



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

LUAN VICTOR RESQUE RAMOS

AUMENTO NO SISTEMA COMPLEMENTO E REDUÇÃO DE CÉLULAS T
REGULADORAS PODEM AUMENTAR A ATIVIDADE DA METALOPROTEINASE
DE MATRIZ (MMP)-2 E O REMODELAMENTO ARTERIAL NA HIPERTENSÃO

Ribeirão Preto - SP

2024

LUAN VICTOR RESQUE RAMOS

AUMENTO NO SISTEMA COMPLEMENTO E REDUÇÃO DE CÉLULAS T
REGULADORAS PODEM AUMENTAR A ATIVIDADE DA METALOPROTEINASE
DE MATRIZ (MMP)-2 E O REMODELAMENTO ARTERIAL NA HIPERTENSÃO

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

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

Área de Concentração: Farmacologia

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

Ribeirão Preto - SP

2024

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

Ramos, Luan Victor Resque

Aumento do sistema complemento e redução de células T reguladoras podem aumentar a atividade da metaloproteinase de matriz (MMP-2) e o remodelamento arterial na hipertensão. Ribeirão Preto, 2024.

87 p.

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

Orientadora: Castro, Michele Mazzaron de
Hipertensão arterial; sistema complemento; MMP-2

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: RAMOS, Luan Victor Resque.

Título: Aumento do sistema complemento e redução de células T reguladoras podem aumentar a atividade da metaloproteinase de matriz (MMP)-2 e o remodelamento arterial na hipertensão.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovado em: ___/___/___

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profa. Dra.: Michele Mazzaron de Castro

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP - USP).

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais, todo o amor do mundo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que, Anderson Ramos e Lucilene Resque que muitas vezes abdicaram de si mesmos nas mais diferentes formas para que eu pudesse existir. Seus ensinamentos ficarão comigo até o último momento. Tudo o que aprendi e aprendo convosco são preciosidades da minha vida. Obrigado por todo o incentivo, apoio, elogios, sermões, broncas e principalmente, pela crença nos meus sonhos, mesmo os mais difíceis. É mais do que uma honra ser filho de vocês dois.

Aos meus avós, Raimundo Nonato e Lucia Resque, vocês são os meus segundos pais, me criaram parte da minha vida como filho, sempre provendo nada menos que amor verdadeiro, boas lições, experiências de vida e cuidado. Valorizo muito todas as heranças imateriais que herdei de vocês, como para qual time torcer ou o jeito de vislumbrar a vida. A minha vó, Maria que mesmo tendo uma relação distante, sempre me tratou com muito respeito. Há admiração mútua. É um privilégio ser neto de vocês.

Aos meus irmãos, Heitor e Lunara, que são muito diferentes entre si e diferentes de mim. Com vivências completamente diferentes de um para outro, vocês trilharam comigo um caminho único e me ensinaram o significado da palavra irmandade em cada noite de diversão, discussão e companheirismo.

Ao meu primo – irmão de outra mãe –, Anderson Junior que é também meu melhor amigo desde que nasceu, sempre fomos muito próximos, e depois que foi morar na mesma casa que eu, considero um irmão. Agradeço cada conversa, música cantada e cantarolada em voz alta junto e cada recomendação de animes e jogos.

À minha companheira, Anísia, que trilha o mesmo caminho desde o primeiro mês de faculdade. Obrigado por acreditar em mim quando eu mesmo nem acreditava. Gratidão por ser quem és em todas as tuas facetas. Tu tens iluminado o meu caminho dia a após dias, o tornando menos pesado. Tenho orgulho do que já construímos, e tenho certeza que terei do que está por vir.

À minha orientadora, Dr^a Michele Mazzaron de Castro, sou grato em primeiro lugar pela oportunidade em aceitar um aluno de tão longe em seu laboratório. Obrigado por acreditar em mim e depositar sua confiança na minha pessoa nessa

jornada. Profissionalmente, uma orientadora exigente, firme, crítica e criativa. No âmbito pessoal, uma amiga leal e bondosa.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, com quem partilho grande parte do dia em um ambiente confortável; Marcela, que me acolheu e me ensinou grande parte do que sei. Para além disso, é uma amiga gentil e cuidadosa; Viviano, obrigado por todos os direcionamentos e por seus ensinamentos; Evellin, que se tornou uma parceira de experimentos e uma amiga querida; Leandro, que é prestativo em nossas colaborações; Elielma, sempre com seu sorriso faz com que as coisas fiquem mais leves no ambiente; Priscila, sempre muito ávida a fazer mais e ajudar; Eduardo, de poucas palavras, mas uma boa amizade; Ruan, que sempre alegra o dia em todas as situações. É gratificante compartilhar experiências, colaborações e conhecimentos com todos vocês.

Às minhas colaborações, Alecsander, que me proveu ensinamentos vitais para a realização da metodologia deste trabalho. Ao professor Dr^o José Carlos Farias Alves Filho e seu aluno de doutorado Bruno Marcel, meu conterrâneo, que contribuíram com parte dos resultados, sempre solícitos e com boas colocações no projeto. À professora Rita Tostes e seu aluno de doutorado José Teles, que também contribuíram à realização deste trabalho. Sou grato a todos.

Aos funcionários da FMRP, Giuliana e Laura, as respectivas atual e antiga técnicas do laboratório onde atuo. Obrigado por seu carinho, ensinamentos, elucidação de dúvidas, suporte técnico e facilitação do trabalho realizado no dia a dia. Aos técnicos Alberto, Eleni, Elizabeth e Vâni, pela generosidade em conduzir e ensinar sua atividade laboral visando o auxílio do aluno de maneira muito clara e objetiva.

Aos dois secretários do departamento de Farmacologia, Ramon e Gislaine, que auxiliam em todos os trâmites que tangem ao departamento, bolsas e auxílios. Sou muito grato a cada vez que precisei da vossa ajuda.

Aos funcionários da limpeza do departamento. Sempre estão de prontidão e empenhados a ajudar em qualquer situação que necessite ajuda.

Aos meus amigos de infância, de ensino médio e alguns parentes que mantenho proximidade que me ajudaram em algum momento na realização deste trabalho, mesmo que em pequenas ações. Como menções, deixo os nomes de

Cristian e Karol, sem vocês, a graduação não seria a mesma. Obrigado por estarem comigo em todos os momentos.

À Universidade Federal do Pará (UFPA), se estou aqui, é porque tive uma educação pública de qualidade e foi esta universidade - que foi minha casa - que proporcionou.

Ao meu grupo de Farmacologia e Doenças Negligenciadas da UFPA, liderados pela professora Dr^a Fani Dolabela, que me iniciou no universo da ciência, sou bastante grato pela orientação durante a minha estadia em seu laboratório.

Aos meus professores, especialmente os do ensino fundamental, como Rafael, Michelle e Lenita, entre todos, vocês três me ensinaram muito mais do que matérias escolares, me ensinaram e me moldaram a ser uma pessoa melhor do que eu era quando os conheci. Meu muito obrigado.

À universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e todos os seus membros por me concederem a instrumentação, suporte, alimento e auxílio necessário para a realização deste trabalho.

Aos professores da FMRP e em especial do Departamento de Farmacologia, por contribuírem com discussões científicas de alta qualidade e bancas elevaram o nível da minha formação profissional.

Agradeço do fundo do coração a qualquer pessoa que tenha contribuído para à minha vida, formação e a realização deste trabalho que por ventura não veio a ser citado neste fragmento de agradecimentos.

À banca examinadora pelas considerações, sugestões e palavras que contribuíram para o aprimoramento do trabalho.

Aos animais utilizados para a realização deste trabalho, o meu mais profundo agradecimento e respeito por suas vidas.

Por fim, às agências de fomento: CAPES, CNPq e FAPESP por todo o apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho. Agradecimentos à FAPESP em especial pelo fornecimento de uma bolsa durante o segundo ano do mestrado

(2023/04177-4) que me auxiliou na minha estadia em Ribeirão Preto, além do custeio da ida em eventos científicos de renome.

“Conhecendo tanto a derrota quanto a vitória, andando por aí derramando lágrimas, é assim que você se torna um verdadeiro homem.”

Eiichiro Oda (Shanks).

RESUMO

Ramos, L. V. R. **Aumento do sistema complemento e redução de células T reguladoras podem aumentar a atividade da metaloproteinase de matriz (MMP-2) e o remodelamento arterial na hipertensão.** 85 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

A hipertensão arterial está associada à inflamação, de modo que pacientes hipertensos apresentam maiores concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias. A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), a expressão e liberação de citocinas e quimiocinas e a infiltração de células imunes nos rins e nas artérias são características da hipertensão. O estresse oxidativo pode participar da regulação da resposta imune na hipertensão através da ativação do sistema complemento e redução de células T reguladoras (Tregs). O sistema complemento, por sua vez, diminui fisiologicamente a expressão e função de Tregs circulantes *in vivo*, de modo que aumento da sua atividade resulta em inibição da capacidade supressora dessa população de células e em estresse oxidativo, sugerindo uma inter-relação entre os componentes dessa via. Ademais, o estresse oxidativo é capaz de aumentar a atividade da MMP-2, que é importante para o remodelamento arterial na hipertensão, enquanto o sistema complemento aumenta a expressão de MMP-2 em modelo animal de aneurisma. Sabendo que ocorre aumento do sistema complemento na hipertensão, a hipótese é que o aumento do sistema complemento C3a contribui para aumentar estresse oxidativo, reduzir Tregs e aumentar a atividade e expressão da MMP-2, o que resulta no remodelamento arterial da hipertensão. A hipertensão foi induzida em camundongos C57BL/6 por infusão de angiotensina-II por minibombas osmóticas, e estes foram tratados com o antagonista de C3aR, o SB290157. A pressão arterial foi avaliada por pletismografia de cauda e de forma invasiva e a expressão de Foxp3, C3a, C3aR, MMP-2, IL-6 e IL-10 foi determinada por Western Blot e Elisa; a atividade de MMP-2 foi determinada por zimografia em gel e *in situ* e o estresse oxidativo por DHE; análise do remodelamento arterial também foi avaliada por coloração com hematoxilina e eosina; marcação de CD4 e Foxp3 foi usada na citometria de fluxo. A pressão arterial sistólica foi maior no grupo hipertenso em relação ao grupo Sham ($p < 0,05$), e o tratamento foi efetivo na diminuição de PAS no último dia de tratamento pelo método não-invasivo, entretanto, pelo método invasivo, não houve diferença. O grupo hipertenso também obteve valores maiores de citocinas pró-inflamatórias em relação ao grupo Sham. Em relação ao conteúdo proteico de C3aR, não houve diferença significativa entre os grupos. O grupo

hipertenso também obteve valores maiores de C3a presente no plasma ($p < 0,05$) em relação ao grupo Sham. Pela análise em conteúdo aórtico, a atividade de MMP-2 estava aumentada no grupo hipertenso e o fármaco foi capaz de diminuir a atividade ($p < 0,05$). O aumento de C3a decorrente da gênese da hipertensão tem como consequência a piora do quadro hipertensivo e aumento da atividade de MMP-2, este que pode ser atenuada com o uso do fármaco.

Palavras-chaves: complemento; metaloproteinase de matriz; estresse oxidativo; células T reguladoras; remodelamento arterial; hipertensão.

ABSTRACT

Ramos, L. V. R. **Increased complement system and reduced regulatory T cells may increase the activity of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and arterial remodeling in hypertension.** 85 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

Hypertension is associated with inflammation, so that hypertensive patients have higher plasma concentrations of pro-inflammatory cytokines. The generation of reactive oxygen species (ROS), the expression and release of cytokines and chemokines and the infiltration of immune cells in the kidneys and arteries are characteristic of hypertension. Oxidative stress may play a role in regulating the immune response in hypertension by activating the complement system and reducing regulatory T cells (Tregs). The complement system, in turn, physiologically decreases the expression and function of circulating Tregs *in vivo*, so that an increase in its activity results in inhibition of the suppressive capacity of this population of cells and in oxidative stress, suggesting an inter-relationship between the components of this pathway. Furthermore, oxidative stress is capable of increasing the activity of MMP-2, which is important for arterial remodelling in hypertension, while the complement system increases the expression of MMP-2 in an animal model of aneurysm. Knowing that there is an increase in the complement system in hypertension, the hypothesis is that the increase in the complement system C3a contributes to increasing oxidative stress, reducing Tregs and increasing the activity and expression of MMP-2, which results in arterial remodelling in hypertension. Hypertension was induced in C57BL/6 mice by infusion of angiotensin-II by osmotic minipumps, and they were treated with the C3aR antagonist SB290157. Blood pressure was assessed by tail and invasive plethysmography and the expression of Foxp3, C3a, C3aR, MMP-2, IL-6 and IL-10 was determined by Western Blot and Elisa; MMP-2 activity was determined by gel and *in situ* zymography and oxidative stress by DHE; analysis of arterial remodelling was also assessed by haematoxylin and eosin staining; CD4 and Foxp3 staining was used in flow cytometry. Systolic blood pressure was higher in the hypertensive group compared to the Sham group ($p < 0.05$), and the treatment was effective in lowering SBP on the last day of treatment by the non-invasive method; however, by the invasive method, there was no difference. The hypertensive group also obtained higher values of pro-inflammatory cytokines than the Sham group. There was no significant difference between the groups in terms of C3aR protein content. The hypertensive group also had higher plasma C3a values ($p < 0.05$) than the Sham group. By analysing aortic

content, MMP-2 activity was increased in the hypertensive group and the drug was able to decrease activity ($p < 0.05$). The increase in C3a resulting from the onset of hypertension has the effect of worsening hypertension and increasing MMP-2 activity, which can be attenuated with the use of the drug.

Keywords: complement; oxidative stress; matrix metalloproteinase; regulatory T cells; arterial remodeling; hypertension.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Angiotensina-II-TLR4: vias de sinalização que medeiam a inflamação durante a hipertensão (24)
- Figura 2 - Três vias diferentes compõem a ativação do sistema complemento..... (26)
- Figura 3 - Células imunes e a ativação do complemento contribuem para o aumento da pressão arterial..... (28)
- Figura 4 - Mecanismo de ativação proteolítica e não proteolítica da MMP-2. (31)
- Figura 5 - Esquema para visualização da metodologia utilizada.....(38)
- Figura 6 - A: Pressão arterial sistólica (PAS) de camundongos submetidos a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas com Ang II, tratados ou não com o antagonista de C3aR. B: Pressão arterial sistólica (PAS) invasiva no 14º dia de tratamento e imagem representativa da aferição de pressão arterial invasiva (47)
- Figura 7 - Concentração plasmática de C3a de camundongos submetidos a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas com Ang II, tratados ou não com o antagonista de C3aR..... (49)
- Figura 8 - Conteúdo proteico da expressão do receptor de C3a (C3aR) em aortas de camundongos submetidos a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas com estímulo ou não de Ang II, tratados ou não com o antagonista de C3aR..... (50)
- Figura 9 - Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela técnica de DHE em aortas de camundongos submetidos a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas com estímulo ou não de Ang II, tratados ou não com antagonista de C3aR..... (51)
- Figura 10 - Citometria de fluxo de linfócitos T CD4+ (A e B) e Foxp3+IL-10+ (C e D) em tecidos renais de camundongos submetidos a cirurgia de implantação das

minibombas osmóticas com estímulo ou não de Ang II, tratados ou não com o antagonista de C3aR..... (52)

Figura 11 - Concentrações renais de IL-10, IL-6 e TNF- α em camundongos submetidos a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas com estímulo ou não de Ang II, tratados ou não com o antagonista de C3aR..... (53)

Figura 12 - Concentrações proteicas de NF-kB e p-NF-kB em aortas de camundongos submetidos a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas com Ang II, tratados ou não com o antagonista de C3aR.....

Figura 13 - Atividade da MMP-2 por zimografia em gel em aortas de camundongos submetidos a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas com estímulo ou não de Ang II, tratados ou não com o antagonista de C3aR.(54)

Figura 14 - Atividade gelatinolítica por zimografia *in situ* em aortas de camundongos incubadas ou não com Ang II e antagonista de C3aR. (55)

Figura 105 - Correlação positiva entre EROs e atividade gelatinolítica *in situ*, ambos vistos em aortas de camundongos incubadas ou não com Ang II e SB290157.....(57)

Figura 16 - A: Área de secção transversal (CSA) e B: razão média/lúmen (M/L) das aortas de camundongos submetidos a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas com estímulo ou não de Ang II, tratados ou não com antagonista de C3aR..... (58)

Figura 17- A: Curvas concentração-efeito à fenilefrina (PE) em anéis de aorta de camundongos submetidos a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas com estímulo ou não de Ang II, tratados ou não com antagonista de C3aR.....(59)

Figura 18 - A: Curvas concentração-efeito à acetilcolina (ACh) em anéis de aorta de camundongos submetidos a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas com estímulo ou não de Ang II, tratados ou não com o antagonista de C3aR. B: O gráfico

de barra mostra a resposta máxima que foi medida durante a curva de concentração-efeito. C: O gráfico de barra mostra os valores de pD_2 obtidos da transformação dos valores de EC50 (60)

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

°C - Graus Celsius

µg - Micrograma

µm - Micrômetro

π - Unidade Pi

ACh - Acetilcolina

Ai - Área interna do lúmen

Ae - Área externa do lúmen

BSA - Albumina de Soro Bovino

CSA - Área de Secção Transversal

Ang II - Angiotensina II

ANOVA - Análise de variância

AT1r - Receptor do tipo AT1

C3aR - Receptor de C3a

C5aR - Receptor de C5a

CaCl₂ - Cloreto de cálcio

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CMLV - Células musculares lisas vasculares

Da - Dalton

DAMPS - Padrões Moleculares Associados a Danos

DC - Células dendríticas

DE - Diâmetros Externos

DHE - Diidroetídio

DI - Diâmetro Interno

DMSO - Dimetilsufóxido

DOCA - Acetato de desoxicorticosteronadhe

DTT - Ditioneitol

EC₅₀ - concentração da droga que induz metade do efeito máximo após determinado tempo.

