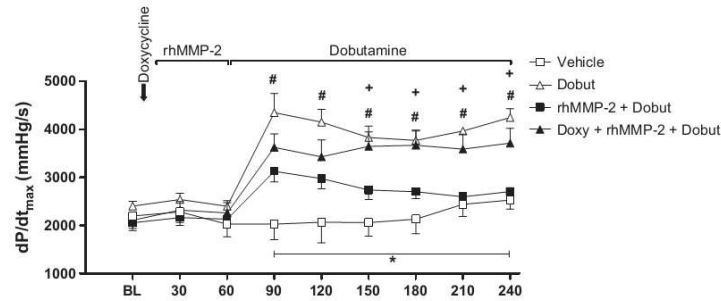


Fig. 4. Left ventricular contractile function assessed as maximum rate of pressure development (dP/dt_{max}) at baseline (BL) and during infusion of rhMMP-2 (220 ng/kg/min.; 30 and 60 time-points) or saline and during infusion of dobutamine (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ 90, 120, 150, 180, 210 and 240 time-points) or saline in the Vehicle (n = 4), Dobut (n = 4), rhMMP-2 + Dobut (n = 7) and Doxy + rhMMP-2 + Dobut (n = 6) groups. The black arrow indicates the intravenous administration doxycycline 10 mg/kg. Values are the mean \pm S.E.M. * $p < 0.001$ for Dobut versus Vehicle. # $p < 0.01$ for Dobut versus rhMMP-2 + Dobut. † $p < 0.05$ for rhMMP-2 + Dobut versus Doxy + rhMMP-2 + Dobut.

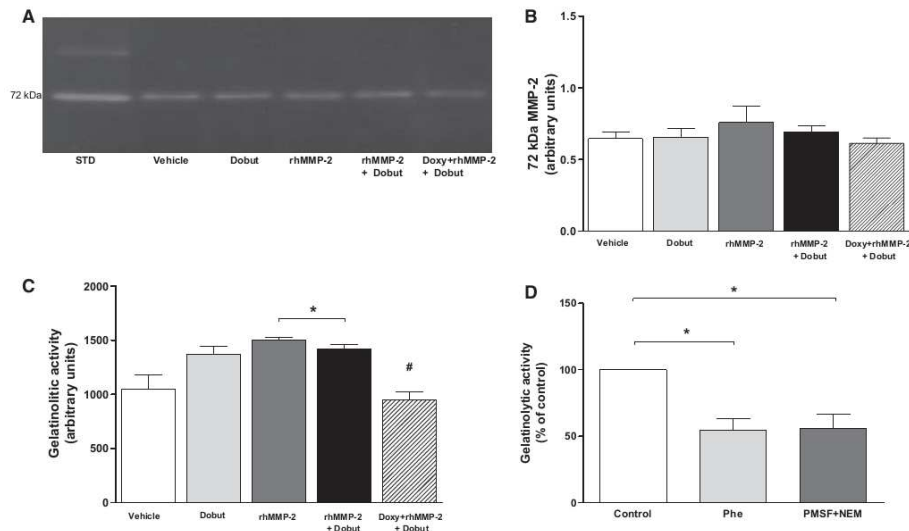


Fig. 5. (A) Representative SDS-PAGE gelatin zymogram of left ventricle samples showing the bands corresponding to 72 kDa molecular weight form of MMP-2. Internal standard (STD) corresponds to a 72 kDa band (MMP-2) from foetal bovine serum, which was used as a standard to normalize the data. (B–C) Values for 72 kDa molecular weight form of MMP-2 (B) and gelatinolytic activity measured by spectrofluorimetry (C) in the left ventricles from lambs that received saline (Vehicle group; n = 4), dobutamine (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) intravenously (Dobut group; n = 4), rhMMP-2 (220 ng/kg/min.) intravenously (rhMMP-2 group; n = 5), rhMMP-2 (220 ng/kg/min.) followed by dobutamine (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) intravenously (rhMMP-2 + Dobut group; n = 7) and from lambs pre-treated with doxycycline (10 mg/kg) that received rhMMP-2 (220 ng/kg/min.) followed by dobutamine (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) intravenously (Doxy + rhMMP-2 + Dobut group; n = 6). (D) Inhibition of gelatinolytic activity with 1,10-phenanthroline (Phe) 100 μM and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 100 μM + *N*-ethylmaleimide (NEM) 100 μM to confirm the matrix metalloproteinases activity in the ventricular homogenates. Values are the mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ versus Vehicle group. # $p < 0.05$ versus rhMMP-2 and rhMMP-2 + Dobut groups.

the infusion of rhMMP-2 is consistent with impaired β_2 -adrenoreceptors-mediated vasodilation possibly resulting of enhanced MMP-2 activity. In line with this suggestion, the MMP inhibitor doxycycline prevented this alteration induced by rhMMP-2. Supporting our findings, it has been shown that MMP-2 may proteolyse β_2 -adrenoreceptors [23]. While no previous study had examined the haemodynamic consequences of this effect, our results suggest that MMP-2 may

affect vascular tone by impairing β_2 -adrenoreceptors, and further studies should be carried out to examine the consequences of chronic increases in MMP-2 levels with respect to β_2 -adrenoreceptors.

Increased MMP-2 activity has been shown both in experimental models of cardiovascular diseases [1,5,33] and in patients, including those with heart failure [26,34,35]. Our results showing that MMP-2 impairs the responses to dobuta-

mine are consistent with the suggestion that MMP-2 may contribute to cardiac dysfunction. In fact, there is no clear information with respect to the origins of circulating MMP-2 measured in plasma samples [34]. While circulating MMPs may derive from a number of different cell and tissue types in many different disease conditions [34], our findings are consistent with the idea that circulating MMP-2 may play a role in cardiovascular diseases by affecting β_1 -adrenoreceptors. Interestingly, we found that the infusion of rhMMP-2 increased the gelatinolytic activity in the LV from animals. However, these increases were not paralleled by increased LV and plasma MMP-2 levels measured by gel zymography. Although we do not have a precise explanation for these findings, increased activation of cardiac MMP-2 activity has been found in association with depletion and lower cardiac MMP-2 levels during ischaemia-reperfusion experiments [36]. Further studies are necessary to determine the kinetics of MMP-2.

Importantly, our results showed impaired cardiac responses to dobutamine in animals treated with rhMMP-2, which were prevented by doxycycline. These findings clearly suggest that MMP-2 may affect the responsiveness of β_1 -adrenoreceptors. Although we have not determined molecular mechanisms in the present study, our findings are consistent with a recent report showing that GM6001 (a non-specific MMP inhibitor) prevented the cleavage of the *N*-terminus of the β_1 -adrenergic receptor [24]. Giving further support to our findings, increased MMP-2 expression impaired contraction and reduced the responses to inotropic stimulation in transgenic mice over-expressing MMP-2 [37,38]. Together, these findings strongly indicate that abnormal MMP-2 activity can directly impair LV function.

In conclusion, our findings show that rhMMP-2 exerts no major haemodynamic effects in lambs. However, rhMMP-2 clearly impairs the responses elicited by activation of β -adrenoreceptors. Our findings suggest that MMP inhibitors such as doxycycline can clearly attenuate cardiovascular dysfunction associated with increased MMP-2 activity.

Acknowledgements

This study was funded by Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil) and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil).