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA - ensaio imunoenzimático

ERK - proteína quinase regulada por sinais extracelulares

Fc - Fragmento cristalizável

Foxp3 - *forkhead box P3*

g - Grama
GSH - glutathiona celular
HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica
HE - hematoxilina e eosina
H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio
HCl - Ácido Clorídrico
Hz - Hertz
IgG - Imunoglobulina G
IgM - Imunoglobulina M
IL-1 β – Interleucina 1 beta
IL-6 - Interleucina 6
IL-10 - Interleucina 10
JNK - *c-Jun N-terminal quinase*
KDa - Kilodalton
KHS - solução de Krebs-Henseleit modificada
KLF-5 - Fator de transcrição Kruppel-like factor 5
M - molar
M/L - Camada Média/Lúmen
MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno
MASP - Proteínas séricas associadas à serina
MBL - Lectina de ligação à manose
MEC - Matriz Extracelular
MyD88 - Resposta primária de diferenciação mieloide 88
mg - Miligramas
mmHg - Milímetros de Mercúrio
MMP - Metaloproteinases de Matriz
MMP-2 - Metaloproteinases de Matriz Tipo 2
MMP-9 - Metaloproteinases de Matriz Tipo 9
mM - Mili Mol
mL - Mililitro
n - número experimental
NADPH - Nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato
NaF - Fluoreto de Sódio
NF-κB - factor nuclear kappa B

O₂ - Oxigênio
OCT - temperatura de corte ideal
ONOO⁻ - Peroxinitrito
PAD - Pressão Arterial Diastólica
PAS - Pressão Arterial Sistólica
PBS - solução salina tamponada com fosfato
 pD_2 - logaritmo negativo da concentração efetiva do agonista que produz 50% do efeito máximo
pH - potencial de hidrogênio iônico
PMN - Polimorfonucleares
PMX-53 - Antagonista do receptor de C5aR
PRR's – moléculas de reconhecimento de padrão
PRCGVPD - grupo cisteína sulfidril do pró-peptídeo
PVR - Núcleo para ventricular
Rag 1 - Gene ativador de recombinação 1
RIPA - Tampão do ensaio de radioimunoprecipitação
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio
rpm – Rotações por minuto
SDS - Dodecil-sulfato de sódio
SEM - Erro Padrão da Média
Sham - Animal Submetido a Cirurgia Fictícia
SHR - Ratos espontaneamente hipertensos
SFB - Soro Fetal Bovino
SNS - Sistema Nervoso Simpático
TRL - Receptores Toll-Like
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
Treg - Linfócitos T reguladores
WT - camundongo tipo selvagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Hipertensão arterial e inflamação	22
1.2	Ativação do sistema complemento na hipertensão	24
1.3	Células do sistema imune e seu envolvimento na HAS	27
1.4	Metaloproteinases de Matriz	29
2	HIPÓTESE	33
3.	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo geral.....	35
3.2	Objetivos específicos	35
4.	MATERIAL E MÉTODOS	37
4. 1	Animais	37
4.2	Delineamento Experimental.....	37
4.3	Avaliação da Pressão Arterial Sistólica	38
4. 4	Determinação da pressão arterial invasiva	38
4.5	Ensaio imunoenzimático para C3a no plasma	38
4.6	Dosagem de Proteínas pelo Método de Bradford	39
4.7	Western Blot para detectar a expressão do C3aR e NF-kB nas aortas.....	39
4.8	Avaliação da atividade da MMP-2	40
4.8.1	Zimografia em gel	40
4.8.2	Zimografia <i>in situ</i>	41
4.9	Determinação vascular das Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) por DHE	41
4.10	Curva concentração-efeito para fenilefrina e acetilcolina nas aortas por miografia de fio	41
4. 11	Ensaio de imunoabsorção enzimática para TNF- α , IL-10 e IL-6	42
4. 12	Citometria de Fluxo	43
4. 13	Análise do remodelamento vascular	43
4.14	Análise Estatística.....	44
5	RESULTADOS	46
5.1	Tratamento com o antagonista de receptor de C3a parece não restaurar a PAS elevada na hipertensão por Ang II	46
5.2	Hipertensão por Ang II aumenta concentrações plasmáticas de C3a.....	47

5.3 O tratamento com SB290157 não altera o perfil proteico do receptor de C3a.	48
5.4 O tratamento com o SB290157 reduz as concentrações de EROs nas aortas dos animais hipertensos	49
5.5 O tratamento com SB290157 não reduz a quantidade aumentada de linfócitos T efetores nos rins dos animais hipertensos.....	50
5.6 O tratamento com SB290157 reduz a quantidade aumentada de IL-6 nos rins dos animais hipertensos	52
5.7 O tratamento com o antagonista não alterou a quantidade proteica de NF-kB na aorta	52
5.8 O tratamento com o SB290157 reduziu a atividade acentuada da MMP-2 na aorta dos camundongos hipertensos.....	53
5.9 O tratamento com o SB290157 reduziu a atividade gelatinolítica acentuada na aorta dos camundongos hipertensos.....	55
5.10 Aumento da atividade gelatinolítica correlaciona-se positivamente com a quantidade de EROs nas aortas dos camundongos hipertensos	56
5.11 O tratamento com SB290157 reduziu a área de secção transversal da aorta que estava aumentada nos camundongos hipertensos.....	56
5.12 O tratamento com SB290157 não melhora a hipercontratilidade da aorta nos camundongos hipertensos.....	57
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXOS	85

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão arterial e inflamação

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é definida por um aumento contínuo da pressão arterial e é considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de outras doenças cardiovasculares como insuficiência cardíaca, cardiomiopatias e doenças dos sistemas coronariano e cerebrovascular. Entre 1990 e 2019, o número de pessoas com HAS e prescrição para anti-hipertensivos foi de 650 milhões para 1,3 bilhões (78) e mais de 75% dos adultos com HAS residiam em países de renda baixa e média (45). Há vários mecanismos que podem contribuir para o desenvolvimento da HAS. A HAS é caracterizada pelo aumento da pressão arterial em níveis sustentados acima de 130 mmHg para a pressão arterial sistólica (PAS) e 80 mmHg para a pressão arterial diastólica (PAD). Tais valores são usados para pacientes que realizam a medição da pressão arterial em casa, sem monitoramento. No consultório, como há um período de espera, a pressão arterial se mantém mais estável e os valores de referência continuam sendo 140 por 90 mmHg (1).

O desenvolvimento da HAS pode ser causado por vários mecanismos fisiopatológicos, como anormalidades renais, desregulação do sistema nervoso central e disfunção das células endoteliais. Diversos fatores secretados por diferentes tipos de células estão envolvidos no aparecimento da inflamação e estes podem ativar respostas imunes importantes na HAS (46). Tanto a inflamação como a resposta imune inata e adaptativa exercem um papel importante no desenvolvimento da HAS e dos danos aos órgãos-alvos (2,3), de modo que pacientes com inflamação crônica apresentam aumento do risco cardiovascular (3), enquanto que pacientes hipertensos apresentam concentrações plasmáticas elevadas de citocinas pró-inflamatórias (4). Além disso, sabe-se que a inflamação de baixo grau é um mediador importante para a elevação da pressão arterial, podendo associar a HAS com as doenças inflamatórias crônicas (5).

O aumento das respostas imunológicas inatas frente ao estímulo hipertensivo pode ativar receptores do tipo Toll (TRL) na vasculatura, que contribuem para o aumento do estresse oxidativo e o remodelamento vascular. O TLR4 é o TLR mais estudado na hipertensão entre os treze receptores identificados. Este receptor desencadeia resposta inflamatória por meio da ativação de duas vias: 1) dependente da proteína 88 de resposta primária à diferenciação mieloide (MyD88), que ocorre

durante o estágio inicial da ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e resulta na produção de citocinas inflamatórias; e 2) as vias independentes de MyD88, que ocorrem durante o estágio final da ativação do NF- κ B, e ativa o fator regulador de interferon (IFN)-3, induzindo expressão de genes induzidos por IFN. A figura 1 mostra que a angiotensina II (Ang II), via atuação em receptores AT₁, regula positivamente o TLR4 no sistema nervoso central, rins e sistema cardiovascular, contribuindo para ativação da MyD88. Esta via pode acionar MAPKs, como ERK1/2 e JNK, que induz a ativação de NF- κ B e EROs. Por fim, EROs estimulam a liberação de mediadores pró-inflamatórios, o que, por sua vez, contribui para a hipertensão (48). Além de reconhecer patógenos, o TLR4 também induz a expressão de componentes do sistema complemento, como o C3a e C5a, contribuindo ao aumento da sua atividade no ambiente pró-inflamatório (6,7). Assim, o bloqueio farmacológico do TLR4 pode diminuir a inflamação e estresse oxidativo no sistema nervoso central, rins e coração, o que reduz os efeitos da HAS e diminui os danos aos órgãos-alvos.

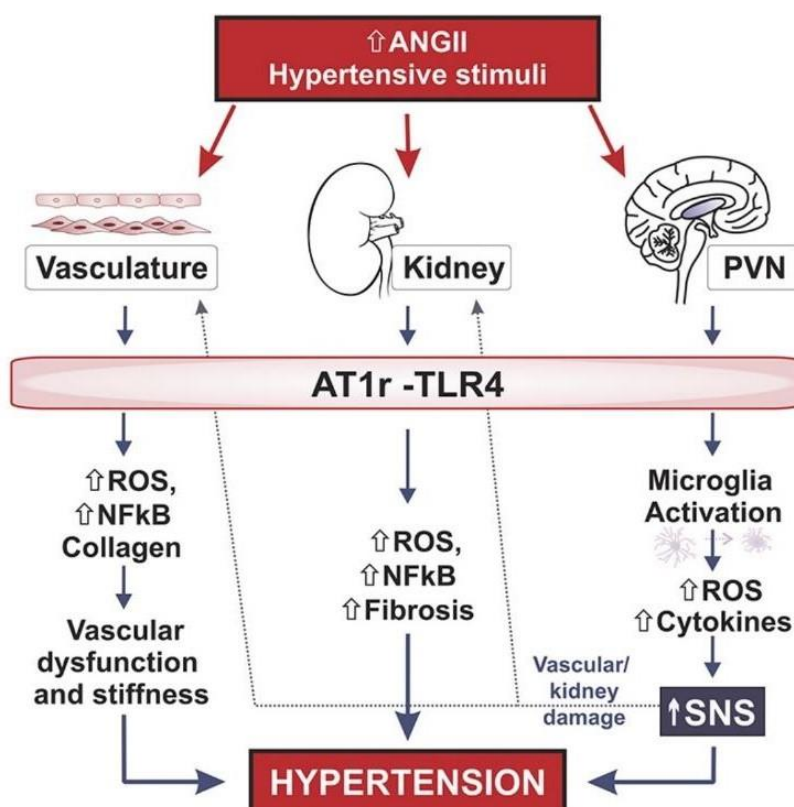


Figura 11- Angiotensina II-TLR4: vias de sinalização que medeiam a inflamação durante a hipertensão. A ang II age por meio dos receptores AT₁, que regulam positivamente o TLR4, com consequente ativação da via MyD88 (não mostrado). Esta via aciona diferentes MAPKs, como ERK1/2 e JNK, que induzem a ativação de NF κ B e EROs (ROS). Por fim, EROs estimulam a liberação de mediadores pró- inflamatórios, o que, por sua vez, contribui para a hipertensão. A Ang-II também age na vasculatura, causando disfunção contrátil, o que piora o quadro de hipertensão. Ademais, atua no núcleo

paraventricular (PVN), estimulando o aumento das EROs e da produção de citocinas, o que contribui ao tônussimpático, levando a hipertensão (48).

1.2 Ativação do sistema complemento na hipertensão

O sistema complemento é reconhecido como uma rede proteica complexa que atende principalmente às funções imunes inatas. A super ativação deste sistema pode causar autoimunidade, inflamação e lesão tecidual (49). O sistema complemento é ativado por três vias distintas. A primeira via, conhecida como via clássica, se inicia quando complexos antígeno-anticorpo se ligam à proteína C1q no plasma. A região Fc dos isotipos de anticorpos IgG e IgM, proteína C reativa ou até mesmo componente amiloide P sérico se ligam nas regiões globulares da C1q, iniciando a ativação do sistema. Células apoptóticas e as proteínas de superfície de bactérias e vírus também podem se ligar a essas regiões globulares da C1q. Esses fatores causam mudança conformacional na proteína C1(q, r, s), que pode clivar os outros componentes da cascata do complemento (49, 50). Esta via clássica também pode ser ativada na hipertensão. A infusão de Ang II em camundongos contribui para o recrutamento de macrófagos para a aorta, onde secretam o componente C1q, iniciando a cascata (50). Na seção abaixo, serão discutidas as hipóteses do porque o complemento é ativado durante a hipertensão.

A segunda via, ou via da lectina, é semelhante a via clássica, com exceção de utilizar moléculas de reconhecimento ao invés de anticorpos para o reconhecimento do alvo. Inicia-se quando receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) se ligam nos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como D-manose e grupos acetil na superfície de patógenos, células necróticas ou apoptóticas. Os PRRs da via da lectina podem ser a lectina de ligação à manose (MBL), proteínas séricas associadas à serina (MASP)-1, 2 e lectinas oligoméricas, como as ficolinas (1-3). A MBL é estruturalmente semelhante à C1q, com uma região semelhante ao colágeno e cabeças globulares. As cabeças globulares do MBL são domínios de lectina do tipo C específicos para repetir estruturas de carboidratos encontradas em microrganismos. Tal como C1q, MBL e as ficolinas são complexadas com uma MASP, que é estrutural e funcionalmente semelhante a C1r e C1s. MASP-1 e -2 são proteases ativas, mas apenas a MASP-2 cliva o C4 e C2. Isso permite a montagem das conversões de C3 e C5 e a geração de C3a e C5a, duas anafilatoxinas pró-inflamatórias que aumentam a resposta inflamatória. O fragmento C3b se liga covalentemente a grupos hidroxila

e amino na superfície de moléculas-alvo das três vias. Na ausência de proteínas reguladoras do complemento, ocorre amplificação no número de moléculas de C3b ligadas à superfície por meio da via alternativa (79-81).

Por fim, diferentemente das vias de ativação do complemento clássica e da lectina, a via alternativa é acionada pela hidrólise espontânea de C3, e não por uma proteína de ligação ao patógeno (52). O plasma é rico em C3, e a clivagem espontânea, ou "tickover", produz C3b em taxa considerável. O processo envolve a hidrólise espontânea da ligação tioéster em C3 para formar C3_iBb. Esse complexo é uma convertase de C3 em fase fluida e embora seja formado em poucas quantidades, pode clivar muitas moléculas de C3 em C3a e C3b (52, 82).

Independente de qual via a ativação do sistema complemento aconteça, todas convergem na degradação do componente C3, que se dividirá em C3a e C3b. O C3a se liga em seu receptor C3aR, localizado em diferentes tecidos e células do sistema imune, e o C3b contribui na formação do complexo de ataque a membrana (MAC). As vias de ativação do complemento podem ser vistas na Figura 2, produzida por Shughoury (2023) (51-53).

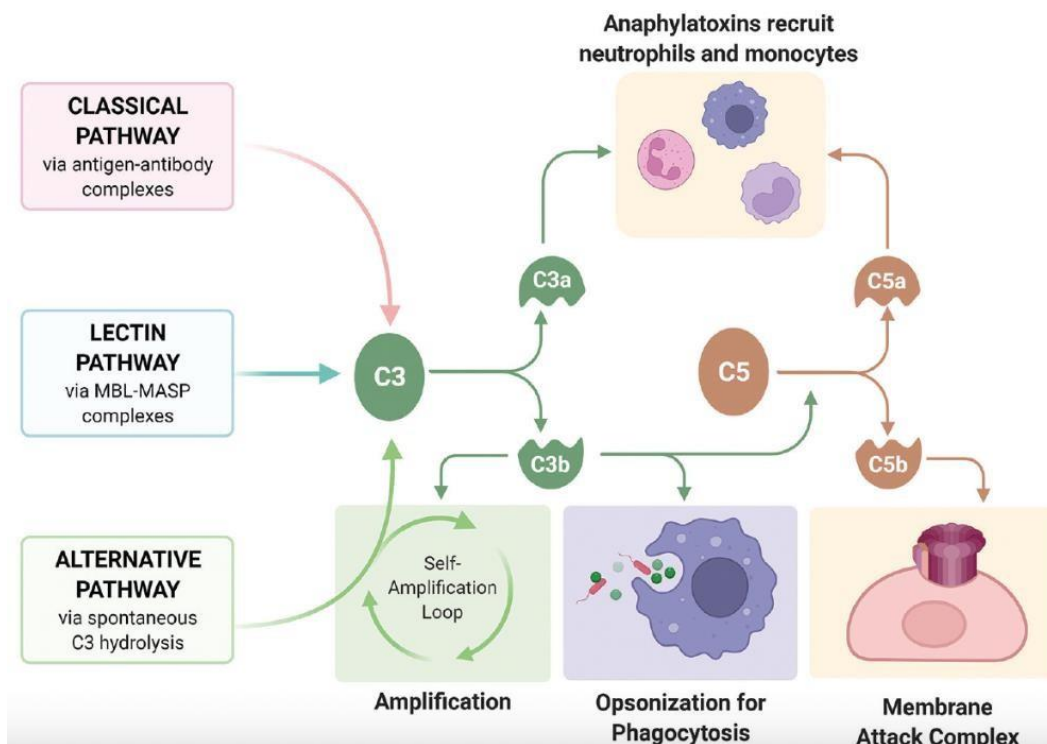


Figura 12 - Três vias diferentes compõem a ativação do sistema complemento. Os complexos anticorpo-antígeno que envolvem IgG ou IgM ativam a via clássica. A hidrólise lenta e espontânea de C3 ativa continuamente a via alternativa, necessitando de inibição contínua por proteínas reguladoras

endógenas para mantê-la sob controle. A identificação de carboidratos específicos em superfícies microbianas dá início à via da lectina (53).

Quando a pressão arterial se eleva, o sistema complemento também é ativado. A infusão de Ang II em camundongos aumenta as concentrações plasmáticas de C3a e C5a, que se ligam aos seus receptores C3aR e C5aR presentes no coração, linfócitos e células do músculo liso, causando disfunção (56). As células do sistema imune, como linfócitos e monócitos, por exemplo, produzem citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL)-6 e o fator de necrose tumoral (TNF)- α , que podem contribuir na disfunção cardiovascular (55, 56). Estudos usando camundongos knockouts para C5aR1 mostraram melhora no perfil inflamatório e no remodelamento cardíaco. O mesmo efeito foi observado quando estes camundongos tiveram a produção de C5a reduzida pelo uso farmacológico de anticorpo monoclonal anti-C5 ou pelo antagonista do receptor de C5aR, o PMX53. O tratamento de ratos hipertensos pelo modelo de infusão de acetato de desoxicorticosterona (DOCA) e sal com PMX53 melhorou a função endotelial da aorta e reduziu os danos cardíacos (54).

Por outro lado, o C3a endógeno também aumenta a proliferação das células musculares lisas vasculares (CMLVs) e a produção de Ang II em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). A inibição de C3aR com o antagonista SB290157 reduz a expressão gênica do fator de transcrição Kruppel-like (KLF-5) e conseqüentemente a proliferação celular (16). Em ratas grávidas, a administração endovenosa do antagonista de C3aR, SB290157, por curto período de tempo, é capaz de inibir o aumento de pressão arterial em resposta ao peptídeo C3a (17). Além disso, o C3a induz o aumento da formação de superóxido, dependente de NADPH oxidase em cultura de células tubulares proximais. Esse efeito também é observado *in vivo*, durante a isquemia e reperfusão renal, ou seja, a NADPH oxidase é ativada de maneira dependente ao sistema complemento, desempenhando papel fundamental na geração de EROs (18). Tal complexidade de eventos pode contribuir com o aumento da pressão arterial. Já foi observado em estudo clínico e experimental, usando ratos SHR e DOCA sal, que as concentrações plasmáticas de C3 e C3a estão associados ao desenvolvimento da hipertensão (89-91). Já que o C3 é comum às três vias de ativação do complemento, o avaliamos usando a ferramenta farmacológica SB290157, que é um antagonista de receptores de C3aR a uma dose de 1mg/kg/dia. Tal dose foi escolhida visando reduzir o efeito *off-target* do fármaco ao receptor C5aR, haja vista que uma dose maior pode agir como agonista deste receptor, podendo aumentar o perfil inflamatório (110).

1.3 Células do sistema imune e seu envolvimento na HAS

A presença de células imunes, como linfócitos T, que expressam os receptores do complemento em sua superfície e que podem infiltrar-se nas artérias e rins também são protagonistas no que tange as alterações cardiovasculares da hipertensão (Figura 3). Camundongos knockouts para o gene do ativador de recombinase ($Rag-1^{-/-}$; linhagem desprovida de células T e B) apresentam pressão arterial reduzida após infusão de Ang II. Em contrapartida, a transferência adotiva de células T, mas não de células B, para estes camundongos resulta na restauração da resposta hipertensiva, sugerindo células T como essenciais ao desenvolvimento da hipertensão (55).

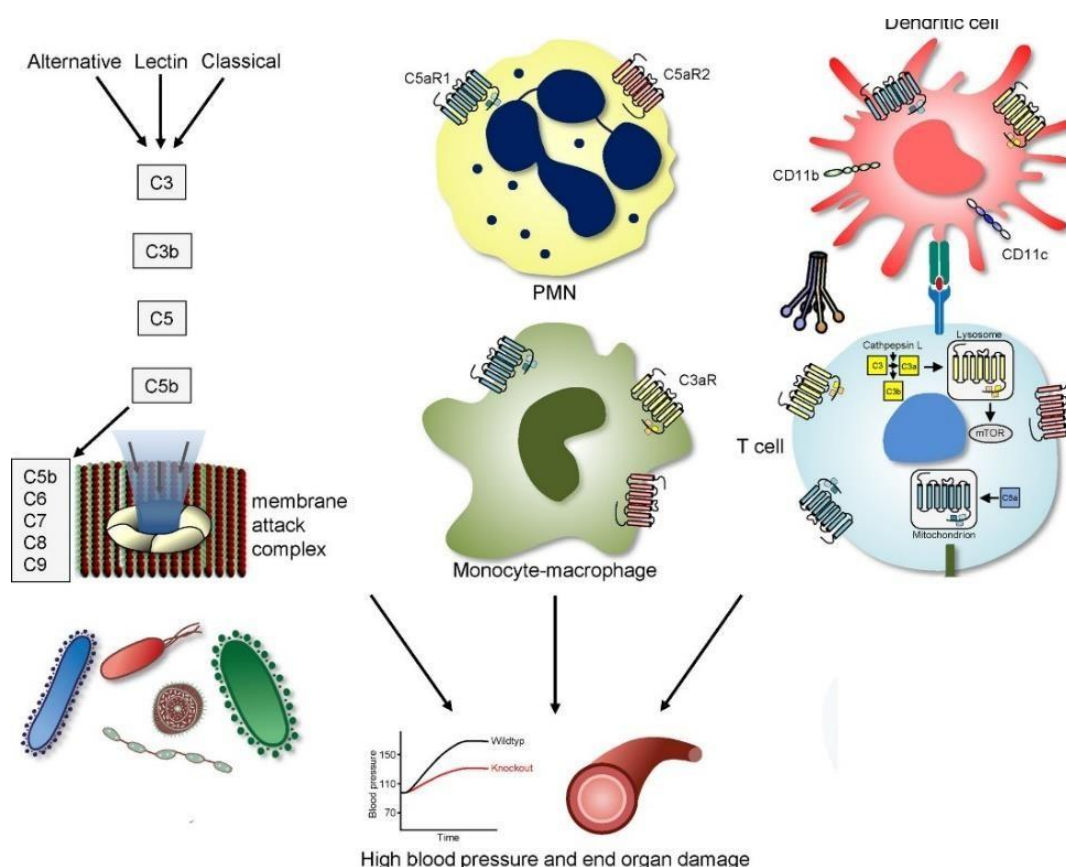


Figura 13 - Células imunes e a ativação do complemento contribuem para o aumento da pressão arterial. Após a ativação do complemento, o C5b-9 promove a lise de patógenos, mediada pelo complexo de ataque à membrana (MAC). Além disso, os neutrófilos e os monócitos/macrófagos são finamente moldados pelo complemento e seus receptores aumentando sua população. A expressão de CD11c, um componente do receptor de complemento 4, é indicativa de células dendríticas. Os receptores de C3a e C5a são expressos na superfície e em vários compartimentos intracelulares das células T, podendo causar inibição da função CD4+Foxp3+ (Adaptado) (56).