References

- 1 Castro MM, Rizzi E, Ceron CS, Guimaraes DA, Rodrigues GJ, Bendhack LM *et al.* Doxycycline ameliorates 2K-1C hypertension-induced vascular dysfunction in rats by attenuating oxidative stress and improving nitric oxide bioavailability. *Nitric Oxide* 2012;**26**:162–8.
- 2 Ceron CS, Rizzi E, Guimaraes DA, Martins-Oliveira A, Cau SB, Ramos J *et al.* Time course involvement of matrix metalloproteinases in the vascular alterations of renovascular hypertension. *Matrix Biol* 2012;**31**:261–70.
- 3 Marson BP, Poli de Figueiredo CE, Tanus-Santos JE. Imbalanced matrix metalloproteinases in cardiovascular complications of end-stage kidney disease: a potential pharmacological target. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012;**110**:409–15.
- 4 Neto-Neves EM, Dias-Junior CA, Uzuelli JA, Pereira RP, Spiller F, Czaikoski PG *et al.* Sildenafil improves the beneficial hemodynamic effects exerted by atorvastatin during acute pulmonary thromboembolism. *Eur J Pharmacol* 2011;**670**:554–60.
- 5 Castro MM, Rizzi E, Figueiredo-Lopes L, Fernandes K, Bendhack LM, Pitol DL *et al.* Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis* 2008;**198**:320–31.
- 6 Castro MM, Rizzi E, Rodrigues GJ, Ceron CS, Bendhack LM, Gerlach RF *et al.* Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. *Free Radic Biol Med* 2009;**46**:1298–307.
- 7 Rizzi E, Castro MM, Prado CM, Silva CA, Fazan R Jr, Rossi MA *et al.* Matrix metalloproteinase inhibition improves cardiac dysfunction and remodeling in 2-kidney, 1-clip hypertension. *J Card Fail* 2010;**16**:599–608.
- 8 Yamazaki T, Lee JD, Shimizu H, Uzui H, Ueda T. Circulating matrix metalloproteinase-2 is elevated in patients with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 2004;**6**:41–5.
- 9 Yasmin, McEniery CM, Wallace S, Dakham Z, Pulsalkar P, Maki-Petaja K *et al.* Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;**25**:372.
- 10 Ceron CS, Castro MM, Rizzi E, Montenegro MF, Fontana V, Salgado MC *et al.* Spironolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and expression in a model of renovascular hypertension. *Br J Pharmacol* 2010;**160**:77–87.
- 11 McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!. *Curr Opin Cell Biol* 2001;**13**:534–40.
- 12 Schulz R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;**47**:211–42.
- 13 Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res* 1999;**85**:906–11.
- 14 Fernandez-Patron C, Stewart KG, Zhang Y, Koivunen E, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. *Circ Res* 2000;**87**:670–6.
- 15 Martinez A, Oh HR, Unsworth EJ, Bregonzio C, Saavedra JM, Stetler-Stevenson WG *et al.* Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. *Biochem J* 2004;**383**:413–8.
- 16 Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JR, Sawicki G, Schulz R. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 2002;**106**:1543–9.
- 17 Gao CQ, Sawicki G, Suarez-Pinzon WL, Csont T, Wozniak M, Ferdinandy P *et al.* Matrix metalloproteinase-2 mediates cytokine-induced myocardial contractile dysfunction. *Cardiovasc Res* 2003;**57**:426–33.
- 18 Sawicki G, Leon H, Sawicka J, Sariahmetoglu M, Schulze CJ, Scott PG *et al.* Degradation of myosin light chain in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion injury: a new intracellular target for matrix metalloproteinase-2. *Circulation* 2005;**112**:544–52.
- 19 Sung MM, Schulz CG, Wang W, Sawicki G, Bautista-Lopez NL, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 degrades the cytoskeletal protein alpha-actinin in peroxynitrite mediated myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol* 2007;**43**:429–36.
- 20 Ali MA, Cho WJ, Hudson B, Kassiri Z, Granzier H, Schulz R. Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2010;**122**:2039–47.

- 21 Rietz A, Spiers J. The relationship between the MMP system, adrenoceptors and phosphoprotein phosphatases. *Br J Pharmacol* 2012;**166**:1225–43.
- 22 Rodrigues SF, Tran ED, Fortes ZB, Schmid-Schonbein GW. Matrix metalloproteinases cleave the beta2-adrenergic receptor in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;**299**:H25–35.
- 23 Wu KI, Schmid-Schonbein GW. Nuclear factor kappa B and matrix metalloproteinase induced receptor cleavage in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 2011;**57**:261–8.
- 24 Hakalahti AE, Vierimaa MM, Lilja MK, Kumpula EP, Tuusa JT, Petaja-Repo UE. Human beta1-adrenergic receptor is subject to constitutive and regulated N-terminal cleavage. *J Biol Chem* 2010;**285**:28850–61.
- 25 Goncalves AN, Meschiar CA, Stetler-Stevenson WG, Nonato MC, Alves CP, Espreafico EM *et al.* Expression of soluble and functional full-length human matrix metalloproteinase-2 in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 2012;**157**:20–4.
- 26 Palei AC, Sandrim VC, Amaral LM, Machado JS, Cavalli RC, Duarte G *et al.* Association between matrix metalloproteinase (MMP)-2 polymorphisms and MMP-2 levels in hypertensive disorders of pregnancy. *Exp Mol Pathol* 2012;**92**:217–21.
- 27 Yerebakan C, Klopsch C, Niefeldt S, Zeisig V, Vollmar B, Liebold A *et al.* Acute and chronic response of the right ventricle to surgically induced pressure and volume overload—an analysis of pressure-volume relations. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2010;**10**:519–25.
- 28 Fortuna GM, Figueiredo-Lopes L, Dias-Junior CA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. A role for matrix metalloproteinase-9 in the hemodynamic changes following acute pulmonary embolism. *Int J Cardiol* 2007;**114**:22–7.
- 29 Neto-Neves EM, Dias-Junior CA, Rizzi E, Castro MM, Sonego F, Gerlach RF *et al.* Metalloproteinase inhibition protects against cardiomyocyte injury during experimental acute pulmonary thromboembolism. *Crit Care Med* 2011;**39**:349–56.
- 30 Sousa-Santos O, Neto-Neves EM, Ferraz KC, Ceron CS, Rizzi E, Gerlach RF *et al.* Antioxidant treatment protects against matrix metalloproteinase activation and cardiomyocyte injury during acute pulmonary thromboembolism. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2012;**385**:685–96.
- 31 Muniz JJ, Lacchini R, Belo VA, Nobre YT, Tucci S Jr, Martins AC *et al.* Circulating matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in patients with erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 2012;**24**:38–43.
- 32 Fontana V, Silva PS, Belo VA, Antonio RC, Ceron CS, Biagi C *et al.* Consistent alterations of circulating matrix metalloproteinases levels in untreated hypertensives and in spontaneously hypertensive rats: a relevant pharmacological target. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011;**109**:130–7.
- 33 Castro MM, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. Matrix metalloproteinases: targets for doxycycline to prevent the vascular alterations of hypertension. *Pharmacol Res* 2011;**64**:567–72.
- 34 Fontana V, Silva PS, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension. *Clin Chim Acta* 2012;**413**:656–62.
- 35 Altieri P, Brunelli C, Garibaldi S, Nicolino A, Ubaldi S, Spallarossa P *et al.* Metalloproteinases 2 and 9 are increased in plasma of patients with heart failure. *Eur J Clin Invest* 2003;**33**:648–56.
- 36 Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, Wang W, Radomski MW, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation* 2000;**101**:1833–9.
- 37 Wang GY, Bergman MR, Nguyen AP, Turcato S, Swigart PM, Rodrigo MC *et al.* Cardiac transgenic matrix metalloproteinase-2 expression directly induces impaired contractility. *Cardiovasc Res* 2006;**69**:688–96.
- 38 Bergman MR, Teerlink JR, Mahimkar R, Li L, Zhu BQ, Nguyen A *et al.* Cardiac matrix metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;**292**:H1847–60.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Mean arterial pressure (MAP) and systemic vascular resistance index (SVRI) at baseline (BL) and after infusion of saline or rhMMP-2 at 220 ng/kg/min. (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 and 240 time points) or saline in the vehicle (n = 4) or in the rhMMP-2 (n = 5) groups, respectively. Values are the mean ± S.E.M.

Fig. S2. Mean pulmonary arterial pressure (MPAP) and pulmonary vascular resistance index (PVRI) at baseline (BL) and after infusion of saline or rhMMP-2 at 220 ng/kg/min. (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 and 240 time points) or saline in the vehicle (n = 4) or in the rhMMP-2 (n = 5) groups, respectively. Values are the mean ± S.E.M.

Fig. S3. Heart rate (HR) and cardiac index (CI) at baseline (BL) and after infusion of saline or rhMMP-2 at 220 ng/kg/min. (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 and 240 time points) or saline in the vehicle (n = 4) or in the rhMMP-2 (n = 5) groups, respectively. Values are the mean ± S.E.M.

Fig. S4. Left ventricular contractile function assessed as maximum rate of pressure development (dp/dt_{max}) at baseline (BL) and after infusion of saline or rhMMP-2 at 220 ng/kg/min. (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 and 240 time points) or saline in the vehicle (n = 4) or in the rhMMP-2 (n = 5) groups, respectively. Values are the mean ± S.E.M.

Fig. S5. (A) Representative SDS-PAGE gelatin zymogram of plasma samples at the 240 time point showing the bands corresponding to 72 kDa molecular weight form of MMP-2. Internal standard (STD) corresponds to a 72 kDa band (MMP-2) from foetal bovine serum, which was used as a standard to normalize the data. (B) Plasma 72 kDa MMP-2 levels (percentage of baseline – BL) in lambs that received saline (vehicle group; n = 4), dobutamine (5 µg/kg/min.) intravenously (Dobut group; n = 4), rhMMP-2 (220 ng/kg/min.) intravenously (rhMMP-2 group; n = 5), rhMMP-2 (220 ng/kg/min.) followed by dobutamine (5 µg/kg/min.) intravenously (rhMMP-2 + Dobut group; n = 7) and from lambs pre-treated with doxycycline (10 mg/kg) that received rhMMP-2 (220 ng/kg/min.) followed by dobutamine (5 µg/kg/min.) intravenously (Doxy + rhMMP-2 + Dobut group; n = 6). Values are the mean ± S.E.M.

As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.