Os linfócitos T efetores, juntamente com os monócitos e macrófagos, podem ser expressos e entrarem em uma relação de desequilíbrio com a quantidade de células anti-inflamatórias, como linfócitos T reguladores (Treg). Isto pode facilitar a

ocorrência de lesão vascular na hipertensão, sobretudo por produzirem quantidades significativas de citocinas pró-inflamatórias. As Tregs são uma subpopulação de células T que expressam o fator de transcrição *forkhead box P3* (Foxp3) e apresentam função imunossupressora sobre linfócitos T efetores, bem como efeitos protetores contra o aumento da pressão arterial induzida por Ang II, como a produção de (IL)-10 (8–10). Por outro lado, a infusão de Ang II em camundongos resulta na diminuição de Tregs, enquanto que a transferência de Tregs para estes animais previne a HAS, o aumento da atividade da NADPH oxidase e o prejuízo do relaxamento vascular em resposta à acetilcolina (8). Portanto, sabendo que mecanismos imunológicos modulam o aumento de pressão arterial e danos aos órgãos-alvos, e que as Tregs contribuem para prevenir esses efeitos (8), essas células podem ser alvos para intervenção farmacológica na HAS.

Um dos fatores que reduzem a quantidade e função das Tregs é o componente C3a e C5a do sistema complemento, visto que o duplo *knockout* para C3aR e C5aR aumenta a expressão de Foxp3 e seu papel imunossupressor na hipertensão (11). O C3a e o C5a são produtos ativos da clivagem de C3 e C5 pelas C3 e C5 convertases e interagem com receptores C3aR e C5aR, acoplados à proteína G, nas CMLVs, aumentando a proliferação, por exemplo (12–14). O aumento de C3a plasmático em modelos animais de hipertensão DOCA sal e via infusão de Ang II pode reduzir a expressão de Foxp3, via sinalização por C3aR, inibindo a ação imunossupressora das Tregs (15).

Um estudo mostrou que há aumento de MMP-2 nas CMLVs durante a dissecação da aorta torácica no aneurisma (34); entretanto, os mecanismos que interligam o C3a/C3aR e a MMP-2 ainda precisam ser explorados. A ativação do NF- κ B, que pode ocorrer após aumento das concentrações de células inflamatórias e que regula a transcrição de vários genes de citocinas pró-inflamatórias, pode ser um dos links entre o C3a e a MMP-2. Durante a hipertensão mediada pela Ang II ou em ratos SHR, o NF- κ B é ativado e transloca-se do citoplasma ao núcleo, onde regula a expressão de genes, como o da MMP-2 (84). As MMPs como a MMP-1, -2 e -9 possuem regiões promotoras como a região AP-1, em sua estrutura que responde de forma rápida a uma grande variedade de sinais e que podem ser moduladas pelo NF- κ B (59, 114). Como mencionado anteriormente, o sistema complemento também tem relação direta com estresse oxidativo, que por sua vez,

também contribui com o aumento da expressão e/ou atividade da MMP-2 na vasculatura durante a hipertensão (35).

1.4 Metaloproteinases de Matriz (MMPs)

As MMPs são endopeptidases dependentes de zinco, sintetizadas com um pró-peptídeo auto inibitório ligado ao sítio catalítico por uma ligação sulfidrila. Existem mais de 25 tipos de MMPs. Dentre elas, a MMP-2 (72 kDa) caracteriza-se como gelatinase e têm contribuição expressiva no remodelamento vascular da hipertensão e outras doenças cardiovasculares (25, 59). Além dos domínios comuns às MMPs como o pro-peptídeo, o domínio catalítico ligado ao zinco, a região de articulação e o domínio hemopexina, as gelatinases possuem domínio fibronectina-*like*, responsável pela interação e proteólise de alguns componentes da matriz extracelular, como o colágeno tipo IV, por exemplo (25).

A expressão proteica e atividade da MMP-2 podem ser moduladas por várias vias, desde transcricionais até por inibição da sua atividade pela ação dos inibidores teciduais de MMPs, os TIMPs. O NF- κ B é um fator de transcrição, que como dito anteriormente, pode contribuir para o aumento de expressão da MMP-2. O estresse oxidativo também pode contribuir para o aumento da MMP-2, já que animais knockouts para p47phox da NADPH oxidase reduz a expressão gênica e a atividade da MMP-2 nas artérias na hipertensão (111).

A MMP-2 pode ser ativada por duas vias: a proteolítica e não proteolítica. A via proteolítica, que é extracelular, consiste na clivagem do pró-peptídeo e exposição do sítio catalítico da MMP-2, convertendo-a de 72 em 64 kDa. Esta forma de 64 kDa pode degradar os componentes da matriz extracelular e participar do remodelamento tecidual fisiopatológico, seguida pela resíntese proteica e hipertrofia celular (29). A forma de ativação não proteolítica, por sua vez, baseia-se em uma modificação pós-translacional e consiste na reação do peroxinitrito com a ligação sulfidrila do pró-peptídeo, na presença de glutathione, deslocando o pró-peptídeo e expondo o sítio catalítico (26). Essa reação, chamada de S-glutatioilação, pode ser um evento chave na ativação intracelular da 72 kDa MMP-2 (26–28) (Figura 4). Esta ativação pode resultar na proteólise de proteínas da maquinaria contrátil, como a calponina-1, incitando a proliferação e migração das CMLVs na hipertensão (26,30–32).

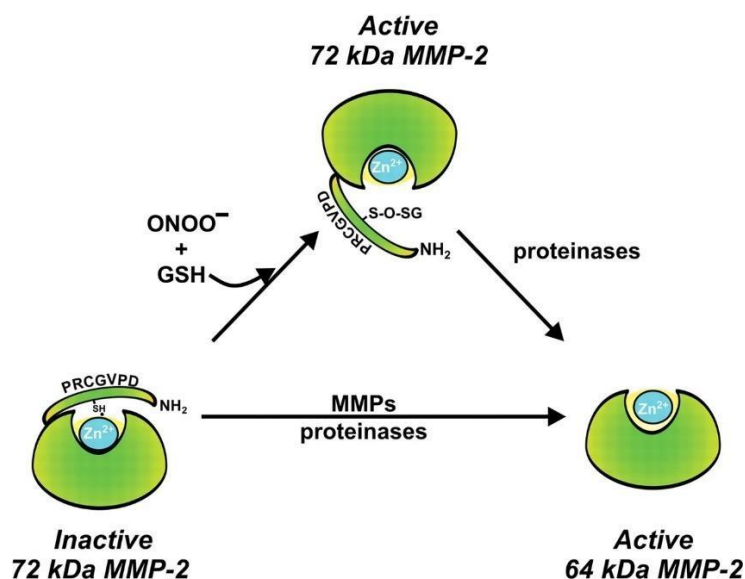


Figura 14- Mecanismo de ativação proteolítica e não proteolítica da MMP-2. A figura mostra a clivagem da ligação entre a sulfidrina (-SH) do pró-peptídeo e o zinco Zn^{2+} do sítio catalítico da MMP-2 (72 kDa), resultando na forma ativa de 64 kDa no meio extracelular. A figura também mostra que o $ONOO^-$ e a glutatona celular (GSH) reagem com o grupamento sulfidrina do pró-peptídeo (PRCGVPD) da MMP-2, deslocando-o e permitindo que ela fique ativa na forma molecular de 72 kDa (57).

A ativação da MMP-2 favorece sua ação no remodelamento mal adaptativo das artérias em resposta ao aumento da pressão. O remodelamento arterial hipertrófico é caracterizado pelo aumento da espessura da camada média da aorta, por causa da proliferação e migração acentuada das CMLVs, resultando no aumento da razão média por lúmen (M/L) e da área de secção transversal (CSA) (25,32). Inibindo a ação da MMP-2 com doxiciclina, por exemplo, reduz o remodelamento aórtico hipertrófico e o aumento da deposição de proteínas da matriz, como o colágeno e a elastina (112). Diversos modelos animais de hipertensão mostram aumento da expressão e atividade da MMP-2 nas artérias de resistência e de condutância. Esta atividade proteolítica aumentada pode contribuir ao aumento da capacidade de resposta das artérias à constritores, como a fenilefrina, já que este efeito também é inibido por inibidores de MMPs (85). Estudos também mostraram que camundongos knockouts para MMP-2 apresentaram melhora na disfunção endotelial causada pela infusão de Ang II (86). A MMP-2 pode clivar outros alvos proteolíticos independentes da matriz extracelular. A MMP-2 pode clivar pró-domínios de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , contribuindo para sua ativação e participação no remodelamento vascular (107, 108). Interessantemente, a própria IL-1 β pode contribuir para o aumento da expressão da MMP-2 na sepse e outras doenças cardiovasculares (113). A MMP-2 também tem como alvo a big-endorfina-1, que é clivada em endorfina-1, um potente

vasoconstrictor que está aumentado em processos hipertensivos (115). A MMP-2 também contribui para vasoconstrição ao clivar e destituir a ação de um neuropeptídeo vasodilatador, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), inibindo assim a vasodilatação dependente de CGRP (116).

Já a MMP-9 também é uma gelatinase com cerca de 70% de homologia com a MMP-2 e tem seus mecanismos de ativação semelhantes (73, 100). No entanto, sua expressão e atividade são induzidos por mecanismos inflamatórios (101), enquanto a MMP-2 também é constitutiva. A MMP-9 pode clivar quimiocinas como MCP-1, -3 e CXCL-5, -8, que são importantes para o recrutamento de neutrófilo e macrófagos nas mais diversas fisiopatologias, como a pneumonia e a sepse (102, 103).

Assim, a ativação do C3a do complemento pode contribuir para o aumento da atividade da MMP-2 na vasculatura na hipertensão, seja pelas ações das citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo, seja pelo aumento de NF- κ B, configurando-se como possível alvo terapêuticos na HAS.

Hipótese

2 HIPÓTESE

O aumento no sistema complemento, principalmente o C3a, contribui para aumentar estresse oxidativo, reduzir Tregs e aumentar expressão e atividade da MMP-2 na aorta, resultando no remodelamento mal adaptativo da hipertensão.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar se o aumento do C3a decorrente da HAS e aumenta a expressão e atividade da MMP-2 em aortas de camundongos infundidos com Ang-II, além do estresse oxidativo, e da redução da quantidade de Tregs, favorecendo o remodelamento mal adaptativo. Ademais, se o uso do antagonista do receptor de C3a atenua tais eventos.

3.2 Objetivos específicos

- verificar se a inibição da sinalização de C3a pelo receptor C3aR reduz Tregs nos rins e causa estresse oxidativo nas artérias de camundongos infundidos com Ang II;
- verificar se o aumento de C3a aumenta a atividade e expressão de MMP-2 nas artérias de camundongos infundidos com Ang II;
- verificar se o aumento de C3a aumenta a expressão de NF-kB e do receptor de C3a como parte integrante desta cascata de sinalização;
- analisar se estes efeitos bioquímicos contribuem para o remodelamento arterial da HAS, e se o antagonista de C3a previne essas alterações;
- analisar se estes efeitos bioquímicos contribuem para a disfunção das aortas frente a estímulos de contração e relaxamento;
- analisar os níveis de C3a plasmático no modelo estudado.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6. Esses animais foram provenientes do biotério central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP) e mantidos no Biotério de Manutenção e Experimentação do Departamento de Farmacologia da FMRP. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da FMRP-USP (1404/2023).

4.2 Delineamento Experimental

A hipertensão foi induzida nos camundongos após implantação subcutânea de minibombas osmóticas contendo Ang II a 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, que foi infundida por 14 dias conforme a figura 5. Nos animais controles foi feito apenas uma incisão, sem a implantação da minibomba. Os animais foram tratados com o antagonista do receptor de C3a, o SB290157, a 1 mg/kg (dissolvido em 0,02% de DMSO) via intraperitoneal, a cada dois dias, a partir da implantação das minibombas. Na segunda semana pós-tratamento, os animais foram eutanasiados para a coleta da aorta, plasma e rins.

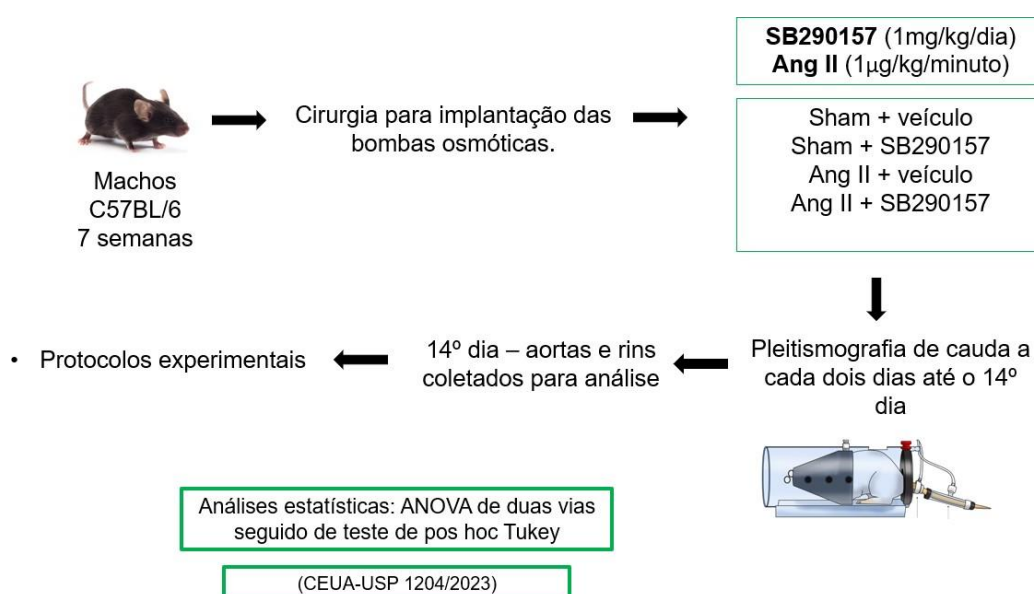


Figura 5 - Esquema para visualização da metodologia utilizada.

4.3 Avaliação da Pressão Arterial Sistólica (PAS)

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

4.4 Determinação da pressão arterial invasiva

Os animais foram anestesiados com uma mistura de isoflurano 2% e O₂, e os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições assépticas. Os animais foram colocados em decúbito dorsal e foi feita incisão femoral. Cateteres de polietileno (Clay-Adams, Northridge, CA) foram implantados na artéria femoral direita para medição da pressão arterial. Os cateteres foram preenchidos com solução salina heparinizada (100 UI/mL), tampados e tunelizados por via subcutânea até a nuca. Após procedimento, os animais foram deixados em recuperação por 24 h. As medições da pressão arterial foram realizadas em animais conscientes em suas próprias gaiolas, 24 h após a cirurgia. O cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (MLT0380/D, AD Instruments, Sydney) e o sinal AP foi amplificado (ML110, AD Instruments, Sydney), alimentado em um IBM/PC conectado a um Power Lab (ML866, AD Instruments, Sydney, Austrália) a 2 kHz.

4.5 Ensaio imunoenzimático para C3a no plasma

Para realizar o ELISA de C3a presente no plasma, foi utilizado um kit específico (NBP2-70037; Novus Biologicals). Foi adicionada a solução padrão às duas primeiras colunas das placas, cada concentração foi adicionada em duplicata, em um poço de cada vez, lado a lado (100 µL para cada poço). As amostras foram adicionadas aos outros poços da placa. A placa foi coberta com o vedante fornecido no kit e incubada durante 90 min a 37°C. Foram adicionados 100 µL do anticorpo de detecção biotinilado a cada poço, coberto com o selador de placa e misturado suavemente. Após isso,

houve incubação durante 1 h a 37°C. A solução de cada poço foi aspirada e foram adicionados 350 µL de tampão de lavagem. A placa foi deixada de molho durante 2 min e foi aspirada a solução de cada poço e secada com papel absorvente limpo. Esta etapa foi repetida por 3 vezes. Foram adicionados 100 µL de anticorpo conjugado HRP a cada poço e cobertos com a tampa da placa e incubadas durante 30 min a 37°C. A solução de cada poço foi aspirada novamente e foram adicionados 350 µL de tampão de lavagem. Logo após, foram adicionados 90 µL do reagente de substrato a cada poço, cobertos com o novo vedante e incubado por 15 min a 37°C. Ao final, foram adicionados 50 µL de solução de parada a cada poço e foi determinada a densidade óptica de cada poço de uma só vez com uma microplaca regulada para 450 nm (Novus Biologicals).

4.6 Dosagem de Proteínas pelo Método de Bradford

Antes de efetuar zimografia e western blotting, foi necessário dosar as proteínas das amostras para evitar variações proteicas inerentes a cada tecido. O método de Bradford é uma técnica que tem como objetivo determinar as proteínas totais dos tecidos. As aortas foram trituradas e homogeneizadas em tampão de extração de proteínas (NaF 10 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, inibidor de protease 1X e RIPA q.s.p) por 18 h. Os extratos foram centrifugados por 10 min, a 13.000 rpm e a 4°C. Os sobrenadantes foram retirados e colocados no freezer -80°C para determinação proteica. Os valores foram obtidos após a leitura por espectrofotometria (Espectrofotômetro Synergy H1 Microplate Reader, BioTek), para que fosse possível normalizar a quantidade que foi aplicada nas técnicas bioquímicas.

4.7 Western Blot para expressão proteica do C3aR e NF-κB nas aortas

Extratos de aorta (20 µg de proteína para cada amostra) foram misturados a um tampão redutor (0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 30% de glicerol, 0,6 M DTT, 10% de dodecil sulfato de sódio e 0,179 mM de azul de bromofenol), aquecidos por 5 min a 95°C e carregados em géis de 10% de poliacrilamida. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, Alemanha) usando um aparelho de transferência úmida (#TE22 Mini Tank Transfer Unit, GE Healthcare, Germany) a 100 V por 1 h e 15 min ou por meio de um sistema semi-seco de transferência *Trans-Blot* (*Turbo Transfer System- BioRad*) a 25 V, 1.0 A, 30 min, em

tampão de transferência (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%). As membranas foram bloqueadas por 2 h com 5% de leite diluído em solução salina tamponada com Tris e Tween 20 (TBS-T) e incubadas por 16 h a 4°C com os seguintes anticorpos primários: *mouse anti-C3aR* (1:3.000 #ab126250, Abcam EUA; *rabbit anti-Phospho-NF-κB p65 (Ser536) (93H1)* (1:1000) *mAb* #3033; *rabbit anti-NFκB p65 (H-286)*: sc-7151). Em seguida, as membranas foram incubadas com seus respectivos anticorpos secundários (1:10.000, #A0545 Sigma; #A9044 Sigma) por 1 h a temperatura ambiente. Após isto, as membranas foram lavadas em TBS-T por 3 vezes de 5 min e reveladas. As bandas foram visualizadas por quimioluminescência (#32106, ThermoFisher Scientific, EUA) com o fotodocumentador *Amersham Imager 600* (GE Healthcare, Alemanha). As intensidades de quimioluminescência de cada banda foram quantificadas pelo *Image J* (NIH, Bethesda, MD, EUA).

4.8 Avaliação da atividade da MMP-2

4.8.1 Zimografia em gel

A zimografia em gel é a técnica utilizada para avaliar a atividade das MMPs. Especificamente a MMP-2 e a MMP-9 podem degradar a gelatina do gel durante a eletroforese. As amostras foram previamente preparadas, aplicadas em géis de poliacrilamida 8% e separadas por eletroforese, conforme a técnica de SDS-PAGE. Após este processo, os géis foram submetidos a dois banhos de Triton X-100 para remoção do SDS e colocados em solução de incubação Tris-HCl/CaCl₂/NaCl (50mM Tris, 5 mM CaCl₂.2H₂O, 150 mM NaCl, pH 7,6) por 16 h na estufa à 37°C. Posteriormente, foram corados em solução Coomassie Blue (metanol 25%, ácido acético 10% e Coomassie Blue G-250 0,05%) e em seguida descorados com solução descorante (metanol 25% e ácido acético 7%) para visualização da banda de 72 e 64 kDa da MMP-2, e 89 kDa MMP-9. Dessa forma, foi observado a formação de bandas claras contra o fundo azul escuro do Coomassie (devido a degradação da gelatina incorporada ao gel). Para cada gel foi utilizado um controle positivo (Soro Fetal Bovino). Por ele, é possível normalizar as quantidades de proteínas obtidas entre os géis, podendo compará-los entre si. A quantificação das bandas de 72 e 75 kDa da MMP-2 além da banda de 89 kDa da MMP-9 foram feitas pelo *Image J*.

4.8.2 Zimografia *in situ*

A zimografia *in situ* é uma técnica de fluorescência utilizada para avaliar a atividade das gelatinases, utilizando o substrato DQ gelatina (#D12054, Invitrogen). Aortas foram incluídas em Tissue-Tek (O.C.T), cortadas no criostato em secções de 5 µm de espessura e incubadas com substrato fluorogênico DQ gelatina, em tampão Tris-CaCl₂ na estufa, à 37°C por 1 h. Os cortes foram lavados em tampão salina fosfato (PBS) e fixados em formalina tamponada 4%. As imagens dos cortes foram fotografadas (400x) por microscópio de fluorescência (Leica CTR 6000 Fluorescence Microscope; em nm: excitação: 495, emissão: 515). O software ImageJ foi usado para quantificar a fluorescência. Na lâmina que representa o animal, foram fotografadas três áreas diferentes de um mesmo corte de aorta e em cada uma das áreas foi realizada a quantificação da intensidade da fluorescência verde por 40 campos selecionados ao redor da circunferência do vaso. A intensidade de fluorescência desses campos foi usada para calcular a média aritmética da fluorescência de cada lâmina. Como controle negativo, não houve incubação com DQ, apenas a lavagem com PBS.

4.9 Determinação vascular das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) por DHE

Diidroetídio (DHE) foi utilizado para avaliar a concentração de O₂⁻ na camada média da aorta. As aortas coletadas foram congeladas em OCT, utilizando nitrogênio líquido e posteriormente cortadas em criostato a 4 µm de espessura. Os cortes foram incubados a 37°C com DHE na concentração de 10 µg/ml em câmara úmida e escura durante 30 min. O DHE reage com O₂⁻ presente nos tecidos e os produtos da reação emitem fluorescência vermelha no núcleo. Após a lavagem tripla com PBS, as imagens foram obtidas com auxílio de um microscópio de fluorescência acoplado à câmera fotográfica, em 400X. As concentrações de EROs foram quantificadas utilizando o ImageJ através da inserção de 40 quadrados com uma área fixa sobre os núcleos marcados em vermelho, presentes na camada média da aorta. Quantificação dos núcleos marcados se deu pela totalidade da fluorescência individual dos cortes.

4.10 Curva concentração-efeito para fenilefrina (PE) e acetilcolina (ACh) nas aortas por miografia de fio

Após anestesia com isoflurano e eutanásia dos animais, as aortas torácicas foram removidas e colocadas em placas de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit

modificada a 4°C (em mM): NaCl, 130; KCl, 4,7; KH₂PO₄, 1,1; MgSO₄, 1,1; NaHCO₃, 15; EDTA, 0,03; CaCl₂, 1,6; Glucose, 5,5. A porção mediana da aorta torácica foi dividida em 4 anéis de 2 mm de comprimento sem o tecido adiposo perivascular (PVAT). Os anéis com endotélio foram montados em miógrafo (modelo 620M; Danish Myo Technology – DMT, Copenhagen, Denmark) para estudo da geração de força isométrica. Os anéis foram colocados entre ganchos, um fixo e outro conectado a um transdutor de sinal acoplado a um computador. As preparações permaneceram sob tensão de 5 mN, por 30 min para estabilização, nas cubas do miógrafo contendo solução de Krebs-Henseleit modificada, gaseificada com 95% de O₂ e 5% de CO₂ e aquecida à 37° C, com trocas de solução nutriente e ajuste de tensão a cada 10 min. Após período de estabilização, as artérias foram estimuladas com cloreto de potássio (KCl 120 mM), com a finalidade de se avaliar a integridade funcional.

Após novo período de lavagem e estabilização por mais 30 min, a integridade do endotélio foi testada avaliando-se o relaxamento à acetilcolina (ACh) à 10⁻⁶ M em aortas pré-contraídas com fenilefrina (PE), na concentração de 10⁻⁶ M. A ausência de relaxamento à ACh foi critério para confirmação da ausência de endotélio. Foram realizadas curvas de caráter cumulativo de PE e ACh de (10⁻¹⁰ a 10⁻⁴ M) em segmentos aórticos com endotélio.

4.11 Ensaio de imunoabsorção enzimática para TNF- α , IL-10 e IL-6

A determinação da expressão proteica de TNF- α , IL-10 e IL-6 foi avaliada em porções do rim pelo ensaio de ELISA. Placas de 96 poços foram revestidas com 150 μ L/poço de anticorpos para TNF- α , IL-10 e IL-6 nas concentrações de 3, 4 e 3 μ g/ml, respectivamente, e incubadas *overnight*. As placas foram então lavadas com PBS em Tween 0,05%, seguido de incubação com 200 μ l de PBS contendo 1% de albumina de soro bovino para evitar ligações não-específicas. As amostras e o padrão (a 4000 pg/ml) foram inseridos nos poços e incubados durante a noite a 4°C. Após lavagem, anticorpos biotinizados apropriados foram adicionados a 3 μ g/ml por 1 h. Então, avidina-peroxidase foi adicionada por um período de 20 min de incubação. Após lavagem, 100 μ l de tetrametilbenzidina (R&D Systems) também foi adicionada e a reação enzimática foi interrompida por H₂SO₄ após o desenvolvimento colorimétrico.

4.12 Citometria de Fluxo

Os rins foram esmagados diretamente em filtros celulares para obter suspensões unicelulares. Os glóbulos vermelhos foram lisados antes da coloração por citometria de fluxo. Os rins foram picados e colocados em placas contendo 1 mg/ml de colagenase I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a 37°C por 30 min. As amostras foram então dissociadas mecanicamente e depois filtradas por filtros de células de 40 µm (BD Biosciences) para obter suspensões unicelulares. As amostras de rim foram submetidas a centrifugação de gradiente Percoll (17089102; GE Healthcare, Marlborough, MA) antes da coloração por citometria de fluxo. Os seguintes anticorpos foram utilizados: FITC-A: CD4; PEA: GM-CSF; PerCP-Cy5-5A: IFNγ; APC-A: Foxp3; APC-H7; IL-17; CD45; PE-Cy7-A: IL10. As amostras foram analisadas utilizando o software FlowJo (Ashland, Oregon; EUA).

4.13 Análise do remodelamento vascular

A aorta torácica foi removida do animal, fixada em formalina tamponada a 10% (pH 7,0) por 24 h, seguido por mais 24 h em etanol 70%. Depois disso, os tecidos foram lavados numa sequência de álcool e xilol e incluídos em parafina. As aortas foram cortadas a 5 µm em micrótomo (Jung/Leica RM 2065) e coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Parâmetros morfológicos M/L e CSA foram quantificados pelo ImageJ. Para analisar o CSA fez-se a subtração da área interna do lúmen (A_i) pela área externa (A_e), de acordo com a fórmula:

$$CSA = (A_e - A_i)$$

Em seguida, os diâmetros externos (DE) e interno (DI) foram calculados. Para o diâmetro externo (DE), utilizou-se a fórmula:

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

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

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

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

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

4.14 Análise Estatística

Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey usando GraphPad Prism Software, versão 9.00 (Califórnia, EUA). Considerou-se estatisticamente significativos valores com $p < 0,05$. Gráficos foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM).

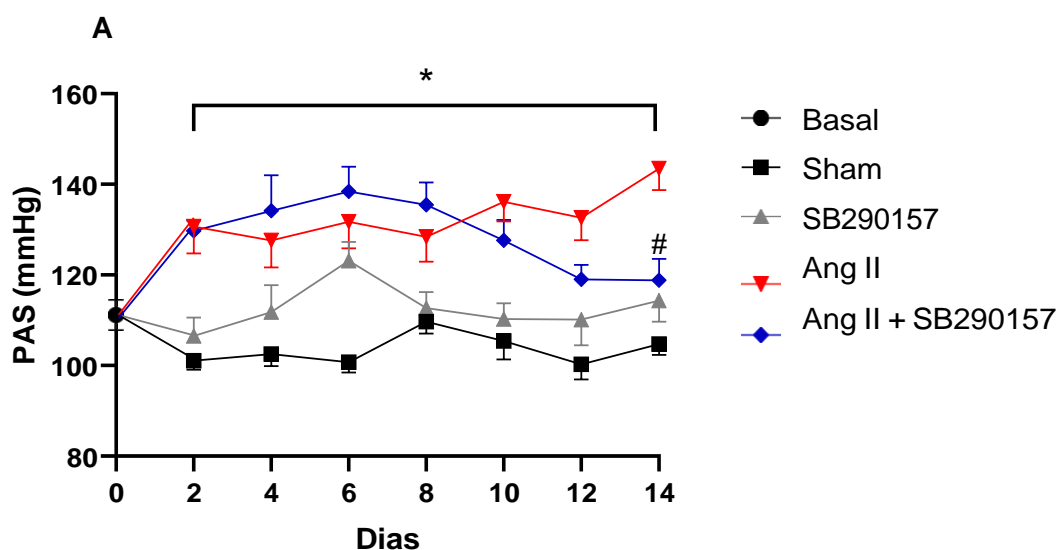
Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Tratamento com o antagonista de receptor de C3a parece não restaurar a PAS elevada na hipertensão por Ang II

Para verificar se a Ang II causou aumento da pressão arterial nos camundongos e se o tratamento com o SB290157 reduz este parâmetro, foi realizada aferição da PAS por 14 dias por pletismografia de cauda. Houve aumento significativo da PAS já no segundo dia após a implantação das minibombas de infusão nos grupos Ang II em comparação aos controles ($*p < 0,05$; Fig. 6A). O tratamento com o SB290157 reduziu a PAS elevada a partir do 14º dia de tratamento ($\#p < 0,05$ vs. Ang II). Entretanto, como a redução da PAS começou ocorrer apenas no último dia de tratamento, resolvemos avaliar a PAS pelo método invasivo para nos certificarmos dos resultados, já que a aferição invasiva é mais fidedigna.

A aferição da pressão pelo método invasivo foi feita no último dia de tratamento com o SB290157. Houve aumento da PAS nos grupos Ang II em comparação aos controles ($**p < 0,001$; Fig. 6B), porém o tratamento com SB290157 não reduziu a PAS elevada ($*p < 0,05$ vs. controles).



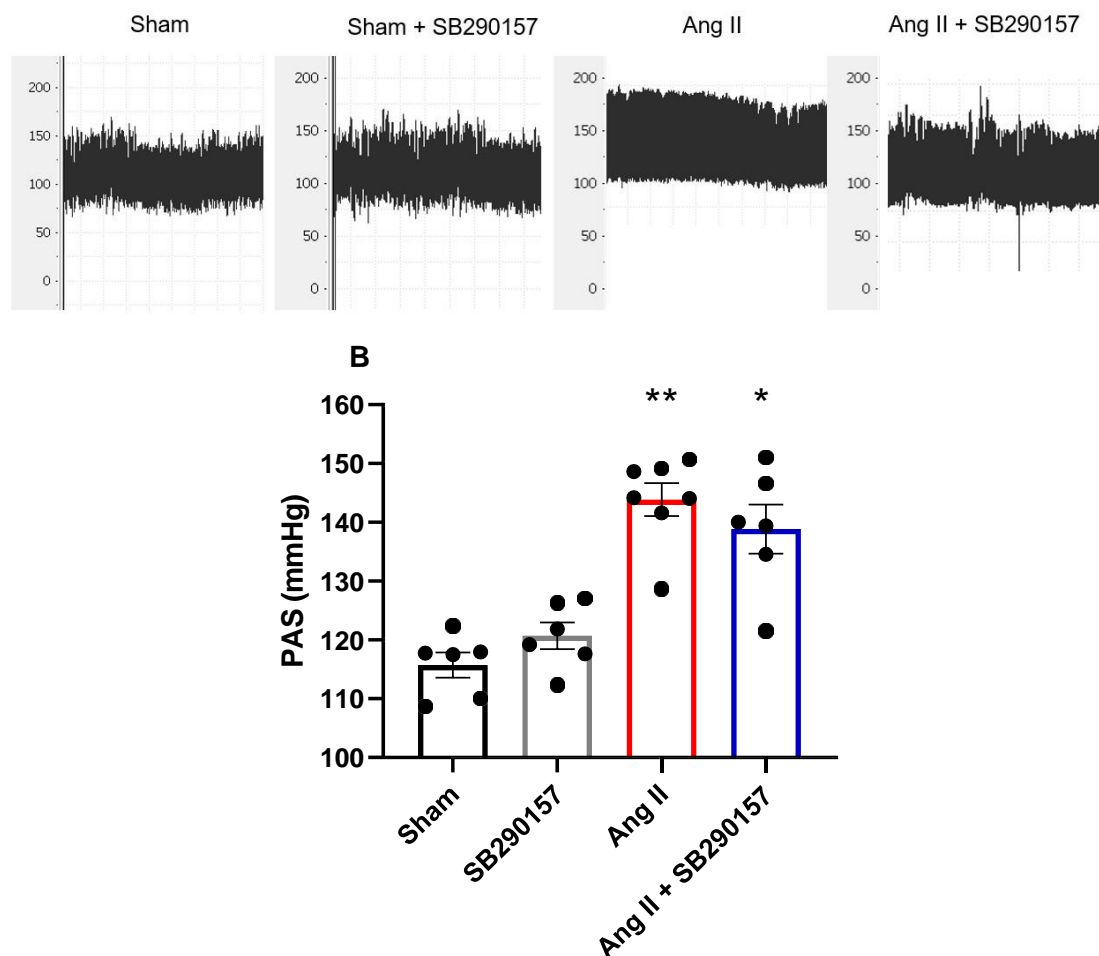


Figura 16 – A: Pressão arterial sistólica (PAS) de camundongos submetidos a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas com Ang II, tratados ou não com o antagonista de c3aR. Painel A: Registros representativos da aferição de pressão arterial sistólica. B: Pressão arterial sistólica (PAS) invasiva no 14^o de tratamento e imagem representativa da aferição de pressão arterial invasiva. Valores expressos em média \pm erro padrão (* $p < 0,05$ vs. grupos controles; ** $p < 0,001$ vs. grupos controle; # $p < 0,05$ vs. grupo Ang II; A: $n=8$; B: $n=6-7$).

5.2 Hipertensão por Ang II aumenta concentrações plasmáticas de C3a

Para verificar se durante a hipertensão causada pela Ang II há aumento de C3a plasmático, foi realizado ELISA de C3a após coleta de sangue no dia da eutanásia. Como pode ser observado na figura 7, os camundongos hipertensos tiveram maior concentração de C3a no plasma em relação aos controles (* $p < 0,05$) e o tratamento com SB290157 não reduziu esta quantidade elevada de C3a.

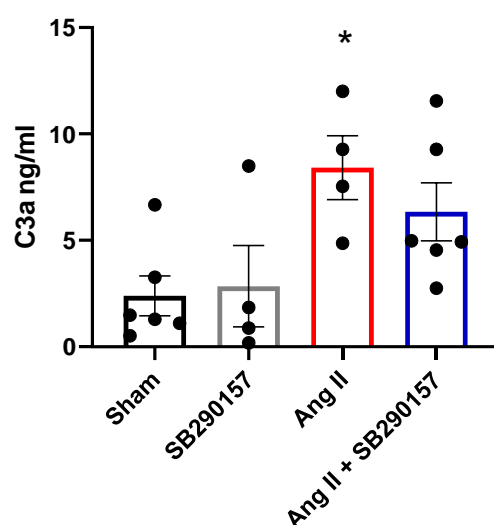


Figura 17- Concentração plasmática de C3a de camundongos submetidos a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas com Ang II, tratados ou não com o antagonista de C3aR. Valores expressos em média \pm erro padrão. (* $p < 0,05$ versus grupo Sham; $n = 4-6$).

5.3 O tratamento com SB290157 não altera o conteúdo proteico do receptor de C3a

Para determinar se a expressão proteica do receptor de C3a se altera na vasculatura por causa da hipertensão causada pela Ang II ou por causa do tratamento com o SB290157, Western blot para o receptor de C3a foi realizado nas aortas. Não houve diferenças na expressão do receptor de C3a nas aortas dos camundongos dos grupos experimentais, embora haja tendência de diminuição do receptor nos grupos hipertensos (Figura 8).

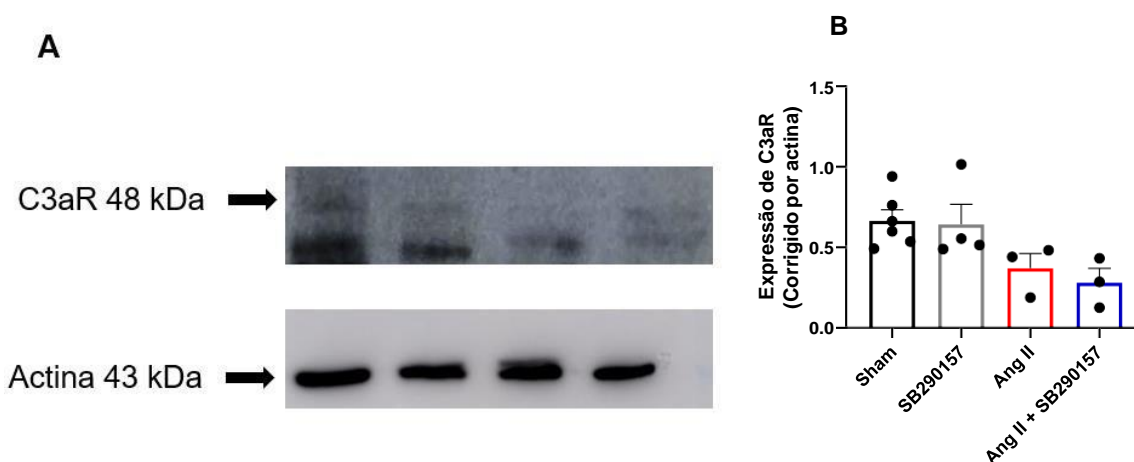
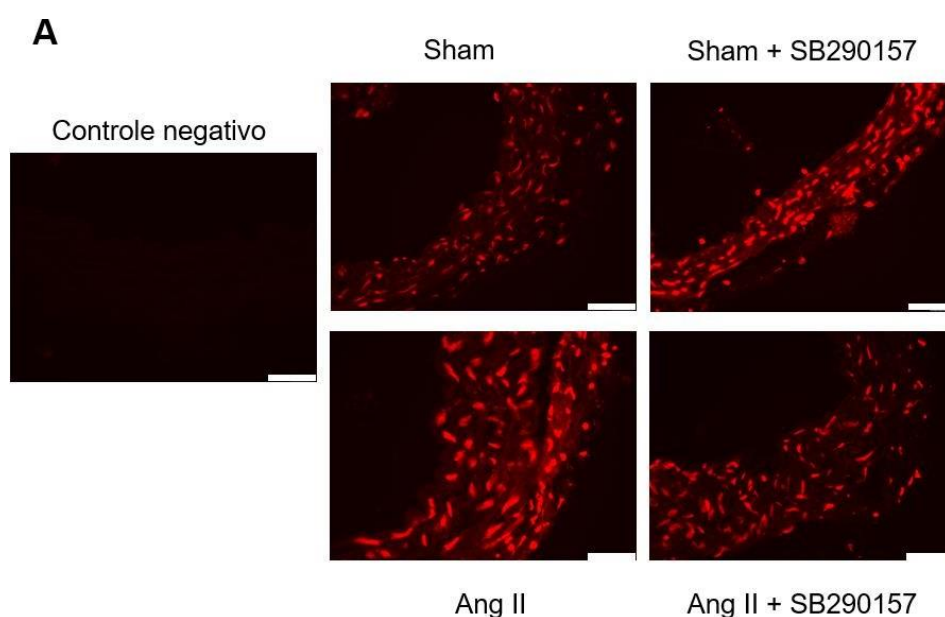


Figura 18 - Conteúdo proteico da expressão do receptor de C3a (C3aR) em aortas de camundongos submetidos a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas com estímulo ou não de Ang II, tratados ou não com o antagonista de C3aR. $p > 0,05$, $n = 3-6$.

5.4 O tratamento com o SB290157 reduz as concentrações de EROs nas aortas dos animais hipertensos

Foi avaliado também a produção de EROs nas aortas dos camundongos pela fluorescência do DHE. As EROs, representando aqui o estresse oxidativo, são componentes ativos da imunidade inata e apresentam participação na via de sinalização intracelular do NF- κ B e das células inflamatórias. Além disso, também podem participar do aumento da expressão e ativação da MMP-2 nas artérias na hipertensão. Como visto na figura 9, houve aumento de EROs nas aortas do grupo Ang II (* $p < 0,05$ vs. controles) e o SB290157 reduziu significativamente este aumento (# $p < 0,05$ vs. Ang II). Além disso, o grupo Ang II também obteve maior número de núcleos marcados em relação aos controles (* $p < 0,05$) e o antagonista de C3aR também reduziu esta quantidade (# $p < 0,05$ vs. Ang II).



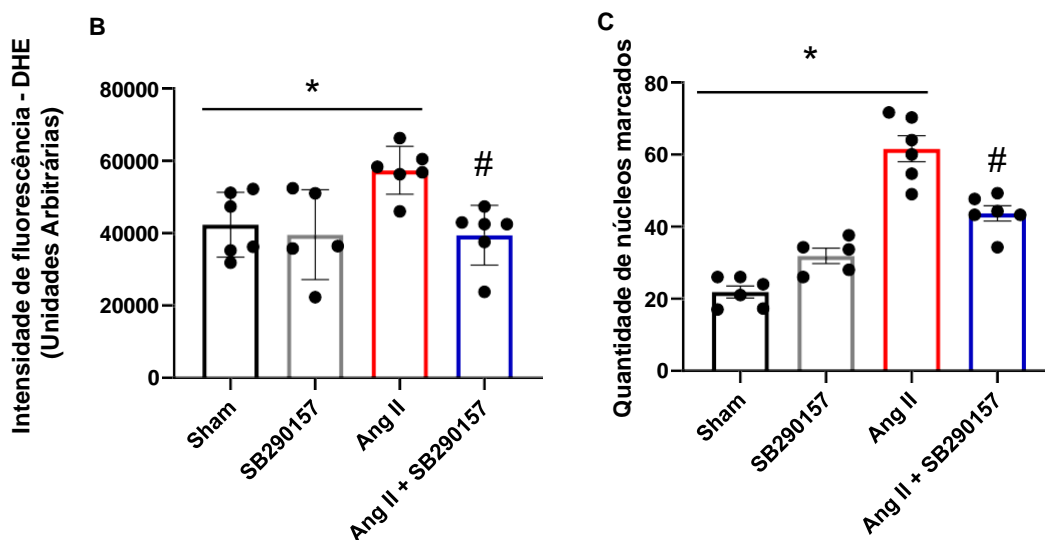


Figura 19 - Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela técnica de DHE em aortas de camundongos submetidos a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas com estímulo ou não de Ang II, tratados ou não com antagonista de C3aR. As fotografias são representativas de cada grupo (400x) e a barra de escala representa 25 μ m, seguidas dos resultados apresentados em gráficos, com a intensidade de fluorescência. Valores expressos como média \pm erro padrão (* $p < 0,05$ vs. grupos controles; *** $p < 0,01$ vs. grupos controles; # $p < 0,05$ vs. grupo Ang II; $n = 5-6$).

5.5 O tratamento com SB290157 não reduz a quantidade aumentada de linfócitos T efetores nos rins dos animais hipertensos.

Para avaliar a população de linfócitos, foi realizada a citometria de fluxo nos rins dos camundongos Ang II e tratados com SB290157. Como mostra a figura 10, o grupo Ang II apresentou aumento da população de linfócitos CD4+ (* $p < 0,05$ vs. Sham e ** $p < 0,01$ vs. Sham + SB290157), mas não houve diferenças quantitativas na população dos linfócitos T que expressam Foxp3 e que produzem IL-10 (Figura 10 A-D). O tratamento com SB290157 não reduziu significativamente a quantidade de linfócitos T CD4+, embora especula-se que isto possa reduzir com mais tempo de tratamento.

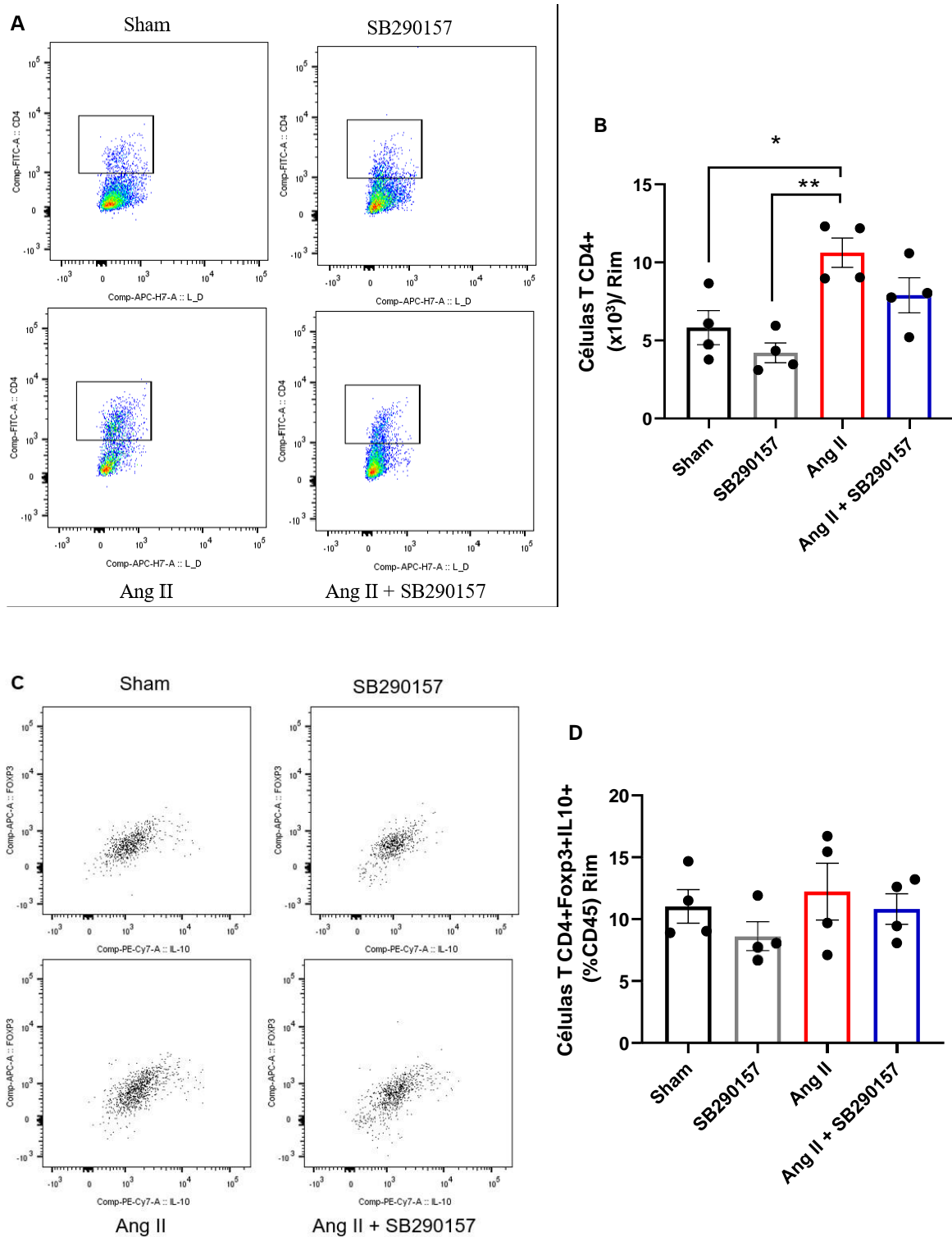


Figura 10: Citometria de fluxo de linfócitos T CD4+ (A e B) e Foxp3+IL-10+ (C e D) em tecidos renais de camundongos submetidos a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas com estímulo ou não de Ang II, tratados ou não com o antagonista de C3aR (* $p < 0,05$ vs. Sham; ** $p < 0,001$ versus Sham + SB290157; $n=4$).

5.6 O tratamento com SB290157 reduz a quantidade aumentada de IL-6 nos rins dos animais hipertensos

A fim de avaliar a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias, foi realizado o ensaio imunoenzimático nos rins dos camundongos. Usamos os rins por termos pouca disponibilidade de tecido aórtico para todos os experimentos e porque os rins contêm muitas células imunes e produção de citocinas pró-inflamatórias, além de ter muita ação da Ang II no desenvolvimento da hipertensão. Foram avaliadas citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-6, e citocinas anti-inflamatórias como a IL-10. Como pode ser visto na figura 11, houve aumento significativo destas citocinas nos rins dos camundongos Ang II vs. controle ($*p < 0,05$). Entretanto, o tratamento com o SB290157 reduziu apenas as concentrações da IL-6 ($\#p < 0,05$ vs. Ang II).

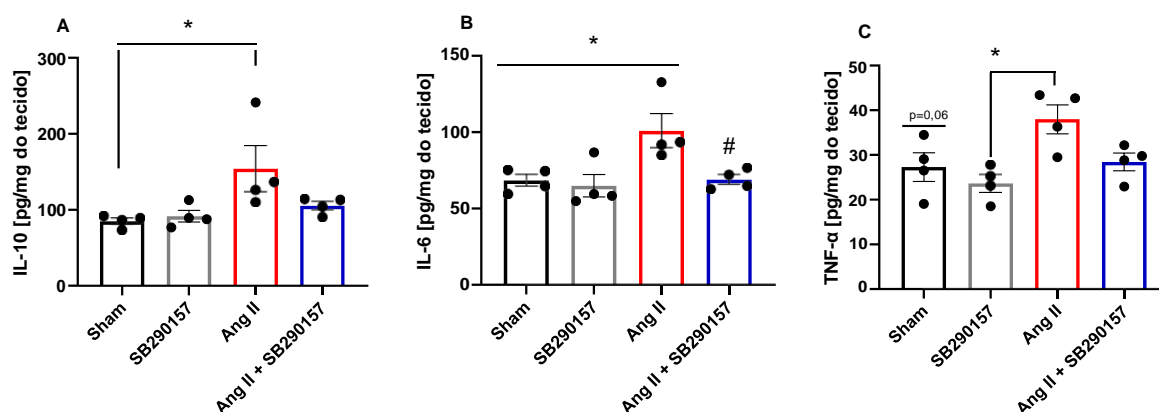


Figura 11 - Concentrações renais de IL-10, IL-6 e TNF- α em camundongos submetidos a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas com estímulo ou não de Ang II, tratados ou não com o antagonista de C3aR ($*p < 0,05$ versus grupos controles; $p = 0,06$ versus Ang-II $\#p < 0,05$ versus grupo Ang II; $n = 4$).

5.7 O tratamento com o antagonista não alterou a quantidade proteica de NF-kB na aorta

Foram avaliadas as concentrações de NF-kB nas aortas dos camundongos. O aumento de NF-kB pode contribuir para o aumento da cascata inflamatória durante a hipertensão, gerando citocinas pró-inflamatórias e aumentando a expressão e/ou atividade das MMPs (-2 e -9). Para tal, aortas de camundongos foram trituradas e centrifugadas a fim de obter material a ser quantificado pela técnica de Western blot. Como mostra a figura 12, não houve diferença das quantidades proteicas de NF-kB entre os grupos experimentais, embora pareça que os hipertensos apresentem mais. A técnica de Western blotting para a versão fosforilada de NF-kB se deu devido a este fator ser fosforilado intracelularmente, levando a transcrição de fatores pró-inflamatórios.

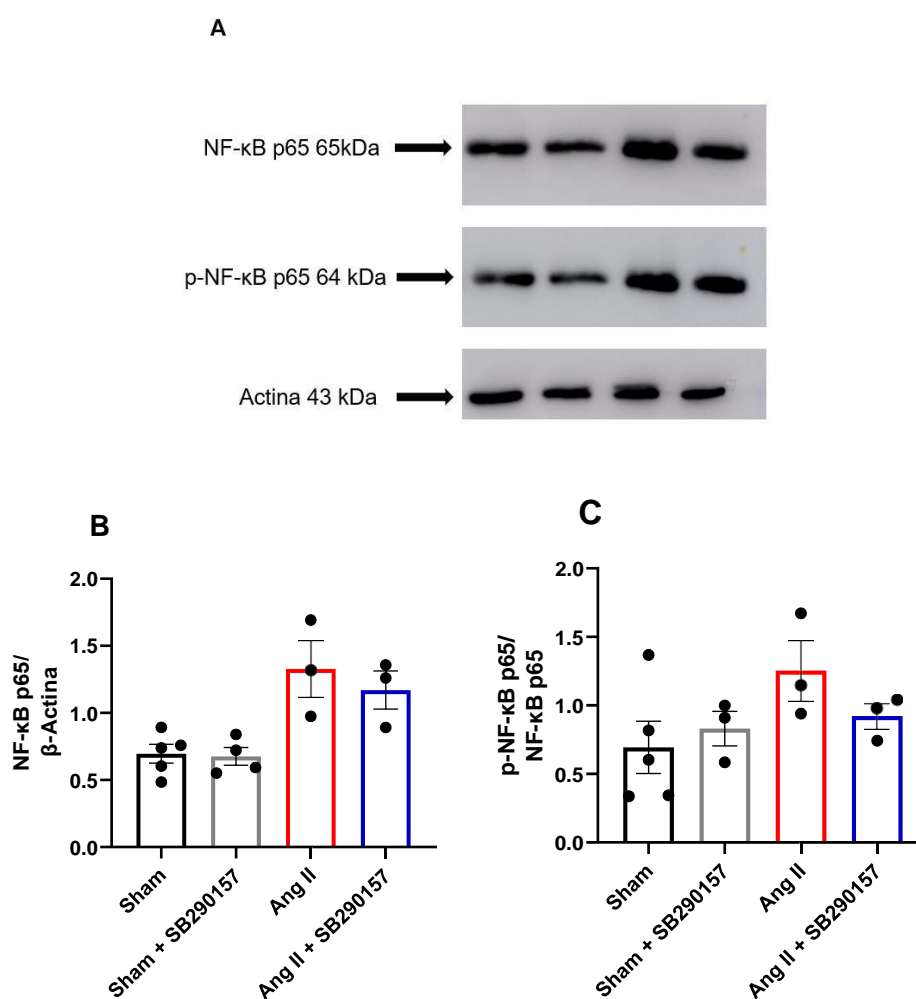


Figura 12 - Níveis proteicos de NF-κB e p-NF-κB em aortas de camundongos submetidos a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas com Ang II, tratados ou não com o antagonista de C3aR; n= 3-5.

5.8 O tratamento com o SB290157 reduziu a atividade acentuada da MMP-2 na aorta dos camundongos hipertensos

Mesmo sem alteração do NF-κB, o estresse oxidativo pode ativar a MMP-2 no coração e artérias em algumas doenças cardiovasculares. Assim, a zimografia em gel foi realizada para determinar a atividade da MMP-2 e -9 nas aortas dos camundongos tratados com Ang II e SB290157. A figura 13 mostra que houve aumento significativo da atividade da MMP-2 (72 e 64 kDa) nas aortas dos camundongos Ang II quando comparados aos grupos controles (* $p < 0,05$). O tratamento com o antagonista de C3aR reduziu este efeito (# $p < 0,05$ vs. Ang II). A atividade da MMP-9 89 kDa também foi aumentada nas aortas dos camundongos tratados com Ang II (* $p < 0,05$ vs. controles), porém o tratamento com o SB290157 não reduziu esta atividade.

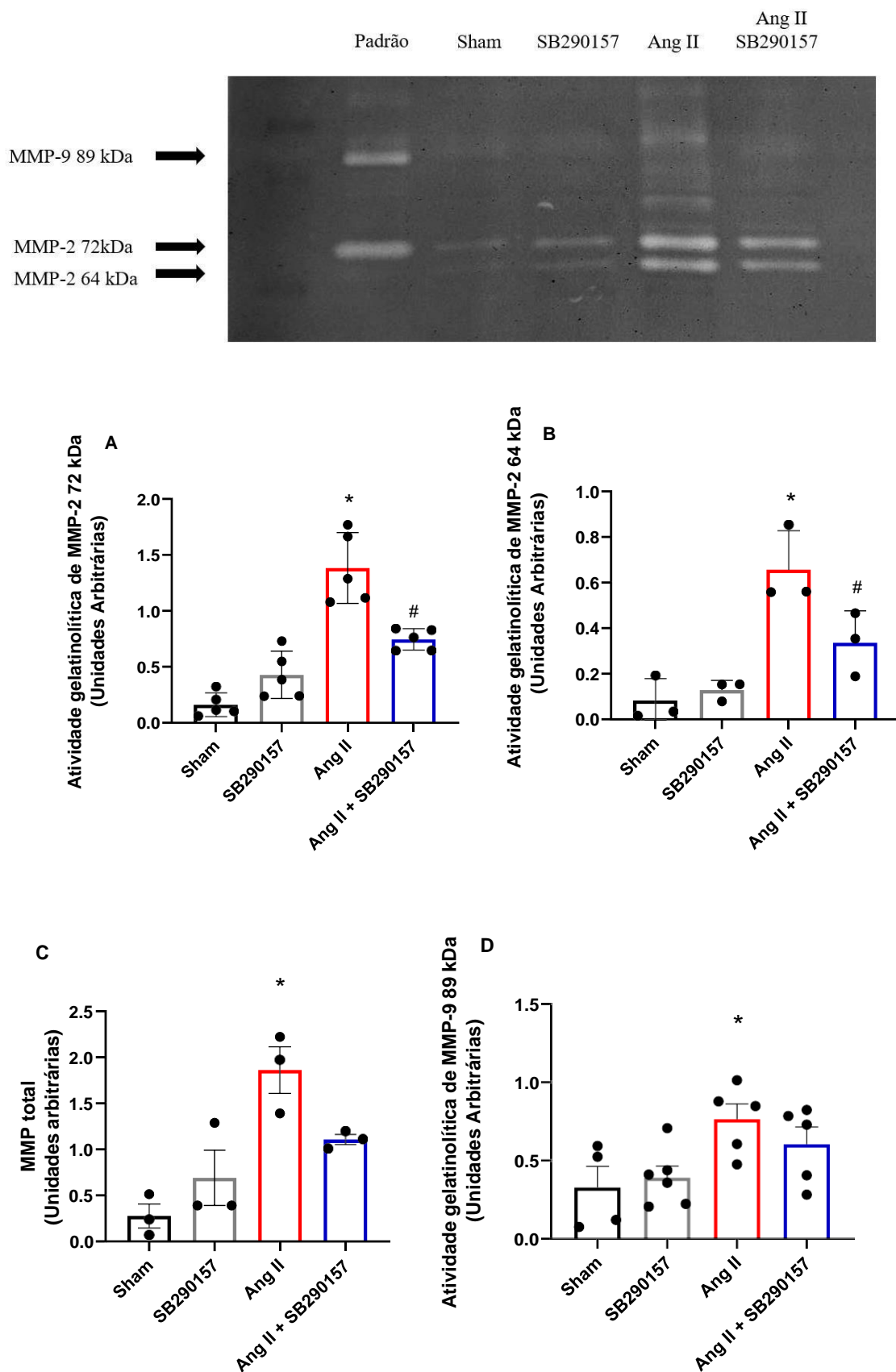


Figura 13 - Atividade da MMP-2 por zimografia em gel em aortas de camundongos submetidos a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas com estímulo ou não de Ang II, tratados ou não

com o antagonista de C3aR. Imagem 1: Foto representativa. Os gráficos A e B mostram a atividade da 72 e 64 kDa MMP-2, respectivamente. Os gráficos C e D mostram a quantificação da MMP-2 total e a 89 kDa MMP-9. A Valores expressos como média \pm erro padrão (* $p < 0,05$ vs Sham e Sham + SB290157; # $p < 0,05$ vs grupo Ang II; $n = 3-6$). Controle positivo: Soro Fetal Bovino.

o SB290157 reduziu a atividade gelatinolítica acentuada na aorta dos camundongos hipertensos

Para verificar a atividade da MMP-2 em segmentos de aorta dos camundongos Ang II e tratamento com o SB290157, foi realizada a zimografia *in situ*. Houve aumento significativo da atividade gelatinolítica na camada média das aortas dos camundongos hipertensos (* $p < 0,05$ vs. controles; Figura 14) e o tratamento com o SB290157 reduziu essa atividade proteolítica (# $p < 0,05$ vs. Ang II).

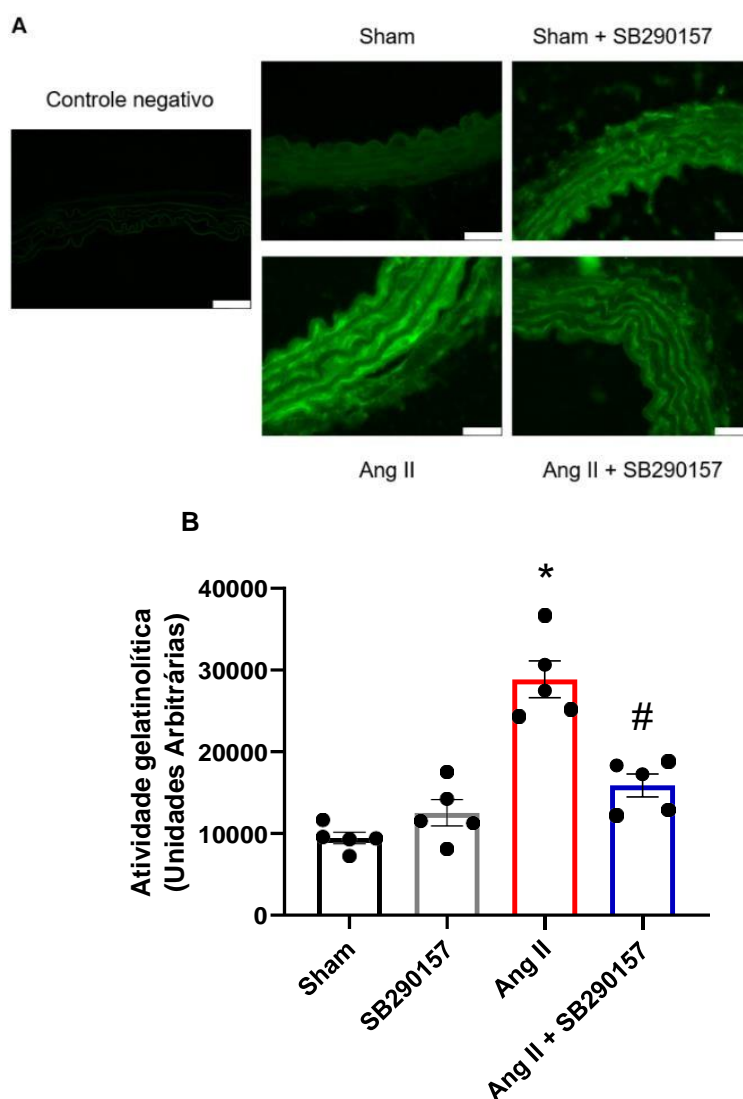


Figura 14- Atividade gelatinolítica por zimografia *in situ* em aortas de camundongos incubadas ou não com Ang II e antagonista de C3aR. As fotografias são representativas de cada grupo (400x) e a barra de escala representa 25 μ m, seguidas dos resultados apresentados como intensidade de fluorescência

(Unidades arbitrárias). Como controle negativo, ao invés da DQ, foi utilizado PBS. Valores expressos como média \pm erro padrão (* $p < 0,05$ vs. grupos controles; # $p < 0,05$ vs. grupo Ang II; $n = 5$).

5.10 Aumento da atividade gelatinolítica correlaciona-se positivamente com a quantidade de EROs nas aortas dos camundongos hipertensos

Foi verificado também se existe correlação entre as quantidades de EROs e a atividade gelatinolítica da zimografia *in situ*. Como pode ser visto na figura 15, quanto maior a quantidade de EROs, maior a atividade gelatinolítica, com $r^2 = 0,641$ e $p < 0,05$.

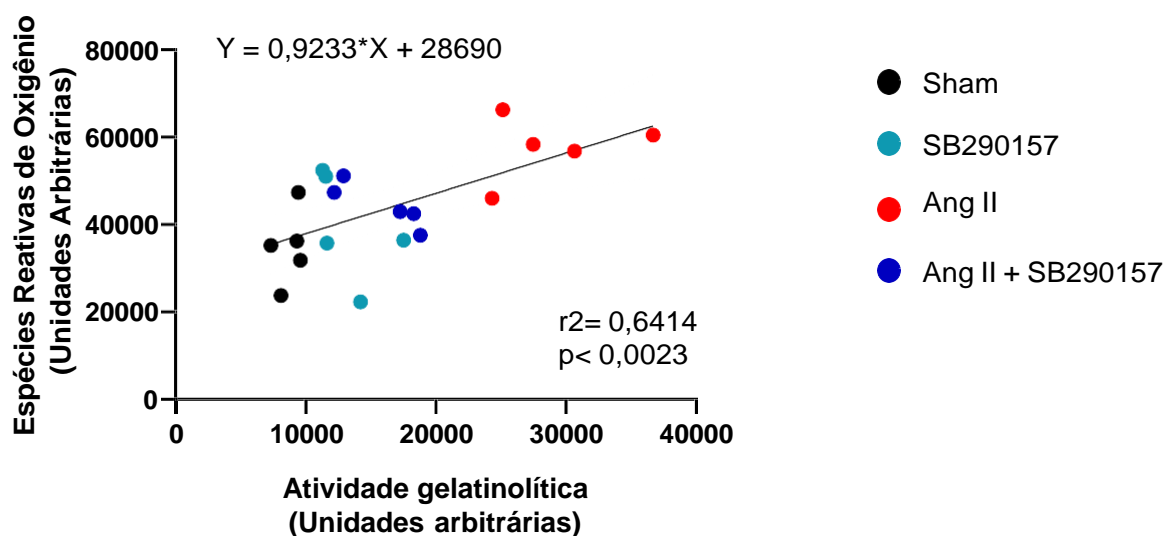


Figura 15 - Correlação positiva entre EROs e atividade gelatinolítica *in situ*, ambos vistos em aortas de camundongos incubadas ou não com Ang II e SB290157.

5.11 O tratamento com SB290157 reduziu a área de secção transversal (CSA) da aorta que estava aumentada nos camundongos hipertensos

Para verificar se o aumento da atividade da MMP-2 contribui para as alterações vasculares morfofuncionais na hipertensão por Ang II, os parâmetros morfológicos CSA e M/L foram analisados. Quatorze dias após a implantação das minibombas de Ang II, houve aumento significativo no CSA em relação aos grupos controles (* $p < 0,05$ vs. Sham + SB290157; *** $p < 0,001$ vs. Sham) o que caracteriza para formar o remodelamento hipertrófico de artérias de condutância. A M/L parece aumentar no grupo Ang II em relação aos controles, embora sem diferenças estatísticas. O tratamento com o SB290157 reduziu o CSA elevado nos animais hipertensos ($p = 0,051$ vs. Ang II; Figura 16).

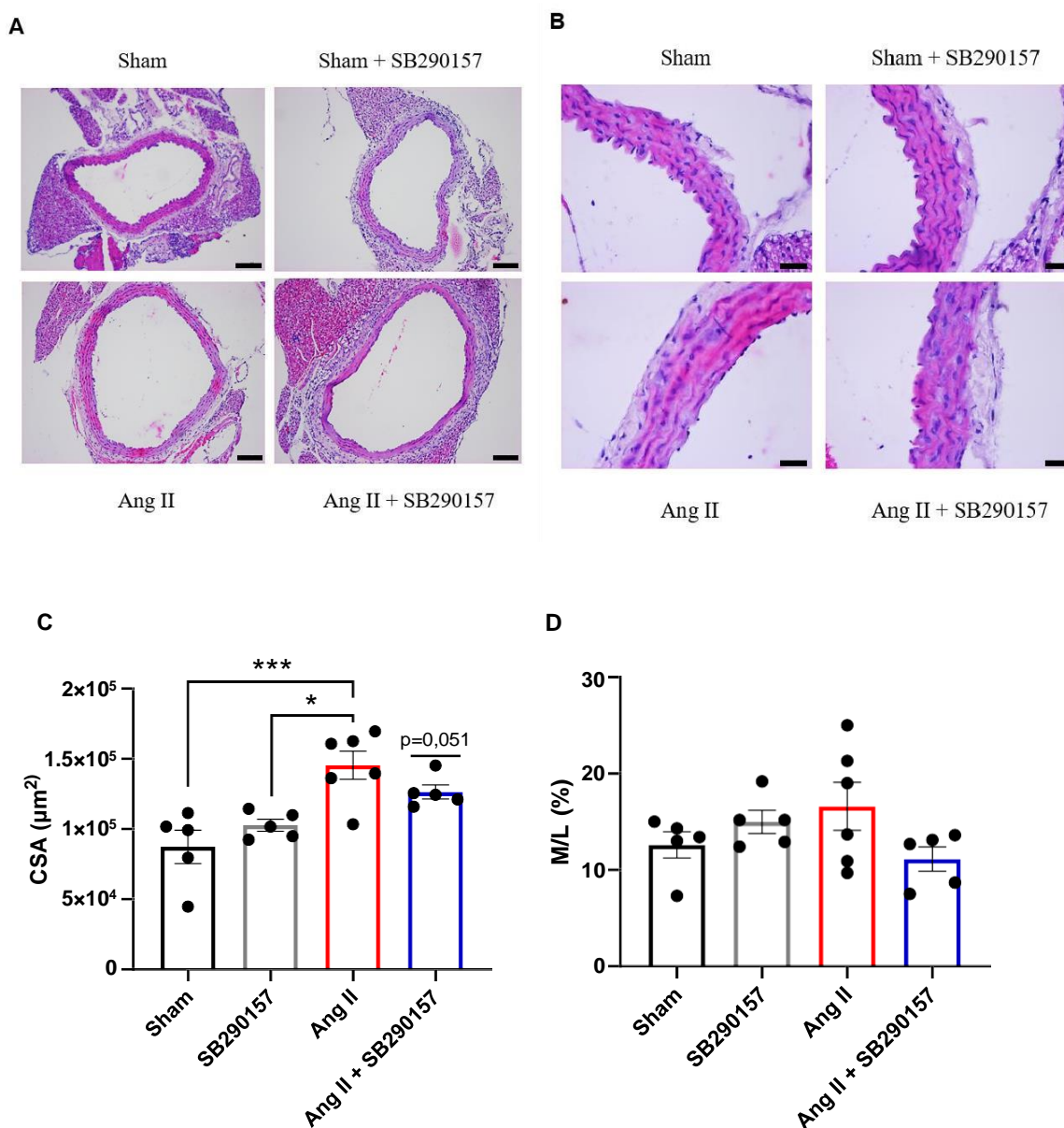


Figura 16 – A e C: Área de secção transversal (CSA) e B e D: razão média/lúmen (M/L) das aortas de camundongos submetidos a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas com estímulo ou não de Ang II, tratados ou não com antagonista de C3aR. As fotografias são representativas de cada grupo (100 e 400x) e a barra de escala representa 25 μm . (* $p < 0,05$ vs Sham +SB290157; *** $p < 0,001$ versus Sham; $n = 5-6$).

5.12 O tratamento com SB290157 não melhora a hipercontratibilidade da aorta nos camundongos hipertensos

Por causa do aumento da produção de EROs, citocinas pró-inflamatórias e MMP-2 na aorta dos camundongos hipertensos, verificamos se estas alterações poderiam interferir na funcionalidade da aorta após tratamento com o SB290157. Nota-se que os animais infundidos com Ang II obtiveram hipercontratibilidade à PE em relação aos controles (* $p < 0,05$; figura 17A). O SB290157 não reduziu a hipercontratibilidade causada pela PE nestes animais. Não houve diferença significativa nos valores de pD_2 entre os grupos (figura 17C).

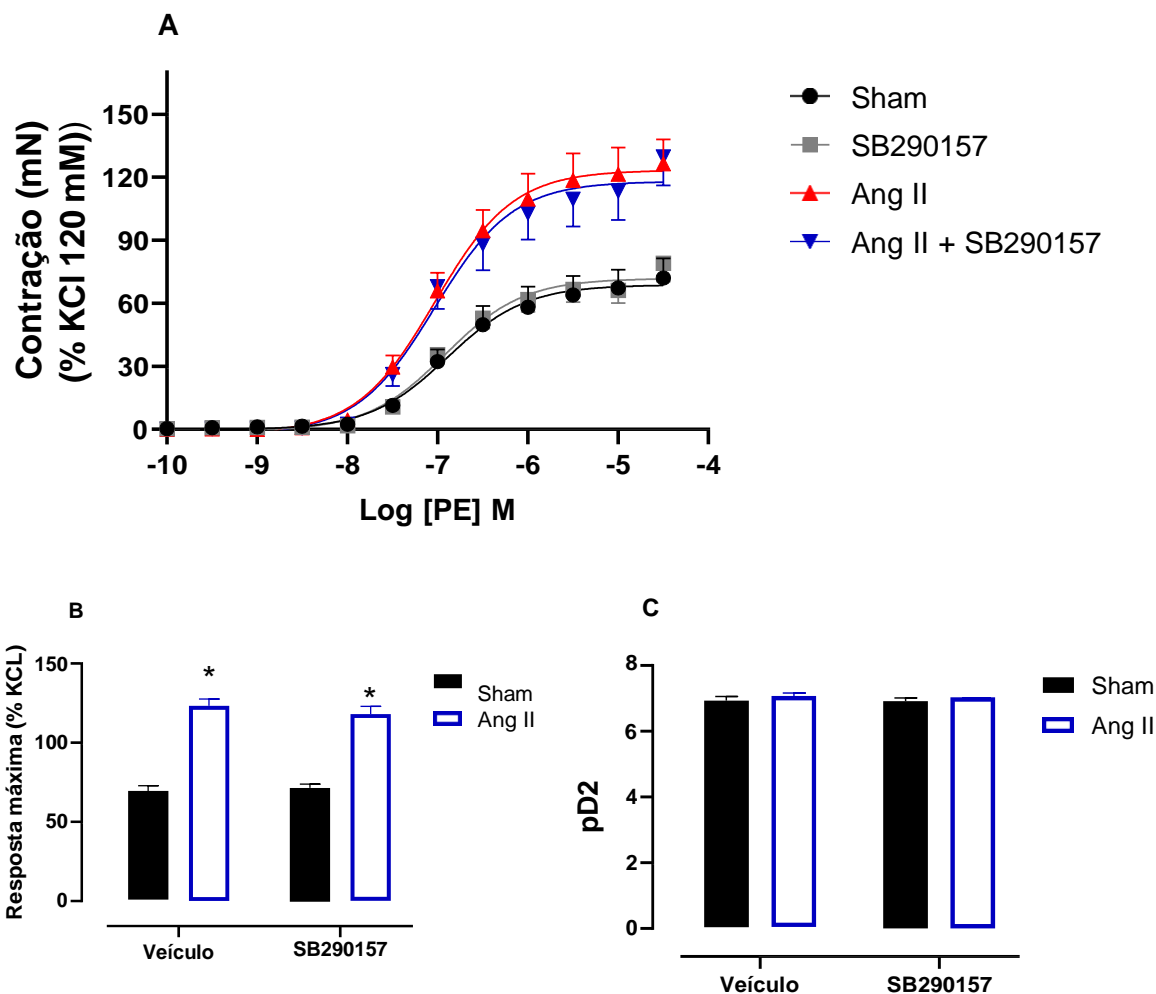


Figura 17 - A: Curvas concentração-efeito à fenilefrina (PE) em anéis de aorta de camundongos submetidos a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas com estímulo ou não de Ang II, tratados ou não com antagonista de C3aR. B: O gráfico de barra mostra a resposta máxima que foi medida durante a curva de concentração-efeito à fenilefrina. C: O gráfico de barra mostra os valores de pD_2 obtidos da transformação dos valores de EC_{50} (* $p < 0,05$ vs grupos controles; $n = 5-10$).

Curvas concentração-efeito à Ach também foram realizadas nos anéis de aorta dos grupos experimentais, como pode ser observado na figura 18. Não houve diferenças no relaxamento dependente do endotélio provocado pela Ach entre os grupos experimentais. Entretanto, nos animais hipertensos, maiores concentrações de Ach foram usadas para promover o mesmo relaxamento endotelial que o grupo controle, deslocando a curva para direita (pD_2 , $p < 0,05$ entre Sham vs. Ang II).

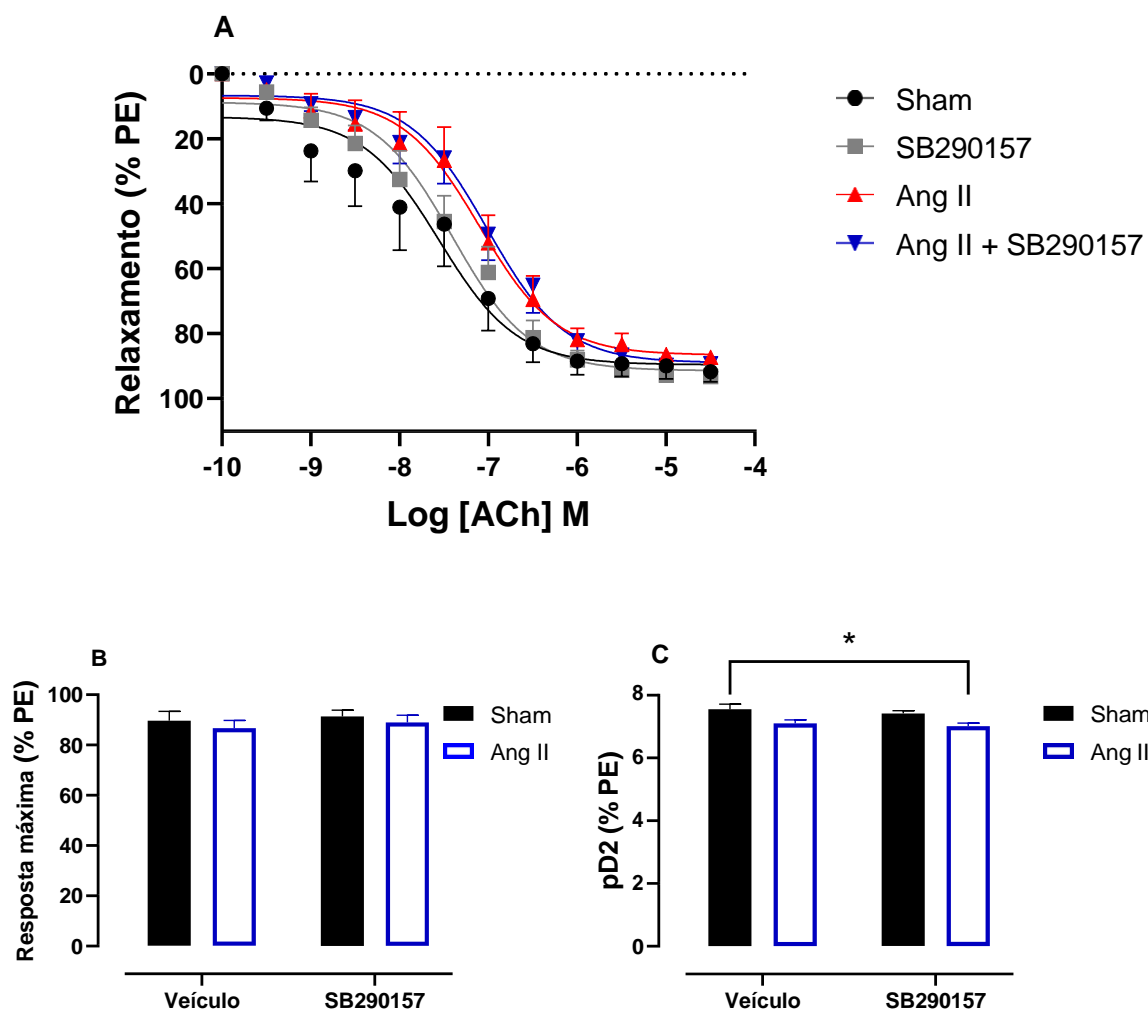


Figura 18 - A: Curvas concentração-efeito à Acetilcolina (ACh) em anéis de aorta de camundongos submetidos a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas com estímulo ou não de Ang II, tratados ou não com o antagonista de C3aR. B: O gráfico de barra mostra a resposta máxima que foi medida durante a curva de concentração-efeito. C: O gráfico de barra mostra os valores de pD_2 obtidos da transformação dos valores de EC_{50} (* $p < 0,05$ vs. grupo controle; $n = 5-10$).

Discussão

6 DISCUSSÃO

Este estudo mostrou que a atividade de MMP-2 está aumentada em modelo com infusão de Ang II subcutânea após 14 dias, o que contribui para o remodelamento e disfunção vascular da hipertensão. O uso do SB290157 diminuiu as concentrações elevadas de EROs e o aumento da atividade de MMP-2 nas aortas dos animais hipertensos. Além disso, reduziu as quantidades de IL-6 renais e o remodelamento arterial hipertrófico. Sendo assim, o sistema complemento, neste caso o C3a, participa das alterações bioquímicas e morfofuncionais da hipertensão e seus antagonistas podem ser estratégias farmacológicas interessantes se usadas preventivamente para melhorar o remodelamento e a disfunção vascular.

Concentrações elevadas de C3a plasmático foram associadas à hipertensão em humanos (61). Em modelos de hipertensão arterial em camundongos, por infusão com Ang II, também se observa aumentos das concentrações de C3a no plasma (60). Estes estudos estão em consonância com os achados do presente trabalho onde após duas semanas de infusão com Ang II nos camundongos, houve aumento do C3a no plasma. Entretanto, mais estudos precisam ser feitos para entender os mecanismos de ativação do sistema complemento que resultam em aumento de C3a quando há aumento de Ang II. Sabe-se que a via clássica de ativação do sistema complemento pode ocorrer quando há dano tecidual. Na hipertensão, estes danos podem estar relacionados com o estresse e aumento da tensão na parede arterial ou lesão por isquemia (60, 62). A via alternativa é ativada continuamente (63). Danos endoteliais e a ativação plaquetária também podem contribuir para a ativação do complemento. A exposição de neoantígenos na disfunção endotelial pode levar ao aumento da via da lectina, como alternativa (64, 65).

A infusão de Ang II por 14 dias tornou os camundongos hipertensos e contribuiu para formação do remodelamento arterial hipertrófico. Outros estudos também mostraram que 14 dias de administração de Ang II foram suficientes para desenvolver hipertensão e o remodelamento arterial mal adaptativo nos camundongos (92). O tratamento com antagonista de receptores do C3a, o SB290157, parece começar reduzir a PAS nos animais hipertensos no final da segunda semana, quando a PAS foi analisada por pletismografia de cauda. Entretanto, como este efeito não foi observado quando a PAS foi aferida pelo método invasivo, especulamos que talvez o uso do antagonista seja mais eficaz se usado como antihipertensivo. Experimentos usando a Ang II por 21 dias seriam interessantes e podem ser analisados no futuro. Estudos mostram que camundongos *knockout* para C3aR tiveram menor PAS após

infusão de Ang II quando comparados aos controles. Este estudo usou a mesma concentração de Ang II que no presente trabalho, entretanto por sete dias (60). Camundongos hipertensos por infusão de Ang II por 14 dias, mas knockouts para os receptores de C3a e C5a, também apresentaram redução da PAS (11). A administração de SB290157 por via endovenosa do 14^o ao 19^o dia de gestação em ratas hipertensas também mostrou redução da pressão (17). Um dos diferenciais em nosso estudo foi usar tratamento farmacológico com o antagonista do receptor de C3a, o SB290157, para tratar os animais hipertensos e contribuir para possíveis aplicações futuras de tratamento. Entretanto, uma das limitações apresentadas neste estudo é que usamos apenas um tempo de tratamento com SB290157, que foi iniciado concomitantemente à infusão de Ang II. Desta forma, começar o tratamento depois de sete dias de iniciado a infusão de Ang II seria relevante para a proposta de tratamento farmacológico.

Devido ao aumento das concentrações plasmáticas de C3a na hipertensão, questionamos como estaria a expressão proteica dos receptores nas aortas destes animais. Não houve mudança significativa no conteúdo proteico de C3aR entre os grupos experimentais, embora haja tendência de diminuição nos animais hipertensos. A probabilidade das maiores concentrações plasmáticas de C3a ligarem ao receptor na vasculatura, por exemplo, e manifestar o efeito biológico é alta. O receptor de C3a, uma vez ativado, sofre fosforilação em resíduos Serina⁴⁶⁹ e Treonina⁴⁶³, o que leva a ativação de vias intracelulares; entretanto, a estimulação contínua também pode contribuir com sua dessensibilização, mediada por β -arrestina 2, e o receptor pode ser menos expresso (77).

Uma das vias de sinalização intracelular mediada pelo C3a é a ativação do NF- κ B, como pode ser observado na ativação de monócitos no sangue (93). O NF- κ B é um dos componentes intracelulares que controla a expressão gênica da MMP-2 e genes relacionados à inflamação e ao remodelamento. A inibição farmacológica do NF- κ B reduz a atividade da MMP-2 nas aortas de ratos hipertensos, melhorando o remodelamento e a disfunção vascular (59). Não houve diferenças significativas da expressão proteica de NF- κ B nas aortas entre os grupos experimentais, embora haja tendência de aumento nos animais hipertensos. Mesmo assim, é sabido que o NF- κ B é regulado positivamente pela Ang II e pode induzir a produção de IL-6 e TNF- α na

aorta e rins, além de estimular o recrutamento de monócitos e macrófagos, aumentando a inflamação (66, 67, 68). Foi visto aumentos significativos nas concentrações renais de TNF- α e IL-6 nos camundongos hipertensos e o tratamento com SB290157 reduziu as concentrações elevadas de IL-6. Por outro lado, a citocina anti-inflamatória, IL-10, também foi avaliada nos rins dos animais hipertensos tratados com SB290157. Esta citocina contribui para reduzir as quantidades de mediadores pró-inflamatórios e regula a infiltração de monócitos nos tecidos (69). Houve aumento da IL-10 nos rins dos camundongos com Ang II e o tratamento com SB290157 ainda não foi capaz de reduzir este aumento neste tempo de tratamento. Por ser um modelo de hipertensão aguda, a produção das citocinas, de forma geral, ainda pode estar ocorrendo, deixando-as em concentrações mais elevadas no plasma ou tecidos. Por outro lado, a administração exógena de IL-10 em modelo de infarto do miocárdio reduziu o remodelamento cardíaco hipertrófico causado pela sobrecarga de pressão e melhorou a função cardíaca ao reduzir a expressão do NF- κ B via ativação de STAT-3. Isto contribui para reduzir a inflamação e o remodelamento do ventrículo esquerdo após o infarto do miocárdio (70, 71).

É sabido que a Ang II e o sistema complemento estimulam a proliferação e maturação de células T CD4⁺ no sistema cardiovascular. Tal aumento total de células TCD4⁺ pode levar a diferenciação de células naive em Th17 (43). Nas análises de citometria de fluxo dos rins, os animais hipertensos apresentaram maiores percentuais e números absolutos de células T CD4⁺ em comparação aos controles, enquanto que o grupo tratado com o SB290157 parece reduzir este número de células. Este efeito pode estar relacionado à redução da sinalização mediada pelo C3a nos rins. O próprio aumento da quantidade de citocinas renais observado nos nossos experimentos pode ser decorrente do aumento destas células inflamatórias nos rins dos animais hipertensos. Por outro lado, embora não vimos diferenças estatísticas ao analisar as células T CD4⁺Treg⁺ nos rins por citometria de fluxo, sabe-se que quando estas estão aumentadas em quantidade, pode ocorrer diminuição do infiltrado inflamatório, já que apresentam ação imunossupressora. Estudos mostraram que na ausência dos receptores para C3a e C5a há aumento de células T CD4⁺Treg⁺ e melhora dos quadros hipertensivos induzidos pela Ang II (11, 76). A escolha dos tecidos renais para realizar os experimentos de citometria de fluxo se deu pela maior disponibilidade de material, além da importância renal no controle das ações cardiovasculares pós infusão de Ang II.

Aumento nas concentrações de Ang II aumenta tanto as concentrações de C3a quanto estresse oxidativo nas artérias via NADPH oxidase. As alterações vasculares crônicas causadas pela hipertensão são influenciadas pelo aumento da produção de EROs e ativação da MMP-2 na vasculatura (32). Por este motivo decidimos investigar a quantidade de estresse oxidativo na aorta através do experimento de DHE. Houve aumento das EROs na camada média da aorta e o tratamento com SB290157 reduziu estas concentrações elevadas. Estudos mostram que o C3a contribui para formação renal de estresse oxidativo por estímulo da NADPH oxidase na hipertensão (18, 41). Adicionalmente, o C3a em cultura de células renais parece aumentar a expressão e ação da NOX-4, o que contribui para a liberação de citocinas e fatores de crescimento, causando estresse no ambiente renal. O tratamento com inibidor de C1 (início da cascata do complemento) pode reduzir o estresse oxidativo e, por consequência, os danos teciduais (17). Os achados estão em concordância com a ação do SB290157, que potencializa a ação da superóxido dismutase (SOD)-2 e reduz nitrotirosina em podócitos na hipertensão e nefropatia diabética (72).

Os EROs advindos do estresse oxidativo interagem com grupos tiol das MMPs ativando-as e aumentando sua expressão por diferentes vias. Particularmente, o OONO⁻ (produzido pela reação de óxido nítrico e superóxido) produz modificações pós-translacionais na estrutura da MMP-2, ativando-a (118).

Além do estresse oxidativo, o aumento na expressão e/ou atividade da MMP-2 pode ocorrer por vias que incluem o NF- κ B, citocinas pró-inflamatórias e o próprio C3. Interleucina (IL)-1 β e TNF- α são citocinas pró-inflamatórias que podem aumentar a expressão e a atividade das MMP-2 e -9 em fibroblastos cardíacos e nas CMLVs, contribuindo para proteólise do colágeno na MEC em modelos de hipertrofia cardíaca. (94, 95). Além disso, o fator transformador de crescimento (TGF)- β pode ser ativado pela ação da MMP-2 e contribui para o acúmulo de colágeno e as alterações de remodelamento pro-fibróticas ligadas à hipertensão (96). Outro estudo mostra a relação direta entre o C3a-C3aR e a expressão da MMP-2 vascular. Camundongos knockouts para o receptor de C3a e submetidos à formação de aneurisma de aorta tiveram redução da atividade e expressão da MMP-2 e redução do risco de ruptura pelo aneurisma. Além disso, ao incubar CMLVs com o C3a recombinante e submetê-las ao estiramento mecânico, houve aumento da expressão da MMP-2; entretanto os mecanismos que interligam estas vias ainda não foram descritos (34).

No nosso trabalho, observamos aumento da atividade gelatinolítica da MMP-2 na camada média da aorta dos animais hipertensos em relação aos controles. De fato, a atividade da MMP-2 é vista aumentada em artérias de condutância e resistência nos diferentes modelos de HAS (99). O tratamento com SB290157 reduziu esta atividade gelatinolítica acentuada nos hipertensos. Ao correlacionar estresse oxidativo e a atividade *in situ* da MMP-2, observamos uma correlação positiva, onde quanto mais estresse oxidativo, mais atividade gelatinolítica. Este panorama também já tinha sido demonstrado na literatura, fortalecendo nossos achados (74). Houve aumento das bandas de 72 e 64 kDa MMP-2, e também da 89 kDa MMP-9, nas aortas dos animais hipertensos quando a zimografia em gel foi utilizada. O SB290157 reduziu a atividade acentuada da MMP-2, mas não da MMP-9 nas aortas dos camundongos hipertensos. Como a MMP-9 é uma protease induzível, produzida em células inflamatórias, e o tratamento com SB290157 não reduziu a infiltração de linfócitos TCD4+ nos rins dos camundongos hipertensos, é bem provável que este antagonista também não reduza a atividade da MMP-9 nas aortas, supondo que haja maior infiltração inflamatória neste local. Como dito anteriormente, por limitação de material, não investigamos a quantidade de linfócitos TCD4+ nas aortas destes animais, mas há estudos mostrando que a MMP-9 pode estar presente no sistema cardiovascular durante a hipertensão (104).

Nas alterações morfofuncionais, os animais hipertensos tiveram aumento de CSA em relação aos grupos controles, o que está relacionado aos efeitos da Ang II e da MMP-2 nas CMLVs, o que aumenta também a M/L. Na fase aguda da hipertensão, a MMP-2 induz a mudança de fenótipo das CMLVs de contrátil para sintético, o que contribui para a migração e proliferação celular (44). O tratamento com o SB290157 reduziu o CSA elevado nos animais hipertensos, sugerindo que o C3a, provavelmente via MMP-2, contribui para hipertensão e para o desenvolvimento do remodelamento arterial hipertrófico. Nosso grupo mostrou que o tratamento de ratos hipertensos com doxiciclina, um inibidor de MMPs, reduziu a ação proteolítica da MMP-2 sob calponina-1, um marcador de diferenciação das CMLVs do fenótipo contrátil ao sintético. Este efeito reduziu o remodelamento arterial hipertrófico da fase aguda da hipertensão (107). O C3a também contribui para o aumento da proliferação das CMLVs via o fator de transcrição KLF-5 (16). Estas alterações estruturais nos animais hipertensos não estão necessariamente associadas à disfunção vascular neste tempo de hipertensão. Observamos maior hipercontratibilidade aórtica com a fenilefrina nos animais Ang II,

mas o tratamento com SB290157 não reduziu este efeito. Além disso, não houve alteração do efeito máximo da acetilcolina em provocar o relaxamento, embora tenha sido menos potente em relaxar a aorta dos animais hipertensos que em relação aos controles. O tratamento com SB290157 não alterou estas respostas. Em estudo realizado com camundongos duplo *knockout* para C3aR/C5aR foi visto uma atenuação do comprometimento do relaxamento dependente do endotélio em comparação aos controles com infusão de Ang II (11). Nossos dados embora tenham tendência parecida, não possuem diferença estatística, o que por ser explicado por estarmos inibindo apenas um receptor de maneira farmacológica.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

O sistema complemento, neste caso o C3a, participa de algumas alterações vasculares bioquímicas e morfofuncionais da hipertensão e no que tange a atividade das metaloproteinases (-2 e 9) e o antagonista do receptor C3a pode ser uma estratégia farmacológica interessante se usado para melhorar o remodelamento vascular.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS

1. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet (London, England)*. 2005 Jan;365(9455):217–23.
2. Schiffrin EL. Inflammation, immunity and development of essential hypertension. *Journal of hypertension*. 2014. 32(2):228–9.
3. Muller DN, Kvakana H, Luft FC. Immune-related effects in hypertension and target-organ damage. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2011 Mar. 20(2):113–7.
4. Dinh QN, Drummond GR, Sobey CG, Chrissobolis S. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. *BioMed Research International*. 2014;2014.
5. Caillon A, Schiffrin EL. Role of Inflammation and Immunity in Hypertension: Recent Epidemiological, Laboratory, and Clinical Evidence. *Current hypertension reports*. 2016 Mar 1.18(3):1–9.
6. Hajishengallis G, Lambris JD. More than complementing Tolls: Complement–Toll-like receptor synergy and crosstalk in innate immunity and inflammation. *Immunological reviews*. 2016 Nov 1274(1):233.
7. Harrison DG, Guzik TJ, Lob HE, Madhur MS, Marvar PJ, Thabet SR, et al. Inflammation, immunity, and hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex: 1979)*. 2011 Feb.57(2):132–40.
8. Barhoumi T, Kasal DA, Li MW, Shbat L, Laurant P, Neves MF, et al. T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension (Dallas, Tex: 1979) [Internet]*. 2011 Mar. 57(3):469–76.
9. Kvakana H, Kleinewietfeld M, Qadri F, Park JK, Fischer R, Schwarz I, et al. Regulatory T cells ameliorate angiotensin II-induced cardiac damage. *Circulation*. 2009 Jun 9;119(22):2904–12.

10. Yodoi K, Yamashita T, Sasaki N, Kasahara K, Emoto T, Matsumoto T, et al. Foxp3⁺ regulatory T cells play a protective role in angiotensin II-induced aortic aneurysm formation in mice. *Hypertension (Dallas, Tex: 1979)*. 2015 Apr 20;65(4):889–95.
11. Chen XH, Ruan CC, Ge Q, Ma Y, Xu JZ, Zhang ZB, et al. Deficiency of Complement C3a and C5a Receptors Prevents Angiotensin II-Induced Hypertension via Regulatory T Cells. *Circulation research*. 2018 Mar 30;122(7):970–83.
12. Dunkelberger JR, Song WC. Complement in host immunity 34 Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research*. 2010;20(1):34–50.
13. Markiewski MM, Lambris JD. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *The American journal of pathology*. 2007 ;171(3):715–27.
14. Kolev M, le Friec G, Kemper C. Complement--tapping into new sites and effector systems. *Nature reviews Immunology*. 2014 Dec 11;14(12):811–20.
15. Doca WH, W van der TW, Paz-Artal E, Li MO, Heeger PS. Signaling through C5a receptor and C3a receptor diminishes function of murine natural regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2013 Feb;210(2):257–68.
16. Han Y, Fukuda N, Ueno T, Endo M, Ikeda K, Xueli Z, et al. Role of Complement 3a in the Synthetic Phenotype and Angiotensin II-Production in Vascular Smooth Muscle Cells From Spontaneously Hypertensive Rats. *American Journal of Hypertension*. 2012 Mar;25(3):284.
17. Lillegard KE, Loeks-Johnson AC, Opacich JW, Peterson JM, Bauer AJ, Elmquist BJ, et al. Differential Effects of Complement Activation Products C3a and C5a on Cardiovascular Function in Hypertensive Pregnant Rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2014 Nov 1.351(2):344.
18. Simone S, Rascio F, Castellano G, Divella C, Chieti A, Ditonno P, et al. Complement-dependent NADPH oxidase enzyme activation in renal

- ischemia/reperfusion injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014 Sep 1; 74:263–73.
19. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacological reviews*. 2007 Sep. 59(3):251–87.
 20. Collard CD, Väkevä A, Morrissey MA, Agah A, Rollins SA, Reenstra WR, et al. Complement Activation after Oxidative Stress: Role of the Lectin Complement Pathway. *The American Journal of Pathology*. 2000;156(5):1549.
 21. Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2004 Oct 30;37(8):1263–73.
 22. Ferroni P, Basili S, Paoletti V, Davì G. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD*. 2006 16(3):222–33.
 23. Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovascular research*. 2006 Feb 15.69(3):614–24.
 24. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochemistry and cell biology*. 2004 Oct;122(4):339–52.
 25. Belo VA, Guimarães DA, Castro MM. Matrix Metalloproteinase 2 as a Potential Mediator of Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Chronic Vascular Remodeling in Hypertension. *Journal of vascular research*. 2015 Mar 1;52(4):221–31.
 26. Schulz R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2007. 47:211–42.

27. Viappiani S, Nicolescu AC, Holt A, Sawicki G, Crawford BD, León H, et al. Activation and modulation of 72kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione. *Biochemical pharmacology*. 2009 Mar 1;77(5):826–34.
28. Blascke de Mello MM, Parente JM, Schulz R, Castro MM. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation by oxidative stress decreases aortic calponin-1 levels during hypertrophic remodeling in early hypertension. *Vascular pharmacology*. 2019 May 1 116:36–44.
29. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiological reviews*. 2007 Oct;87(4):1285–342.
30. Castro MM, Cena J, Cho WJ, Walsh MP, Schulz R. Matrix Metalloproteinase-2 Proteolysis of Calponin-1 Contributes to Vascular Hypocontractility in Endotoxemic Rats. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2012 Mar;32(3):662–8.
31. Parente JM, Pereira CA, Oliveira-Paula GH, Tanus-Santos JE, Tostes RC, Castro MM. Matrix Metalloproteinase-2 Activity is Associated with Divergent Regulation of Calponin-1 in Conductance and Resistance Arteries in Hypertension-induced Early Vascular Dysfunction and Remodelling. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2017 Oct 1 121(4):246–56.
32. Belo VA, Parente JM, Tanus-Santos JE, Castro MM. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 decreases calponin-1 levels and contributes to arterial remodeling in early hypertension. *Biochemical pharmacology* 2016 Oct 15 118:50–8.
33. Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Current hypertension reports*. 2010 Apr 12(2):135–42.
34. Ren W, Liu Y, Wang X, Piao C, Ma Y, Qiu S, et al. The Complement C3a - C3aR Axis Promotes Development of Thoracic Aortic Dissection via Regulation of MMP2 Expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)* 2018 Jan 24;200(5):ji1601386.
35. 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 Radical Biology and Medicine*. 2009 May 1;46(9):1298–307.
36. Pereira SC, Parente JM, Belo VA, Mendes AS, Gonzaga NA, do Vale GT, et al. Quercetin decreases the activity of matrix metalloproteinase-2 and ameliorates vascular remodeling in renovascular hypertension. *Atherosclerosis*. 2018 Mar 1;270:146–53.
 37. Breuss JM, Atanasov AG, Uhrin P. Resveratrol and Its Effects on the Vascular System. *International journal of molecular sciences*. 2019 Apr 1;20(7).
 38. Care AS, Sung MM, Panahi S, Gragasin FS, Dyck JR, Davidge ST, et al. Perinatal Resveratrol Supplementation to Spontaneously Hypertensive Rat Dams Mitigates the Development of Hypertension in Adult Offspring. *Hypertension (Dallas, Tex: 1979)*. 2016 May 1 67(5):1038–44.
 39. Komolova M, Friberg P, Adams MA. Altered Vascular Resistance Properties and Acute Pressure-Natriuresis Mechanism in Neonatal and Weaning Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* 2012 May 59(5):979–84.
 40. Lim J, Iyer A, Suen JY, Seow V, Reid RC, Brown L, et al. C5aR and C3aR antagonists each inhibit diet-induced obesity, metabolic dysfunction, and adipocyte and macrophage signaling. *The FASEB Journal* 2013 Feb 1 27(2):822–31.
 41. Zhang, C., Li, Y., Wang, C., Wu, Y., Cui, W., Miwa, T., Sato, S., Li, H., Song, W. C., & Du, J. (2014). Complement 5a receptor mediates angiotensin II-induced cardiac inflammation and remodeling. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 34(6), 1240–1248.
 42. Pekna, M., Stokowska, A. & Pekny, M. Targeting Complement C3a Receptor to Improve Outcome After Ischemic Brain Injury. *Neurochem Res* 46, 2626–2637 (2021).
 43. Iulita, M. F., Duchemin, S., Vallerand, D., Barhoumi, T., Alvarez, F., Istomine, R., Laurent, C., Youwakim, J., Paradis, P., Arbour, N., Piccirillo, C. A., Schiffrin, E. L., & Girouard, H. (2019). CD4⁺ Regulatory T Lymphocytes Prevent Impaired

- Cerebral Blood Flow in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Journal of the American Heart Association*, 8(1), e009372.
44. Moreau, P., d'Uscio, L. V., Shaw, S., Takase, H., Barton, M., & Lüscher, T. F. (1997). Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET(A)-receptor antagonist. *Circulation*, 96(5), 1593–1597.
 45. Mahase E. Hypertension: 76 million deaths could be averted by 2050 if treatment coverage improves, says WHO BMJ 2023; 382.
 46. Van Beusecum, J. P., Barbaro, N. R., McDowell, Z., Aden, L. A., Xiao, L., Pandey, A. K., Itani, H. A., Himmel, L. E., Harrison, D. G., & Kirabo, A. (2019). High Salt Activates CD11c⁺ Antigen-Presenting Cells via SGK (Serum Glucocorticoid Kinase) 1 to Promote Renal Inflammation and Salt-Sensitive Hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 74(3), 555–563.
 47. Nunes, K. P., de Oliveira, A. A., Lima, V. V., & Webb, R. C. (2019). Toll-Like Receptor 4 and Blood Pressure: Lessons From Animal Studies. *Frontiers in physiology*, 10, 655.
 48. Biancardi, V. C., Bomfim, G. F., Reis, W. L., Al-Gassimi, S., & Nunes, K. P. (2017). The interplay between Angiotensin II, TLR4 and hypertension. *Pharmacological research*, 120, 88–96.
 49. Ward P. A. (2016). Complement: an unfinished symphony. *American journal of physiology. Renal physiology*, 311(1), F66–F67.
 50. Sumida, T., Naito, A. T., Nomura, S., Nakagawa, A., Higo, T., Hashimoto, A., Okada, K., Sakai, T., Ito, M., Yamaguchi, T., Oka, T., Akazawa, H., Lee, J. K., Minamino, T., Offermanns, S., Noda, T., Botto, M., Kobayashi, Y., Morita, H., Manabe, I., ... Komuro, I. (2015). Complement C1q-induced activation of β -catenin signalling causes hypertensive arterial remodelling. *Nature communications*, 6, 6241.
 51. Krishnan, S. M., Sobey, C. G., Latz, E., Mansell, A., & Drummond, G. R. (2014). IL-1 β and IL-18: inflammatory markers or mediators of hypertension?. *British journal of pharmacology*, 171(24), 5589–5602.

52. Ricklin, D., Mastellos, D. C., Reis, E. S., & Lambris, J. D. (2018). The renaissance of complement therapeutics. *Nature reviews. Nephrology*, *14*(1), 26–47.
53. Shughoury, A, Ciulla, T. The Complement System: A New Therapeutic Target. *Retina Today*. June 2023.
54. Iyer, A., Woodruff, T. M., Wu, M. C., Stylianou, C., Reid, R. C., Fairlie, D. P., Taylor, S. M., & Brown, L. (2011). Inhibition of inflammation and fibrosis by a complement C5a receptor antagonist in DOCA-salt hypertensive rats. *Journal of cardiovascular pharmacology*, *58*(5), 479–486.
55. Ji, H., Pai, A. V., West, C. A., Wu, X., Speth, R. C., & Sandberg, K. (2017). Loss of Resistance to Angiotensin II-Induced Hypertension in the Jackson Laboratory Recombination-Activating Gene Null Mouse on the C57BL/6J Background. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, *69*(6), 1121–1127.
56. Wenzel, U. O., Kemper, C., & Bode, M. (2021). The role of complement in arterial hypertension and hypertensive end organ damage. *British journal of pharmacology*, *178*(14), 2849–2862.
57. Kandasamy, A. D. (2010). “Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix.” *Cardiovascular Research* *85*(3), 413-423.
58. Ames, R. S., Lee, D., Foley, J. J., Jurewicz, A. J., Tornetta, M. A., Bautsch, W., Settmacher, B., Klos, A., Erhard, K. F., Cousins, R. D., Sulpizio, A. C., Hieble, J. P., McCafferty, G., Ward, K. W., Adams, J. L., Bondinell, W. E., Underwood, D. C., Osborn, R. R., Badger, A. M., & Sarau, H. M. (2001). Identification of a selective nonpeptide antagonist of the anaphylatoxin C3a receptor that demonstrates antiinflammatory activity in animal models. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *166*(10), 6341–6348.
59. Cau, S. B., Guimaraes, D. A., Rizzi, E., Ceron, C. S., Souza, L. L., Tirapelli, C. R., Gerlach, R. F., & Tanus-Santos, J. E. (2011). Pyrrolidine dithiocarbamate down-regulates vascular matrix metalloproteinases and ameliorates vascular dysfunction and remodelling in renovascular hypertension. *British journal of pharmacology*, *164*(2), 372–381.

60. Zhang, C., Li, Y., Wang, C., Wu, Y., Cui, W., Miwa, T., Sato, S., Li, H., Song, W. C., & Du, J. (2014). Complement 5a receptor mediates angiotensin II-induced cardiac inflammation and remodeling. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 34(6), 1240–1248.
61. Engström, G., Hedblad, B., Berglund, G., Janzon, L., & Lindgärde, F. (2007). Plasma levels of complement C3 is associated with development of hypertension: a longitudinal cohort study. *Journal of human hypertension*, 21(4), 276–282.
62. Walport M. J. (2001). Complement. Second of two parts. *The New England journal of medicine*, 344(15), 1140–1144.
63. Noris, M., & Remuzzi, G. (2013). Overview of complement activation and regulation. *Seminars in nephrology*, 33(6), 479–492.
64. Luft, F. C., Dechend, R., & Müller, D. N. (2012). Immune mechanisms in angiotensin II-induced target-organ damage. *Annals of medicine*, 44 Suppl 1, S49–S54.
65. Jia, L. X., Qi, G. M., Liu, O., Li, T. T., Yang, M., Cui, W., Zhang, W. M., Qi, Y. F., & Du, J. (2013). Inhibition of platelet activation by clopidogrel prevents hypertension-induced cardiac inflammation and fibrosis. *Cardiovascular drugs and therapy*, 27(6), 521–530
66. Zhai, P., Yamamoto, M., Galeotti, J., Liu, J., Masurekar, M., Thaisz, J., Irie, K., Holle, E., Yu, X., Kupersmidt, S., Roden, D. M., Wagner, T., Yatani, A., Vatner, D. E., Vatner, S. F., & Sadoshima, J. (2005). Cardiac-specific overexpression of AT1 receptor mutant lacking G alpha q/G alpha i coupling causes hypertrophy and bradycardia in transgenic mice. *The Journal of clinical investigation*, 115(11), 3045–3056.
67. Mehta, P. K., & Griendling, K. K. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American journal of physiology. Cell physiology*, 292(1), C82–C97.
68. Tieu, B. C., Lee, C., Sun, H., Lejeune, W., Recinos, A., 3rd, Ju, X., Spratt, H., Guo, D. C., Milewicz, D., Tilton, R. G., & Brasier, A. R. (2009). An adventitial IL-

- 6/MCP1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice. *The Journal of clinical investigation*, 119(12), 3637–3651.
69. Yao, L., Huang, K., Huang, D., Wang, J., Guo, H., & Liao, Y. (2008). Acute myocardial infarction induced increases in plasma tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 are associated with the activation of poly(ADP-ribose) polymerase of circulating mononuclear cell. *International journal of cardiology*, 123(3), 366–368.
70. Verma, S. K., Krishnamurthy, P., Barefield, D., Singh, N., Gupta, R., Lambers, E., Thal, M., Mackie, A., Hoxha, E., Ramirez, V., Qin, G., Sadayappan, S., Ghosh, A. K., & Kishore, R. (2012). Interleukin-10 treatment attenuates pressure overload-induced hypertrophic remodeling and improves heart function via signal transducers and activators of transcription 3-dependent inhibition of nuclear factor- κ B. *Circulation*, 126(4), 418–429.
71. Krishnamurthy, P., Rajasingh, J., Lambers, E., Qin, G., Losordo, D. W., & Kishore, R. (2009). IL-10 inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT3 and suppression of HuR. *Circulation research*, 104(2), e9–e18.
72. Morigi, M., Perico, L., Corna, D., Locatelli, M., Cassis, P., Carminati, C. E., Bolognini, S., Zoja, C., Remuzzi, G., Benigni, A., & Buelli, S. (2020). C3a receptor blockade protects podocytes from injury in diabetic nephropathy. *JCI insight*, 5(5), e131849.
73. Wang C, Qian X, Sun X, Chang Q. Angiotensin II increases matrix metalloproteinase 2 expression in human aortic smooth muscle cells via AT1R and ERK1/2. *Exp Biol Med* (Maywood). 2015 Dec;240(12):1564-71.
74. Prado, A. F., Pernomian, L., Azevedo, A., Costa, R. A. P., Rizzi, E., Ramos, J., Paes Leme, A. F., Bendhack, L. M., Tanus-Santos, J. E., & Gerlach, R. F. (2018). Matrix metalloproteinase-2-induced epidermal growth factor receptor transactivation impairs redox balance in vascular smooth muscle cells and facilitates vascular contraction. *Redox biology*, 18, 181–190.

75. Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology* (Bethesda). 2013 Nov;28(6):391-403.
76. Bode, M., Herrstadt, G. R., Dreher, L., Ehnert, N., Kirkerup, P., Lindenmeyer, M. T., Meyer-Schwesinger, C. F., Ehmke, H., Köhl, J., Huber, T. B., Krebs, C. F., Steinmetz, O. M., Wiech, T., & Wenzel, U. O. (2024). Deficiency of Complement C3a and C5a receptors Does Not Prevent Angiotensin II-Induced Hypertension and Hypertensive End-Organ Damage.
77. Santos-López, J., de la Paz, K., Fernández, F. J., & Vega, M. C. (2023). Structural biology of complement receptors. *Frontiers in immunology*, 14, 1239146.
78. WHO. Global report on hypertension: the race against a silent killer. ISBN: 978-92-4-008106-2.
79. Li, D., Wu, M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Sig Transduct Target Ther* 6, 291 (2021).
80. John P. Atkinson, Terry W. Du Clos, Carolyn Mold, Hrishikesh Kulkarni, Dennis Hourcade, Xiaobo Wu, 21. (2019). *The Human Complement System: Basic Concepts and Clinical Relevance*, Editor(s): Robert R. Rich, Thomas A. Fleisher, William T. Shearer, Harry W. Schroeder, Anthony J. Frew, Cornelia M. Weyand, Clinical Immunology. Elsevier,
81. Beltrame, M. H., Catarino, S. J., Goeldner, I., Boldt, A. B., & de Messias-Reason, I. J. (2015). The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. *Frontiers in pediatrics*, 2, 148.
82. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. New York: Garland Science; 2001. The complement system and innate immunity.
83. Basting, T., & Lazartigues, E. (2017). DOCA-Salt Hypertension: an Update. *Current hypertension reports*, 19(4), 32.

84. Wu KI, Schmid-Schönbein GW. Nuclear factor kappa B and matrix metalloproteinase induced receptor cleavage in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 2011
85. Prado, A. F., Pernomian, L., Azevedo, A., Costa, R. A. P., Rizzi, E., Ramos, J., Paes Leme, A. F., Bendhack, L. M., Tanus-Santos, J. E., & Gerlach, R. F. (2018). Matrix metalloproteinase-2-induced epidermal growth factor receptor transactivation impairs redox balance in vascular smooth muscle cells and facilitates vascular contraction. *Redox biology*, 18, 181–190.
86. Hao, L., Nishimura, T., Wo, H., & Fernandez-Patron, C. (2006). Vascular responses to alpha1-adrenergic receptors in small rat mesenteric arteries depend on mitochondrial reactive oxygen species. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26(4), 819–825.
89. Bao, X., Meng, G., Zhang, Q., Liu, L., Wu, H., Du, H., Shi, H., Xia, Y., Guo, X., Liu, X., Han, P., Dong, R., Wang, X., Li, C., Su, Q., Gu, Y., Fang, L., Yu, F., Yang, H., Kang, L., ... Niu, K. (2017). Elevated serum complement C3 levels are associated with prehypertension in an adult population. *Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y. : 1993)*, 39(1), 42–49.
90. Sen, S., Tarazi, R. C., Khairallah, P. A., & Bumpus, F. M. (1974). Cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Circulation research*, 35(5), 775–781.
91. Ruan, C. C., & Gao, P. J. (2019). Role of Complement-Related Inflammation and Vascular Dysfunction in Hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 73(5), 965–971.
92. Barhoumi, T., Kasal, D. A., Li, M. W., Shbat, L., Laurant, P., Neves, M. F., Paradis, P., & Schiffrin, E. L. (2011). T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 57(3), 469–476.
93. Pan Z. K. (1998). Anaphylatoxins C5a and C3a induce nuclear factor kappaB activation in human peripheral blood monocytes. *Biochimica et biophysica acta*, 1443(1-2), 90–98.

94. Siwik, D. A., Chang, D. L., & Colucci, W. S. (2000). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circulation research*, 86(12), 1259–1265.
95. Mountain, D. J., Singh, M., Menon, B., & Singh, K. (2007). Interleukin-1beta increases expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in cardiac microvascular endothelial cells: role of PKCalpha/beta1 and MAPKs. *American journal of physiology. Cell physiology*, 292(2), C867–C875.
96. Khafipour, A., Eissa, N., Munyaka, P. M., Rabbi, M. F., Kapoor, K., Kermarrec, L., Khafipour, E., Bernstein, C. N., & Ghia, J. E. (2020). Denosumab Regulates Gut Microbiota Composition and Cytokines in Dinitrobenzene Sulfonic Acid (DNBS)-Experimental Colitis. *Frontiers in microbiology*, 11, 1405.
97. Xiao, K., Jie, Y., Luo, M., & Long, Q. (2023). Cytological and functional effect of complement 3a on Human Scleral Fibroblasts. *Cutaneous and ocular toxicology*, 42(3), 137–143.
98. Park, Y. J., Woo, S. J., Kim, Y. M., Hong, S., Lee, Y. E., & Park, K. H. (2019). Immune and Inflammatory Proteins in Cord Blood as Predictive Biomarkers of Retinopathy of Prematurity in Preterm Infants. *Investigative ophthalmology & visual science*, 60(12), 3813–3820.
99. Kopaliani, I., Martin, M., Zatschler, B., Bortlik, K., Müller, B., & Deussen, A. (2014). Cell-specific and endothelium-dependent regulations of matrix metalloproteinase-2 in rat aorta. *Basic research in cardiology*, 109(4), 419.
100. McQuibban, G. A., Gong, J. H., Tam, E. M., McCulloch, C. A., Clark-Lewis, I., & Overall, C. M. (2000). Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5482), 1202–1206.
101. Van den Steen, P. E., Proost, P., Wuyts, A., Van Damme, J., & Opdenakker, G. (2000). Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood*, 96(8), 2673–2681.

102. Schaaf, B., Liebau, C., Kurowski, V., Droemann, D., & Dalhoff, K. (2008). Hospital acquired pneumonia with high-risk bacteria is associated with increased pulmonary matrix metalloproteinase activity. *BMC pulmonary medicine*, 8, 12.
103. Jones, T. K., Reilly, J. P., Anderson, B. J., Miano, T. A., Dunn, T. G., Weisman, A. R., Agyekum, R., Feng, R., Ittner, C. A. G., Shashaty, M. G. S., & Meyer, N. J. (2022). Elevated Plasma Levels of Matrix Metalloproteinase-3 and Tissue-Inhibitor of Matrix Metalloproteinases-1 Associate With Organ Dysfunction and Mortality in Sepsis. *Shock (Augusta, Ga.)*, 57(1), 41–47.
104. Okamoto, T., Akaike, T., Sawa, T., Miyamoto, Y., van der Vliet, A., & Maeda, H. (2001). Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *The Journal of biological chemistry*, 276(31), 29596–29602.
105. Lee HS, Kim WJ. The Role of Matrix Metalloproteinase in Inflammation with a Focus on Infectious Diseases. *Int J Mol Sci*. 2022 Sep 11;23(18):10546. doi: 10.3390/ijms231810546.
106. Castorena-Gonzalez, J. A., Staiculescu, M. C., Foote, C., & Martinez-Lemus, L. A. (2014). Mechanisms of the inward remodeling process in resistance vessels: is the actin cytoskeleton involved?. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 21(3), 219–229.
107. Parente, J. M., Pereira, C. A., Oliveira-Paula, G. H., Tanus-Santos, J. E., Tostes, R. C., & Castro, M. M. (2017). Matrix Metalloproteinase-2 Activity is Associated with Divergent Regulation of Calponin-1 in Conductance and Resistance Arteries in Hypertension-induced Early Vascular Dysfunction and Remodelling. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 121(4), 246–256.
108. Siasos, G., Tousoulis, D., Kioufis, S., Oikonomou, E., Siasou, Z., Limperi, M., Papavassiliou, A. G., & Stefanadis, C. (2012). Inflammatory mechanisms in atherosclerosis: the impact of matrix metalloproteinases. *Current topics in medicinal chemistry*, 12(10), 1132–1148.
109. Li, H., Liang, J., Castrillon, D. H., DePinho, R. A., Olson, E. N., & Liu, Z. P. (2007). FoxO4 regulates tumor necrosis factor alpha-directed smooth muscle cell

- migration by activating matrix metalloproteinase 9 gene transcription. *Molecular and cellular biology*, 27(7), 2676–2686.
110. Li, X. X., Kumar, V., Clark, R. J., Lee, J. D., & Woodruff, T. M. (2021). The "C3aR Antagonist" SB290157 is a Partial C5aR2 Agonist. *Frontiers in pharmacology*, 11, 591398.
 111. Grote, K., Flach, I., Luchtefeld, M., Akin, E., Holland, S. M., Drexler, H., & Schieffer, B. (2003). Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circulation research*, 92(11), e80–e86.
 112. Castro, M. M., Rizzi, E., Figueiredo-Lopes, L., Fernandes, K., Bendhack, L. M., Pitol, D. L., Gerlach, R. F., & Tanus-Santos, J. E. (2008). Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis*, 198(2), 320–331.
 113. Lalu, M. M., Cena, J., Chowdhury, R., Lam, A., & Schulz, R. (2006). Matrix metalloproteinases contribute to endotoxin and interleukin-1beta induced vascular dysfunction. *British journal of pharmacology*, 149(1), 31–42.
 114. Bond, M., Chase, A. J., Baker, A. H., & Newby, A. C. (2001). Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular research*, 50(3), 556–565.
 115. Fernandez-Patron, C., Radomski, M. W., & Davidge, S. T. (1999). Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circulation research*, 85(10), 906–911.
 116. Fernandez-Patron, C., Stewart, K. G., Zhang, Y., Koivunen, E., Radomski, M. W., & Davidge, S. T. (2000). Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. *Circulation research*, 87(8), 670–676.
 117. Sangwan, P., Quasimi, H., Sharma, J. G., Habib, M. A., & Alam, M. I. (2023). Role of Oxidative Stress and Genetic Polymorphism of Matrix Metalloproteinase-2

and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 in COPD. *Chronic obstructive pulmonary diseases (Miami, Fla.)*, 10.15326/jcopdf.2022.0370.

ANEXOS



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto



São Paulo, 06 de Outubro de 2023

Ilmo(a)

Dr(a). Michele Mazzaron de Castro

Certificamos que a proposta intitulada "Aumento no sistema complemento e redução de células T reguladoras podem aumentar a atividade da metaloproteinase de matriz (MMP)-2 e o remodelamento arterial na hipertensão", registrada com o nº 1204/2023, sob a responsabilidade de Michele Mazzaron de Castro, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do/a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em reunião realizada em 06 de Outubro de 2023.

Vigência da Autorização: 17/10/2023 a 17/10/2025						
Finalidade	Pesquisa					
Espécie	Linhagem	Idade	Peso	Quantidade		
				M	F	M+F
Camundongo	C57BL/6	50 dias	25.0 g	88	0	88
Origem: biotério - Instalação Animal da Prefeitura da USP do Campus de Ribeirão Preto				TOTAL	88	

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes
Coordenador/a da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa

Prof. Dra. Juliana Meola Lovato
Vice-Coodenador/a da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa