

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO – UNAERP  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA APLICADA À SAÚDE

GERMANO TREMILIOSI NETO

**PARTICIPAÇÃO DA MMP-2 NA DISFUNÇÃO AUTONÔMICA E  
REFLEXA DURANTE O ESTABELECIMENTO DA  
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA APÓS INFARTO AGUDO DO  
MIOCÁRDIO EM RATOS**

RIBEIRÃO PRETO - SP  
2023

GERMANO TREMILIOSI NETO

PARTICIPAÇÃO DA MMP-2 NA DISFUNÇÃO AUTONÔMICA E  
REFLEXA DURANTE O ESTABELECIMENTO DA INSUFICIÊNCIA  
CARDÍACA APÓS INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO EM RATOS

Tese apresentada a Universidade de Ribeirão Preto  
UNAERP, como requisito para a obtenção do título  
de Doutorado em Biotecnologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni

RIBEIRÃO PRETO - SP  
2023

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento  
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

TREMILIOSI NETO, Germano, 1978-  
T789p Participação da MMP-2 na disfunção autônoma e reflexa durante o  
estabelecimento da insuficiência cardíaca após infarto agudo do  
miocárdio em ratos / Germano Tremiliosi Neto. – Ribeirão Preto, 2023.  
43 f. : il. color.

Orientador: Prof.º Dr.º Renê de Oliveira Beleboni.

Tese (Doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,  
Doutorado em Biotecnologia, 2023.

1. Doxíciclina. 2. Infarto Agudo do Miocárdio. 3. Remodelamento  
cardiovascular. 4. Barorreflexo. II. Título.

**GERMANO TREMILIOSI NETO**

**PARTICIPAÇÃO DA MMP-2 NA DISFUNÇÃO AUTÔNOMICA E REFLEXA DURANTE O ESTABELECIMENTO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA APÓS INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO EM RATOS**


Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

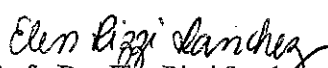
Data da defesa: 22 de setembro de 2023


Resultado: Aprovado

**BANCA EXAMINADORA**


Documento assinado digitalmente  
 RENE DE OLIVEIRA BELEBONI  
Data: 22/09/2023 14:13:45-0300  
Verifique em <https://notidat.br.gov.br>


Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni  
Presidente  
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP

  
Prof. Dra. Elen Rizzi Sanchez  
Agropecuária Rosa Mística

Documento assinado digitalmente  
 MARINA DE TOLEDO DURAND  
Data: 25/09/2023 07:57:21-0300  
Verifique em <https://notidat.br.gov.br>

Prof. Dra. Marina de Toledo Durand  
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

  
Prof. Dra. Ana Maria Soares Pereira  
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

Documento assinado digitalmente  
 EGIDI MAYARA FIRMINO SILVA  
Data: 22/09/2023 17:44:40-0300  
Verifique em <https://notidat.br.gov.br>

Prof. Dra. Egidi Mayara Firmino Silva  
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - UEMS

**RIBEIRÃO PRETO**  
**2023**

Dedico meu trabalho aos meus queridos pais, Germano Tremiliosi Filho e Elza Elizia Sperli Carvalho Tremiliosi, por estarem sempre ao meu lado prontificando apoio, carinho, compreensão, paciência e prece, amo vocês.

A minha esposa e grande amor, Lucília Macedo Mandú Tremiliosi, que foi paciente, compreensiva e dedicada, demonstrando sempre seu amor em todos os momentos de nossas vidas, principalmente durante este período, te amo.

Aos meus filhos, Rafael Germano Mandú Tremiliosi e Eduardo Germano Mandú Tremiliosi, razão de toda minha dedicação e persistência, obrigado pela paciência e compreensão nestes anos que se passaram e o principal, por trazerem sentido a minha vida, se cheguei até aqui, foi por vocês. Amo vocês acima de tudo.

**Obrigado!!!**

## **AGRADECIMENTOS**

A Profa. Dra. Élen Rizzi Sanchez pela orientação durante a realização deste trabalho e por ajudar no meu desenvolvimento como pesquisador. Muito obrigado pelo seu profissionalismo, paciência e dedicação nos momentos difíceis.

A Profa. Dra. Marina de Toledo Durand pela co-orientação durante a realização deste trabalho e por ajudar no meu desenvolvimento como pesquisador. Muito obrigado pelo seu profissionalismo, paciência e dedicação nos momentos difíceis.

À equipe do laboratório, Carla, Carlinhos, Gustavo, Thaís, Laura, Bruna, pelo profissionalismo, perrengues e amizade.

Ao Prof. Dr. Fernando Henrique Ferrari Alves e a Profa. Dra. Egidi Mayara Firmino Silva pelo apoio e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Hélio Cesar Salgado por permitir o uso de seu laboratório.

A todos de minha família, que sempre me incentivaram e me deram muito carinho.

A todos os funcionários do Departamento de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, pelo incentivo, profissionalismo, orientação, ajuda e amizade.

Aos Prof(s) Dr(s) do Departamento de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto por contribuírem com minha formação, pelo profissionalismo, orientação e amizade.

A Universidade de Ribeirão Preto, por ceder o espaço físico e infraestrutura e condições para que este trabalho fosse realizado.

## RESUMO

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é acompanhado por intenso remodelamento cardíaco e como consequência pode levar à insuficiência cardíaca (IC) e a alterações autonômicas como a hiperativação simpática e redução da atividade parassimpática. A formação do estresse oxidativo é um dos mecanismos responsáveis pela hiperativação simpática na IC e é o principal fator de ativação das metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) que participam do remodelamento ventricular pós-IAM. O objetivo deste estudo foi avaliar se a inibição da MMP-2 promove alterações hemodinâmicas e nas respostas autonômicas reflexas frente a ativação barorreceptora em ratos com IC após o IAM. Foram utilizados ratos Wistar, randomizados nos seguintes grupos: 1) Ratos sham; 2) Ratos com IC induzida por infarto agudo do miocárdio; 3) Ratos com IC induzida por infarto agudo do miocárdio e 4) Ratos com IC induzida por infarto agudo do miocárdio tratados doxíciclina. O modelo de IC induzido por IAM foi produzido pela ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda. Os ratos sham foram submetidos a mesma cirurgia, porém sem a ligadura arterial. A doxíciclina foi administrada diariamente (30 mg/Kg/dia, p.o.) iniciando 24h após a cirurgia do IAM e mantido por 4 semanas. Ao final do tratamento, os ratos foram submetidos a um exame ecocardiográfico e posteriormente tiveram a artéria e veia femoral canuladas. Após 24 horas, o registro dos parâmetros hemodinâmicos basais, pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC), foram realizados com os animais acordados para análise da sensibilidade barorreflexa espontânea, e induzida por drogas vasoativas (fenilefrina e nitroprussiato). O coração, arco da aorta, aorta abdominal e o bulbo foram coletados para avaliar a atividade das MMPs por zimografia em gel e o remodelamento, por técnicas histológicas para a quantificação da área de secção transversal. Os resultados da ecocardiografia demonstraram que o tratamento com doxíciclina não foi capaz de melhorar nenhum parâmetro associado a morfologia ou funções sistólicas do ventrículo esquerdo nos animais infartados ( $p > 0,05$ ). Em relação à área de secção transversal, o IAM promoveu diminuição na espessura da parede ventricular esquerda ( $p < 0,05$ ) que não foi aumentada pelo tratamento com doxíciclina, porém a doxíciclina atenuou de maneira significativa a hipertrofia cardíaca encontrada nos animais infartados ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos e os tratamentos para espessura média do septo intraventricular ( $p > 0,05$ ). Na atividade barorreflexa, o IAM também reduziu significativamente o índice de efetividade barorreflexa, ( $p < 0,05$ ) e não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). Já para o ganho barorreflexo, observou-se que os animais com IAM exibiram diminuição da sensibilidade do barorreflexo e que o tratamento com a doxíciclina impediu essa alteração de maneira significativa ( $p > 0,05$ ). Em relação a efetividade do barorreflexo induzido por drogas vasoativas, não foi possível detectar diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os grupos em relação a curva taquicárdica, porém na curva bradicárdica, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) somente entre os animais infartados em relação aos sham. Os géis de zimografia do coração revelaram bandas de MMP-2 e que houve um aumento significativo da expressão da MMP-2 nos animais infartados quando comparados aos sham ( $p < 0,05$ ), porém a doxíciclina não atenuou a atividade encontrada nos animais infartados ( $p > 0,05$ ). Os géis de zimografia do arco da aorta e da aorta abdominal também revelaram bandas de MMP-2, porém não houve diferença significativa da expressão da MMP-2 entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Nenhuma banda de MMP-2 foi encontrada no gel de zimografia do bulbo, mas foi possível observar bandas da MMP-9, que mostram uma tendência, ainda que não significativa, de estar aumentada no bulbo de animais infartados. Em conclusão, foram evidenciados efeitos positivos da doxíciclina na morfologia cardíaca, e ganho barorreflexo espontâneo pós IAM e embora

a MMP-2 tenha sido estudada no contexto de doenças cardiovasculares, a relação direta entre a MMP-2 e a regulação do barorreflexo continua sendo uma área que requer mais investigação, com grande potencial para ferramenta terapêutica para a prática clínica.

Palavras-chave: Doxíciclina. Infarto agudo do miocárdio. Metaloproteinase da matriz extracelular. Remodelamento cardiovascular. Barorreflexo.



## ABSTRACT

Acute myocardial infarction (AMI) is accompanied by intense cardiac remodeling and, therefore can lead to heart failure (HF) and autonomic changes such as sympathetic hyperactivation and reduced parasympathetic activity. The formation of oxidative stress is one of the controls responsible for sympathetic hyperactivation in HF and is the main factor of activation of extracellular matrix metalloproteinases (MMPs) that participate in post-AMI ventricular remodeling. The aim of this study was to evaluate whether the influence of MMP-2 promotes changes in hemodynamics and in reflex autonomic responses to baroreceptor activation in rats with HF after AMI. Wistar rats were used, randomized into the following groups: 1) sham rats; 2) Rats with HF induced by acute myocardial infarction; 3) Rats with HF induced by acute myocardial infarction and 4) Rats with HF induced by acute myocardial infarction treated with doxycycline. The AMI-induced HF model was produced by ligation of the left anterior descending coronary artery. Sham rats were admitted to the same surgery, but without arterial ligation. Doxycycline was administered daily (30 mg/Kg/day, p.o.) starting 24 hours after AMI surgery and maintained for 4 weeks. At the end of treatment, the rats were submitted to an echocardiographic examination and subsequently had a femoral vein cannulated. After 24 hours, the recording of baseline hemodynamic parameters, blood pressure (BP) and heart rate (HR), were performed with the animals awake for analysis of spontaneous baroreflex sensitivity and induced by vasoactive drugs (phenylephrine and nitroprusside). The heart, aortic arch, abdominal aorta and medulla oblongata were collected to assess MMP activity by gel zymography and the remodeling by histological techniques to quantify the cross-sectional area. The echocardiography results showed that treatment with doxycycline was not able to improve any parameter associated with the morphology or systolic functions of the left ventricle in the infarcted animals ( $p > 0,05$ ). Regarding the cross-sectional area, AMI promoted a decrease in left ventricular wall thickness ( $p < 0,05$ ) that was not increased by treatment with doxycycline, but doxycycline significantly attenuated the cardiac hypertrophy found in infarcted animals ( $p < 0,05$ ). There was no significant difference between groups and treatments for the mean intraventricular septal thickness ( $p > 0,05$ ). In the baroreflex activity, AMI also significantly reduced the baroreflex effectiveness index ( $p < 0,05$ ) and there was no significant difference between treatments ( $p > 0,05$ ). As for baroreflex gain, it was observed that animals with AMI exhibited a decrease in baroreflex sensitivity and that treatment with doxycycline significantly prevented this change ( $p > 0,05$ ). Regarding the effectiveness of the baroreflex induced by vasoactive drugs, it was not possible to detect significant differences ( $p > 0,05$ ) between the groups in relation to the tachycardic slope, but in the bradycardic slope, there was a significant difference ( $p < 0,05$ ) only between infarcted animals compared to sham. Heart zymography gels revealed MMP-2 bands and that there was a significant increase in MMP-2 expression in infarcted animals when compared to sham ( $p < 0,05$ ), but doxycycline did not attenuate the activity found in infarcted animals ( $p > 0,05$ ). Aortic arch and abdominal aorta zymography gels also revealed MMP-2 bands, but there was no significant difference in MMP-2 expression between groups ( $p > 0,05$ ). No MMP-2 band was found in the medulla oblongata zymography gel, but it was possible to observe MMP-9 bands, which show a non-significant tendency, to be increased in the medulla oblongata of infarcted animals. In conclusion, positive effects of doxycycline on cardiac morphology and spontaneous baroreflex gain after AMI were evidenced, and although MMP-2 has been studied in the context of cardiovascular diseases, the direct relationship between MMP-2 and baroreflex regulation remains an issue area that requires further investigation, with great potential for a therapeutic tool for clinical practice.

Keywords: Doxycycline. Acute myocardial infarction. Cardiovascular remodeling. Extracellular matrix metalloproteinases. Autonomic and reflex modulation. Baroreflex.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estruturas que participam do barorreflexo.....	3
Figura 2 - Alterações reflexas e autonômicas na insuficiência.....	4
Figura 3 - A cicatrização do miocárdio.....	8
Figura 4 - Efeito do tratamento com doxiciclina sobre o índice de hipertrofia cardíaca, espessura da parede ventricular esquerda e espessura do septo intraventricular.....	20
Figura 5 - Efeito do tratamento com doxiciclina sobre o índice de efetividade barorreflexa e ganho de resposta barorreflexa.....	21
Figura 6- Curva de regressões lineares do barorreflexo dos grupos, ratos sham, ratos sham+doxi, IAM e IAM+doxi.....	22
Figura 7 - Efeitos do tratamento com doxiciclina sobre a expressão da MMP-2 no bulbo.....	23
Figura 8 - Efeitos do tratamento com doxiciclina sobre a expressão da MMP-2 no coração.....	23
Figura 9 - Efeitos do tratamento com doxiciclina sobre a expressão da MMP-2 no Aorta abdominal.....	24
Figura 10 - Efeitos do tratamento com doxiciclina sobre a expressão da MMP-2 na aorta arco da aorta.....	25

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Avaliação ecocardiográfica mostrando os parâmetros em MODO M de espessura do septo intraventricular na diástole (mm-IVS;d), espessura do septo intraventricular na sístole (mm-IVS;s), diâmetro diastólico (mm-LVID;d), diâmetro sistólico (mm-LVID;s), espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (mm-LVPW;d), espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole (mm-LVPW;s), fração de ejeção (%-EF), fração de encurtamento (%-FS), massa ventricular esquerda (mg-LV Mass), massa ventricular esquerda corrigida (mg-LV Mass corrected), volume diastólico ventricular esquerdo (uL-LV Vol;d), volume sistólico ventricular esquerdo (uL-LV Vol;s), Frequência cardíaca (BPM-FC) e débito cardíaco calculado (mL/min-CO calculated).....	19
Tabela 02 - Valores de média e EPM do Ganho barorreflexo das respostas taquicárdicas e bradicárdicas, correlação entre as alterações de PAM para 10, 20, 30 e 40 mmHg e os respectivos valores de FC dos grupos ratos sham, ratos sham+doxi, IAM e IAM+doxi.....	22

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
AST	Área de secção transversal
BEI	Efetividade barorreflexa
BPM	Batimentos por minuto
CO calculated	Débito cardíaco calculado
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EF	Fração de ejeção
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
FC	Frequência cardíaca
FDA	US Food and drug administration
FS	Fração de encurtamento
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IC	Insuficiência cardíaca
IP	Intervalo de pulso
IVS;d	Espessura do septo intraventricular na diástole
IVS; s	Espessura do septo intraventricular na sístole
LVID;d	Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
LVID;s	Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
LV Mass	Massa ventricular esquerda
LVPW;d	Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole
LVPW;s	Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole
LV Vol;d	Volume diastólico ventricular esquerdo
LV Vol;s	Volume sistólico ventricular esquerdo
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase da matriz extracelular

NADPH	$\beta$ -Nicotinamida adenosina dinucleotído fosfato
NO	Óxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintase
NTS	Núcleo do trato solitário
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PNA	Peptídeo natriurético atrial
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
TMZ	Trimetazidina
2R1C	2 rins 1 clipe

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 IMPORTÂNCIA DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO E DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA .....	1
1.2 ALTERAÇÕES AUTONÔMICAS E REFLEXAS NO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO E INSUFICIÊNCIA CARDÍACA.....	2
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO .....	5
1.4 METALOPROTEINASES DA MATRIZ EXTRACELULAR (MMPS).....	7
1.5 INIBIÇÃO DAS METALOPROTEINASES DA MATRIZ EXTRACELULAR (MMPS) POR DOXICICLINA COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA.....	9
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>11</b>
<b>2. HIPÓTESE</b> .....	<b>12</b>
<b>4. OBJETIVO</b> .....	<b>13</b>
<b>5. MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
5.1. ANIMAIS, PROCEDIMENTO CIRÚRGICO (INFARTO DO MIOCÁRDIO) E TRATAMENTOS.....	14
5.2. ANÁLISE DA FUNÇÃO CARDÍACA (ECOCARDIOGRAFIA).....	15
5.3. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO CORAÇÃO, COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	15
5.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BARORREFLEXA E ANÁLISE DOS DADOS .....	16
5.5. EXPRESSÃO DA MMP-2 NO CORAÇÃO, AORTA ABDOMINAL E SNC (BULBO), COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	17
5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	18
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>18</b>
6.1. EFEITOS DA DOXICICLINA SOBRE AS ALTERAÇÕES CARDÍACAS AVALIADAS POR ECOCARDIOGRAFIA.....	18
6.2. EFEITOS DA DOXICICLINA SOBRE O REMODELAMENTO CARDÍACO DECORRENTE DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO .....	19
6.3 EFEITOS DA DOXICICLINA SOBRE O ÍNDICE DE EFETIVIDADE BARORREFLEXA E O GANHO NA RESPOSTA BARORREFLEXA.....	20
6.4 EFEITOS DA DOXICICLINA SOBRE EFETIVIDADE DO BARORREFLEXO INDUZIDO POR DROGAS VASOATIVAS.....	21
6.5. EFEITOS DA DOXICICLINA SOBRE A ATIVIDADE DA MMP-2 NO BULBO .....	22
6.6. EFEITOS DA DOXICICLINA SOBRE A ATIVIDADE DA MMP-2 NO MIOCÁRDIO .....	23

6.7. EFEITOS DA DOXICICLINA SOBRE A ATIVIDADE DA MMP-2 NA AORTA	24
6.8. EFEITOS DA DOXICICLINA SOBRE A ATIVIDADE DA MMP-2 NO ARCO DA AORTA.....	24
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>34</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Importância do infarto agudo do miocárdio e da insuficiência cardíaca

O infarto agudo do miocárdio (IAM), é uma das doenças cardiovasculares de maior importância para a saúde pública, sendo responsável pela maior incidência de mortes no Brasil e no mundo, inclusive de maneira prematura, impactando economicamente famílias e sistemas de saúde (MALTA *et al.*, 2014; OECD, 2021; SALARI *et al.*, 2023). No Brasil, ocorrem de 300 mil a 400 mil casos anuais de infarto e que a cada 5 a 7 casos, um óbito, o qual é associado aos fatores de risco como a obesidade, alto consumo de bebidas alcoólicas, tabagismo e hipertensão (SANTOS *et al.*, 2018; BRASIL, 2023). O IAM é definido patologicamente como morte celular miocárdica devido a isquemia, após a oclusão coronariana em decorrência da formação de trombos (THYGESEN *et al.*, 2018; BRASIL, 2023). As primeiras alterações observadas são, a redução do glicogênio celular, relaxamento das miofibrilas e desarranjo no sarcolema. Posteriormente, são observadas anormalidades mitocondriais progressivas, as quais podem ocasionar necrose dos miócitos e provocam mudanças estruturais na parede do miocárdio, resultando em alterações morfológicas do ventrículo esquerdo. Esse processo é conhecido como remodelamento cardíaco, o qual consiste na substituição dos cardiomiócitos mortos por uma cicatriz de colágeno permanente, denominada fibrose (TALMAN, 2016). Após o estresse cardíaco, eventos compensatórios ocorrem no miocárdio e contribuem para disfunção do ventrículo esquerdo e a progridem para insuficiência cardíaca (IC) (SPINALE, 2007).

A IC, que comumente coexiste com doenças isquêmicas do coração em consequência do comprometimento da ação deste órgão como bomba de sustentação da circulação (CONRAD *et al.*, 2017), devido a anormalidades estruturais ou funcionais causadas pelo IAM e a associada disfunção ventricular esquerda, torna-se uma síndrome clínica complexa de sintomas e sinais como, dispneia, fadiga e edema decorrentes da congestão pulmonar e sistêmica (AMBROSY *et al.*, 2014).

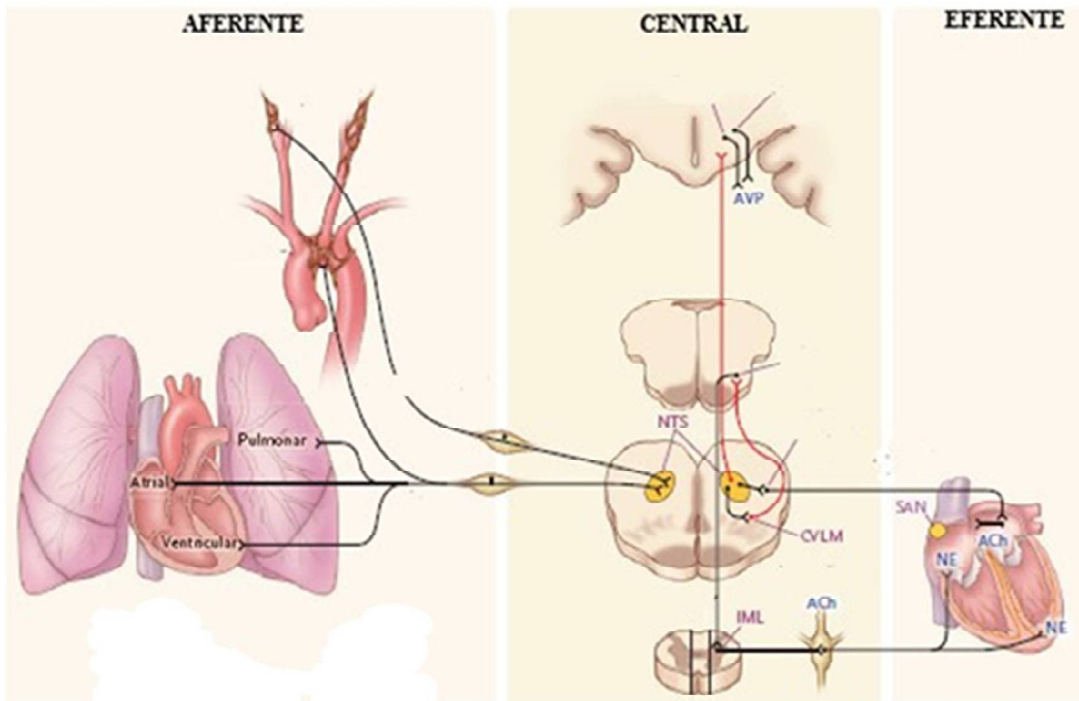
## **1.2 Alterações autonômicas e reflexas no infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca**

Alterações neuro-humorais significativas como a ativação do sistema nervoso simpático, expresso como o aumento dos níveis de catecolaminas circulantes, e do sistema renina-angiotensina estão presentes em pacientes que sofreram IAM, assim como alto nível sérico de peptídeo natriurético atrial (PNA) que pode neutralizar os efeitos dos sistemas vasoconstritores. Esta ativação é uma resposta compensatória para preservar a homeostase circulatória, porém cronicamente pode ser deletéria e está expressivamente relacionada com um prognóstico adverso, sendo determinantes no desenvolvimento da IC (FRENNEAUX, 2004).

Além disso, na IC são observadas alterações no controle barorreflexo arterial, no reflexo cardiopulmonar e no quimiorreflexo, os quais contribuem para agravar ainda mais a disfunção autonômica e ventricular (FRENNEAUX, 2004).

Em condições normais, o sistema nervoso autônomo fornece controle momento a momento da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) por meio de barorreflexos (GUYENET, 2006). O controle barorreflexo atua por intermédio de receptores sensíveis ao estiramento, ativados quando a PA e/ou volume sanguíneo aumentam. São encontrados nas paredes do arco aórtico e do seio carotídeo e permitem que o sistema circulatório se adapte diversas situações cotidianas, mantendo a PA, a FC e o volume sanguíneo dentro de uma faixa fisiológica finamente delimitada. Os barorreceptores sinalizam continuamente o núcleo do trato solitário (NTS), localizado no tronco encefálico, através dos nervos vago e glossofaríngeo (Figura 1). Após sua estimulação, os neurônios do NTS seguem em direção ao núcleo dorsal motor do vago e núcleo ambíguo, que aumentam o tônus vagal no coração e reduzem a FC. Além disso, os neurônios do NTS também atuam no bulbo ventrolateral caudal que inibe o bulbo ventrolateral rostral, reduzindo o tônus simpático no coração e nos vasos (THOMAS, 2011). Para conter o aumento, os barorreceptores evocam inibição reflexa de sinais simpáticos eferentes, causando vasodilatação, diminuição da FC, do volume sistólico, do débito cardíaco e consequentemente da PA. Quando as vias do barorreflexo são danificadas, esses ritmos fisiológicos são perdidos ou atenuados (HAINSWORTH, 2014).

**Figura 01** -Estruturas envolvidas no barorreflexo. Neurônios sensoriais aferentes de barorreflexo com receptores no arco da aorta, seios carotídeos e no coração, nos gânglios nodoso e petroso dos nervos glossofaríngeo e vago que realizam sinapse com neurônios na medula oblonga (bulbo) do tronco encefálico no núcleo do trato solitário (NTS). ACh denota acetilcolina, IML coluna celular intermedio lateral, norepinefrina NE, nó sinoatrial SAN e medula ventrolateral caudal CVLM.



**Fonte:** Modificado de KAUFMANN *et al.*, 2020

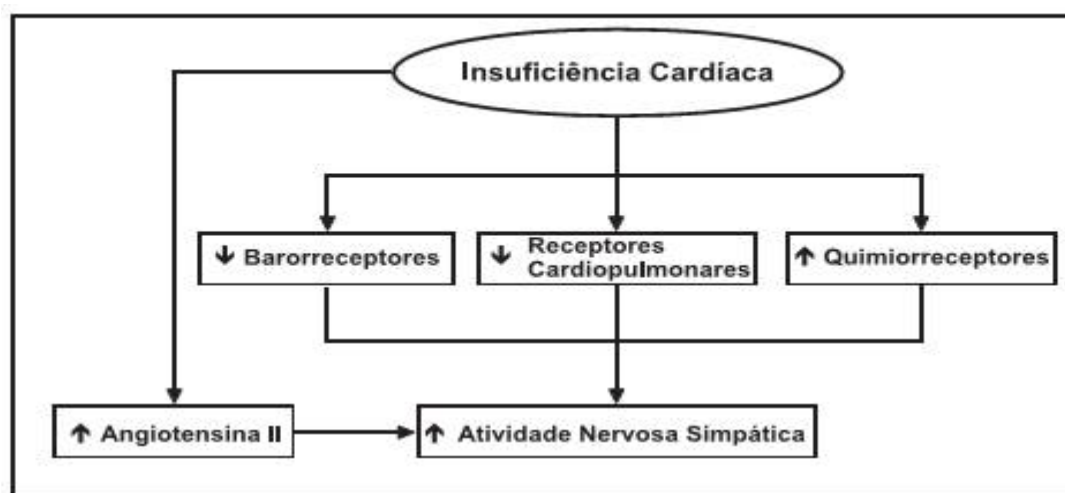
Devido a redução da sensibilidade do barorreflexo ocasionada pela IC, há uma ativação neuro-humoral permanente ocasionando um aumento do tônus simpático por meio do aumento dos níveis séricos de catecolaminas, diminuição do tônus parassimpático e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona que contribuem para o aumento da FC, do volume sistólico, do retorno venoso e da resistência vascular periférica (GADEMAN *et al.*, 2008; MORTARA *et al.*, 1997). O controle do reflexo cardiopulmonar também está sensivelmente alterado nos pacientes com IC, apresentando redução da sensibilidade nervosa simpática reflexa em resposta ao volume de enchimento cardíaco. Além disso, esses pacientes apresentam comprometimento na resposta vascular, sendo no aumento ou diminuição da pré-carga, as quais também estão relacionadas à diminuição da sensibilidade deste reflexo (MODESTI *et al.*, 2004).

O controle do quimiorreflexo pode estar profundamente alterado nos pacientes acometidos pela IC, contribuindo para a hiperativação simpática. A hiperestimulação de quimiorreceptores centrais e periféricos provocam um aumento exagerado na ventilação

pulmonar e na atividade nervosa simpática em indivíduos com IC (ALVES *et al.*, 2012; SABINO *et al.*, 2013). A hipersensibilidade dos quimiorreceptores na IC parece estar relacionada com o aumento da concentração de angiotensina II, que por sua vez, acentua a sensibilidade do quimiorreceptor periférico, aumenta a atividade nervosa simpática e ativa e promove o aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO). A consequência disso pode ser uma maior elevação da atividade nervosa simpática (CORRÊA *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2007, 2004). Além disso, a angiotensina II, aldosterona e vasopressina também contribuem para a retenção de sal e água na IC. A angiotensina II tem sido implicada na progressão da IC descompensada e mais recentemente, foi demonstrado que aldosterona desempenha um papel importante na IC pela retenção de sódio e perda de potássio implicadas a fibrose miocárdica. Por fim, a vasopressina provoca retenção de fluidos, o que aumenta o volume sanguíneo e agrava a congestão cardíaca e a IC (NEGRÃO, 2008).

Dessa forma, a hiperativação simpática na IC é causada por diversos fatores dentre os quais estão as alterações dos reflexos barorreceptor, cardiopulmonar e quimiorreceptor que seguem para áreas comuns do tronco encefálico e se integram de forma a produzir efeitos aditivos. Isso ocorre uma vez que a hipersensibilidade quimiorreflexa pode contribuir para a diminuição do controle barorreflexo, e de forma inversa, a diminuição da sensibilidade barorreflexa pode colaborar para a elevação da atividade quimiorreflexa (Figura 2) (CORRÊA *et al.*, 2008).

**Figura 02** - Alterações reflexas e autonômicas na insuficiência cardíaca.



Fonte: CORRÊA *et al.*, 2008

### 1.3 Estresse oxidativo e sistema nervoso autônomo

O oxigênio é um componente importante para a respiração aeróbica e aproximadamente 95% é consumido como energia. Os outros 5% produzem metabólitos chamados de espécies reativas de oxigênio (ERO) (NAKAI, 2021). A geração de ERO é um processo fisiológico contínuo e cumpre funções biológicas relevantes como, fosforilação de proteínas, ativação de fatores de transcrição, apoptose e imunidade, por exemplo, todos dependentes de uma produção adequada de ERO, sendo que a presença destes precisam ser mantidas em um baixo nível e a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos (PIZZINO 2017).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) contém pelo menos um átomo de oxigênio e um ou mais elétrons desemparelhados, (JAKUBCZYK, 2020). Os principais radicais livres de oxigênio são, superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxila (OH) e inclusos como espécie reativa de nitrogênio (ERN) também o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO) (NAKAI, 2021). Em condições fisiológicas normais, há um equilíbrio entre a geração e a remoção de radicais livres do corpo e pequenas quantidades de ERO são formadas durante processos celulares regulares, entretanto em processos inflamatórios e patológicos e condições de estresse prolongado, ocorre o aumento de sua produção (JAKUBCZYK, 2020).

A interrupção do equilíbrio na homeostase celular é associada à degradação da saúde e as ERO têm sido intimamente associadas ao seu declínio. As ERO, inicialmente identificadas como subprodutos da atividade celular, têm sido ligadas a ruptura de macromoléculas como as proteínas, os lipídios e o DNA, causando efeitos deletérios na sobrevivência de células e em doenças, devido a sua alta reatividade (TAUFFENBERGER, 2021).

O encéfalo apresenta-se como o órgão mais afetado pelo estresse oxidativo. As membranas celulares cerebrais apresentam alta taxa de concentração de ácidos graxos poli-insaturados, os quais são afetados por ERO, que provocam reações em cadeia de peroxidação lipídica (HIROOKA *et al.*, 2010; ANGELOVA, 2018). Estudos apontam que o estresse oxidativo no sistema nervoso central é responsável por intervir no aumento do tônus simpático, que precede o desenvolvimento da hipertensão arterial e contribui para a redução da função cardíaca após o IAM (HIROOKA *et al.*, 2010; LINDLEY *et al.*, 2009; MA *et al.*, 2008; MÜNZEL *et al.*, 2015; XIA *et al.*, 2011; ANGELOVA, 2018). Sendo assim, o estresse oxidativo tornou-se um fator chave na patogênese de diversas

doenças cardiovasculares e nos danos de órgãos-alvo, começando nos estágios iniciais (HIROOKA *et al.*, 2010; MÜNZEL *et al.*, 2015).

Diversas evidências apontam que o aumento da angiotensina II é um dos principais mecanismos responsáveis pelo aumento da produção de ERO no sistema nervoso central agindo por meio de receptores AT1, os quais ativam a  $\beta$ -Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (HARRISON, 2009; HIROOKA *et al.*, 2010; XIA *et al.*, 2011; HAACK, 2015; MUNZEL *et al.*, 2015). Desse modo, a elevação da angiotensina II e, conseqüentemente, do estresse oxidativo nestas regiões são mediadores importante na ativação simpática, levando a desautonomia e contribuindo para um pior prognóstico nas doenças cardíacas (HAACK, 2015; HIROOKA *et al.*, 2010; KOBAYASHI *et al.*, 2014; MÜNZEL *et al.*, 2015; XIA *et al.*, 2011). Na IC, estudos mostram que o mecanismo de indução de ERO, por meio da ativação dos receptores AT1, ocorre principalmente na região do bulbo ventrolateral rostral e desempenham um papel importante na ativação do sistema nervoso simpático (GAO *et al.*, 2005; ZUCKER *et al.*, 2009)

Por outro lado, foi mostrado que ERO podem ser produzidas localmente na região dos barorreceptores, ou mesmo no sistema nervoso central, o que poderia produzir um efeito direto no reflexo barorreceptor, contribuindo para a desautonomia (LI *et al.*, 1996; SANTANA-FILHO *et al.*, 2014). No estudo de Li *et al.* (1996) foi observado que as ERO geradas no bulbo carotídeo de coelhos com aterosclerose reduziu a resposta do nervo do seio carotídeo à elevações da PA. Consistente com os achados prévios, a administração aguda intravenosa de vitamina C melhorou a sensibilidade barorreflexa em pacientes com IC, sugerindo participação do estresse oxidativo na atenuação do barorreflexo presente em pacientes com IC (NIGHTINGALE *et al.*, 2003)

Portanto, o sistema nervoso autônomo desempenha um papel importante na gênese e manutenção de taquiarritmias ventriculares por mecanismos que podem estar relacionados com o aumento na formação de ERO. Porém, ainda é incerto as vias de sinalização que são afetadas pelo estresse oxidativo e poderiam contribuir de maneira direta para a disfunção autonômica observada no IAM.

A ativação de metaloproteases da matriz extracelular (MMPs) é resultado do aumento na formação de angiotensina II e ERO em várias doenças (PRADO *et al.*, 2018), inclusive em situações de isquemia cardíaca, como ocorre no IAM, mas sua relação com a disfunção na atividade autonômica permanece por ser esclarecida.

## 1.4 Metaloproteínas da matriz extracelular (MMPs)

O coração possui uma capacidade muito limitada de regeneração após o IAM. As células destruídas são substituídas por uma cicatriz fibrótica, seguido pelo remodelamento do miocárdio periférico e, eventualmente, levando ao comprometimento da função cardíaca. O processo de remodelamento inclui espessamento (hipertrofia) e enrijecimento (fibrose) da parede do ventrículo esquerda (SUTTON, 2000; EYYUPKOCA *et al.*, 2022).

Nesta fase, o remodelamento cardíaco é chamado de adverso e envolve a produção excessiva de matriz extracelular (MEC), o que contribui para a alta morbidade e mortalidade em pacientes com infarto do miocárdio. As metaloproteínas da matriz extracelular (MMPs) regulam o processo de remodelação, facilitando a rotatividade da MEC e a sinalização inflamatória. Devido ao papel crítico que as MMPs desempenham durante o remodelamento cardíaco, há uma necessidade de entender melhor o mecanismo fisiopatológico das MMPs.

Níveis elevados de metaloproteinase da matriz correlacionam-se fortemente com disfunção ventricular esquerda (DELEON-PENNELL *et al.*, 2017). Estudos sobre IAM mostram que as MMPs são vitais em processos patológicos de IAM. Entre elas, a MMP-2 e a MMP-9, as quais são membros importantes da família das gelatinases, estão expressas abundantemente em placas ateroscleróticas (PRADO *et al.*, 2018). A matriz extracelular leva à ruptura e o derramamento de placas ateroscleróticas por seu efeito de degradação específico, resultando em infartos de tecidos e órgãos (ZHOU, 2019). Portanto, os níveis de expressão de MMP-2 e MMP-9 estão intimamente relacionados à ocorrência de IAM (ZHOU, 2019).

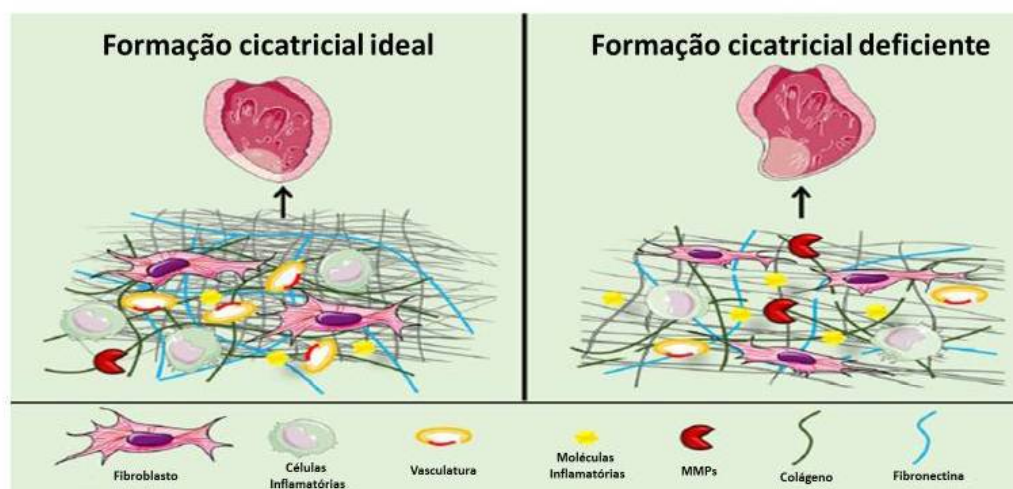
As MMPs possuem uma função fisiológica essencial por degradar as proteínas presentes na MEC de todos os tecidos corporais que participam de processos de remodelamento tecidual, porém é sua ativação excessiva que compromete a atribuição do órgão alvo, como por exemplo, o coração (VISSE, 2003; YAMAMOTO *et al.*, 2008). Após o IAM, as MMPs facilitam a degradação da MEC e recrutam células inflamatórias para remoção de cardiomiócitos necróticos as quais contribuem para ativar ainda mais as MMPs, pois estão presentes em monócitos que migram para o tecido lesionado aumentando ainda mais sua presença na área infartada. O miocárdio, após IAM depende do equilíbrio entre vários eventos concorrentes que ocorrem durante a resposta de

cicatrização da ferida para formar a cicatriz da MEC (Figura 3) (DELEON-PENNELL *et al.*, 2017).

O aumento na atividade das MMPs pode ser controlado por diversos fatores como citocinas, estresse de cisalhamento, integrinas e particularmente, pelas EROs (SPINALE, 2007; SCHULZ, 2007). Resultados mostraram que o aumento da atividade e da concentração da MMP-2 em ratos hipertensos foram reduzidas pelo tratamento com drogas antioxidantes (RIZZI *et al.*, 2013; CASTRO *et al.*, 2009). Em modelo experimental de isquemia miocárdica, a ativação da MMP-2 foi consistentemente mostrada ser dependente da formação de ERO e ERN (PRADO *et al.*, 2018). Em conjunto, os achados sugerem que ERO e ERN são os principais fatores ativadores da MMP-2 em doenças cardiovasculares.

**Figura 03** - A cicatrização do miocárdio depende do equilíbrio entre a quebra e a síntese da matriz extracelular (ECM). As metaloproteinases de matriz (MMPs) são críticas durante este processo como principais reguladores da fibrose, angiogênese e inflamação. A formação de cicatriz ótima (esquerda) requer a ocorrência apropriada de todos os fatores desenhados na figura abaixo. Muito ou pouco desses eventos resultará em formação de escaras insuficiente (direita) e pode facilitar o desenvolvimento de insuficiência cardíaca pós-infarto do miocárdio.

Ecocardiógrafo – sistema de ultrassom VeVo 2100 (120v) Visualsonics Inc. ref. VS 11945 e acessórios



**Fonte:** DELEON-PENNELL *et al.*, 2017

O desenvolvimento de IC após o IAM pode ser induzido por remodelamento cardíaco exagerado. É possível supor que a atividade exagerada das MMPs contribua para o remodelamento do arco da aorta e em resposta, pode haver redução na sensibilidade dos



barorreceptores que estão concentrados nesta região, o que levaria ao comprometimento da resposta autonômica que se inicia nesta região. No entanto, essa sugestão ainda não foi avaliada em estudos prévios. Além disso, a MMP-2 quando administrada em animais saudáveis, após 4 semanas promoveu aumento na formação de ERO gerando estresse oxidativo cardíaco (PRADO *et al.*, 2018) e como o estresse oxidativo participa da disfunção autonômica, é possível supor que a MMP-2 promove aumento na formação de ERO e conseqüentemente, contribui para disfunção da resposta baroreflexa. Porém, esta hipótese ainda não foi avaliada, sendo o primeiro objetivo do presente estudo.

Como a inibição das MMPs por doxiciclina (inibidor não-seletivo de MMPs) foi associada com melhora da disfunção e hipertrofia cardíaca e vascular (RIZZI *et al.*, 2013; CASTRO *et al.*, 2009), este fármaco será utilizado para avaliar se a inibição das MMPs contribui para melhora na disfunção autonômica em animais infartados.

### **1.5 Inibição das Metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) por doxiciclina como estratégia terapêutica**

A inibição das MMPs é atualmente, uma tentativa considerável de tratamento para diversas patologias como hipertensão, insuficiência cardíaca e infarto do miocárdio, dentre outras (RIZZI *et al.*, 2010; SPINALE *et al.*, 2000; VILLAREAL, 2003). Nesse sentido, a doxiciclina, que é uma tetraciclina capaz de inibir a atividade das MMPs independentemente de sua ação antimicrobiana (GOLUB *et al.*, 1998), pode ser o inibidor de MMPs mais importante para o tratamento de doenças que envolvem a ativação destas proteases (GOLUB *et al.*, 1998; PETERSON, 2004). O Periostat é o único medicamento contendo doxiciclina em dose subantimicrobiana comercialmente disponível como inibidor de MMPs aprovado pelo FDA (US Food and Drug Administration), para o tratamento de doenças periodontais.

O uso da doxiciclina tem mostrado efeitos benéficos no tratamento de outras doenças em que as MMPs desempenham importantes papéis patológicos, como a diabetes, infarto e a hipertensão arterial sistêmica (HAS) (CASTRO *et al.*, 2012). Estudos indicam que a doxiciclina reduz significativamente o aumento da atividade da MMP-2 em artérias de resistência e de condutância (CASTRO *et al.*, 2008; BOUVET *et al.*, 2005) e estabiliza placas ateroscleróticas em carótidas (AXISA *et al.*, 2002). Castro *et al.*

(2008), mostraram que a doxiciclina pode inibir o remodelamento vascular induzido pela HAS experimental 2R1C (CASTRO *et al.*, 2008; RIZZI *et al.*, 2010).

Os efeitos benéficos da doxiciclina no remodelamento cardíaco induzido pelo infarto já foram estudados e os resultados promissores foram avaliados em estudos clínicos. Porém, é totalmente desconhecido se a doxiciclina pode atenuar a disfunção autonômica e reflexa existente no IAM sendo este um dos objetivos do presente trabalho.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Baseado no exposto acima, a disfunção autonômica presente no IAM está relacionada com o estresse oxidativo, que é o principal mecanismo de ativação das MMPs em diversas doenças. Embora o aumento na atividade das MMPs ocorra no IAM, nenhum estudo avaliou sua participação nas alterações autonômicas.

### **3. HIPÓTESE**

A hipótese do presente estudo é que o aumento na atividade das MMPs contribui para as alterações autonômicas e reflexas do miocárdio. Para avaliar se a inibição das MMPs protege a disfunção autonômica, animais infartados foram tratados com doxiciclina e as alterações na atividade autonômica reflexa foram avaliadas.

## **4. OBJETIVO**

O objetivo geral do estudo foi avaliar a participação das MMPs, especialmente MMP-2, nas respostas hemodinâmicas e barorreflexas em animais com IC induzida pelo IAM.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Validar o modelo experimental de IC induzida pelo IAM
2. Avaliar os efeitos do tratamento com a doxiciclina sobre as alterações barorreflexas espontânea e induzida por fármacos vasoativos nos animais sham e infartados.
3. Avaliar os efeitos do tratamento com a doxiciclina sobre as alterações morfofuncionais cardíacas nos animais sham e infartados.
4. Avaliar a atividade da MMP-2 em diferentes tecidos (coração, aorta da aorta, aorta abdominal e bulbo) e se o tratamento com a doxiciclina inibiu a atividade desta prótese nos tecidos avaliados.

## 5. MÉTODOS

### 5.1. Animais, procedimento cirúrgico (infarto do miocárdio) e tratamentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Todo o protocolo experimental descrito foi realizado com a aprovação do Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP, Protocolo nº 04/2019, 22/05/2019). Ratos Wistar machos saudáveis (240-250g) foram mantidos em ciclo claro / escuro de 12h a 25°C com livre acesso a ração e água.

Para a realização deste protocolo os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (1:1, i.m.) e submetidos à intubação orotraqueal para ventilação mecânica. O coração foi exposto por meio de uma incisão no terceiro espaço intercostal, e o ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda foi identificado, cuidadosamente isolado, e ligado com um fio de poliéster (4-0, Ethicon, São José dos Campos, SP, Brasil). Em seguida, o tórax do animal foi fechado. Ratos controles foram submetidos a procedimentos semelhantes aos descritos acima, com exceção da ligadura da artéria coronária. Ao final do procedimento cirúrgico os animais receberam analgésico (flunixinina meglumina, 2,5 mg/kg, sc) e antibiótico (benzilpenicilina, 24 UI/g, im) e, em seguida, foram levados ao biotério do Laboratório de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto para recuperação. Após quatro semanas da cirurgia fictícia ou da ligadura da artéria coronária, os animais foram submetidos aos protocolos experimentais.

O tratamento com a doxiciclina foi realizado diariamente, via gavagem, na dose de 30 mg/kg/dia, por 4 semanas, começando 24 horas após a cirurgia de ligadura da artéria coronária (JURIC *et al.*, 2007). A doxiciclina foi diluída em água, sendo que a água foi utilizada como veículo. Os grupos experimentais foram 4: Sham+veículo (Sham), Infartados+Veículo (IAM) e Infartados+Doxiciclina (IAM+doxi).

Os animais foram pesados semanalmente. O período de tratamento e a concentração da dosagem foram escolhidos com base em evidências que mostram os efeitos benéficos da doxiciclina no sistema cardiovascular e, portanto, é interessante avaliar se a atividade da MMP-2 foi inibida neste mesmo período de tratamento (RIZZI *et al.*, 2010, CAMP *et al.*, 2004). A dosagem e o período de tratamento foram mais bem

discutidos na sessão de discussão devido a grande diferença entre dosagens e períodos de tratamentos relatados em outros trabalhos.

Ao final da quarta semana de tratamento, as alterações hemodinâmicas foram avaliadas e posteriormente, o coração, arco da aorta, aorta abdominal e o bulbo dos animais foram coletados para análises morfológicas e bioquímicas descritas a seguir.

## **5.2. Análise morfofuncional cardíaca (ecocardiografia)**

Como o objetivo do estudo foi o de utilizar animais infartados no presente trabalho, neste protocolo realizamos a padronização do procedimento cirúrgico de indução da IC por meio do IAM. Para validar se realmente este modelo foi padronizado, foi realizado a análise morfofuncional por meio do exame ecocardiográfico (Ecocardiógrafo – sistema de ultrassom VeVo 2100 (120v) Visualsonics Inc. ref. VS 11945 e acessórios), o qual foi realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em colaboração com o Prof. Dr. Hélio Cesar Salgado (Departamento de Fisiologia). Para a realização do ecocardiograma, os animais foram sedados com Isoflurano na dose de 3% (por litro de O<sub>2</sub>) para indução e 1% para manutenção anestésica a fim de minimizar possíveis alterações cardiovasculares. Após anestesia inalatória, os animais tiveram o tórax tricotomizados e foram posicionados em decúbito dorsal para melhor posicionamento do transdutor em relação ao tórax do animal para a obtenção das imagens no MODO M (para avaliação do movimento das estruturas cardíacas e suas profundidades), obtendo-se assim os parâmetros de espessura do septo intraventricular na diástole (mm – IVS;d), espessura do septo intraventricular na sístole (mm - IVS;s), diâmetro diastólico (mm - LVID;d), diâmetro sistólico (mm – LVID;s), espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (mm - LVPW;d), espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole (mm – LVPW;s), fração de ejeção (% - EF), fração de encurtamento (% - FS), massa ventricular esquerda (mg – LV Mass), massa ventricular esquerda corrigida (mg – LV Mass corrected), volume diastólico ventricular esquerdo (uL – LV Vol;d), volume sistólico ventricular esquerdo (uL – LV Vol;s), frequência cardíaca (BPM – FC) e débito cardíaco calculado (mL/min – CO calculated).

## **5.3. Análise histológica do coração, coleta e preparação das amostras**

Para validar os achados morfológicos fornecidos pelo ecocardiograma, os corações foram rapidamente coletados e lavados em solução salina gelada, secos com auxílio de uma gaze e pesados. Posteriormente, o coração foi partido ao meio transversalmente e a base foi designada para análise histológica fixadas em formalina tamponada com fosfato a 10% (pH 7, 3). O ápice cardíaco foi congelado para avaliação da atividade da MMP-2.

A tibia esquerda foi dissecada e seu comprimento medido desde os côndilos até a ponta do maléolo medial com um paquímetro (YIN *et al.*, 1982). O peso do coração dividido pelo comprimento da tibia foi utilizado como medida de hipertrofia cardíaca.

Para análise histológica, cada bloco foi cortado em série na mesma direção em seções de 4µm de espessura e coradas com hematoxilina e eosina. A parede ventricular esquerda, a espessura do septo e a área correspondente à câmara ventricular esquerda foram determinadas nos primeiros 3 cortes histológicos de cada bloco. As análises morfométricas foram realizadas com o software ImageJ (Instituto Nacional de Saúde dos EUA e disponível na internet em <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>).

#### **5.4. Avaliação da atividade barorreflexa e análise dos dados**

Após as 4 semanas de tratamentos, os animais foram anestesiados com Cetamina e Xilazina (1:1, i.m.) e implantados com cateteres de polietileno (PE-10/PE-50, Intramedic, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) na artéria e veia femoral, para registro da PA e administração de drogas, respectivamente. As extremidades dos cateteres vasculares foram exteriorizadas e fixadas no dorso do animal. Após 24h, com os animais completamente recuperados da anestesia, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (MLT844, ADInstruments, Brasil) e os sinais de PA foram amplificados (ML224, ADInstruments, Brasil) e coletados por um sistema de aquisição de dados (Power Lab ML866/P, ADInstruments, Brasil) com uma frequência de amostragem de 2 kHz. A PA média foi calculada a partir da PA pulsátil e a FC foi calculada a partir dos picos de PAS por meio de um programa computacional específico (LabChart, AD Instruments, Mountain View, CA, USA). Os sinais foram armazenados em um microcomputador para análise posterior.

Foi realizado o registro dos parâmetros basais (PA e FC) por 5 minutos, para a análise da sensibilidade espontânea do barorreflexo. A seguir, a estimulação barorreflexa



foi realizada por infusão intravenosa de fenilefrina (70ug/mL/kg, IV, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluída em solução salina estéril a 0,9%, na velocidade de infusão de 0,80uL/min/kg e nitroprussiato de sódio (150ug/mL/kg, IV, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído em solução salina estéril a 0,9%, na velocidade de infusão de 0,8mL/min/kg, em ordem aleatória por meio de bomba de infusão (KD Scientific, EUA) conectada à veia femoral (CRESTANI *et al.*, 2009, RESSTEL *et al.*, 2004). Foi possível obter variações da PAM de aproximadamente 50 mmHg em um período de 40 a 50 segundos de infusão.

A sensibilidade espontânea do barorreflexo foi quantificada por meio do método da sequência descrito por Bertinieri *et al* (1985). Neste método, séries com pelo menos 4 batimentos consecutivos, onde a PAS e o intervalo de pulso (IP) estão aumentando ou diminuindo foram selecionadas pelo programa. Uma regressão linear entre a PAS e o IP foi calculada para cada sequência encontrada, e o coeficiente angular desta regressão foi utilizado como índice de sensibilidade do barorreflexo espontâneo. Foram consideradas apenas correlações com coeficientes angulares maiores que 0,8. As análises de variabilidade e da sensibilidade do barorreflexo foram realizadas utilizando o programa computacional Cardioseries 2.4 (Ribeirão Preto, SP, Brasil).

A atividade barorreflexa induzida por drogas vasoativas foi analisada por meio dos dados registrados (PAM e FC) após a infusão dos agentes vasoativos fenilefrina e nitroprussiato de sódio e com isso, foi possível avaliar como a FC dos animais se comportaram frente as variações bruscas de PA. Para a análise separadas das respostas taquicárdicas e bradicárdicas, foi feita a correlação entre as alterações de PAM para 10, 20, 30 e 40 mmgh e os respectivos valores de FC. Esses valores foram plotados para criar curvas de regressão linear. Posteriormente as inclinações obtidas foram comparadas.

### **5.5. Expressão da MMP-2 no coração, aorta abdominal, arco da aorta e SNC (bulbo), coleta e preparação das amostras**

As amostras dos tecidos foram pesadas e colocadas em tubos Eppendorf. Nestes tubos, foram adicionados 50 µL de tampão de extração (20 mmol / L Tris-HCl, pH 7,4, 1 mmol / L 1,10-Phe (orto fenantrolina), 1 mmol / L fenilmetanossulfonilfluoreto (PMSF), 1 mmol / L N-etilmaleimida (NEM), e 10 mmol / L CaCl<sub>2</sub>) para cada 0,01g de tecido. As amostras foram agitadas (em baixa temperatura) por 2 horas para melhorar a extração da

proteína e foram centrifugadas (14000 x g, 15 minutos). O sobrenadante foi coletado para dosagem de proteínas pelo método de Bradford. As amostras (o coração contendo 30 µg de proteína, a aorta abdominal e o arco da aorta contendo 15 µg de proteína e o bulbo contendo 20 µg de proteína) foram diluídas em tampão de amostra (1: 1, SDS 2%, Tris-HCl 125mM, glicerol 10 % e azul de bromofenol) para aplicação de gel de eletroforese contendo gelatina a 1%. Após preparadas, as amostras foram separadas por eletroforese em sistema descontínuo de tampão utilizando gel de poliacrilamida na concentração de 12%. Após a eletroforese, esses géis foram submetidos a 2 banhos de Triton X-100 para remoção do SDS e colocados em tampão de ativação (Tris-HCl contendo cálcio 50 mM) por 16 horas. Mais adiante, eles foram corados em solução de Coomassie Blue e descorados. Com o auxílio de um programa de computador (ImageJ), foram quantificadas as bandas encontradas no gel referente à MMP-2. As formas latentes e ativa de MMP-2 foram identificadas por seu peso molecular: 75 kDa, 72 kDa e 64 kDa, respectivamente.

## **5.6. Análise Estatística**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). Os testes estatísticos foram conduzidos utilizando o programa GraphPad Prism. Para a comparação os dados foram avaliados quanto à normalidade e variâncias. Os testes paramétricos e não paramétricos foram executados de acordo com o resultado do teste de normalidade. ANOVA de duas vias foi utilizada para comparação entre os grupos experimentais. Foram consideradas estatisticamente significativas qualquer diferença com  $p \leq 0,05$ .

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. Efeitos da doxíciclina sobre as alterações morfofuncionais avaliadas por ecocardiografia**

Ao final do estudo, como esperado, foi possível observar que os animais infartados apresentaram redução na fração de ejeção e fração de encurtamento quando comparados aos animais sham ( $p < 0,05$ ; Tabela 1) caracterizando a insuficiência cardíaca após o IAM.

O débito cardíaco menor e o diâmetro sistólico e diastólico maiores foram observados nos animais infartados quando comparados aos animais sham ( $p < 0,05$ ; Tabela 1). O tratamento com doxiciclina não melhorou ou afetou as alterações morfofuncionais encontradas nos animais infartados ( $p > 0,05$ ; Tabela 1).

**Tabela 01** - Avaliação ecocardiográfica mostrando os parâmetros em MODO M de espessura do septo intraventricular na diástole (mm-IVS;d), espessura do septo intraventricular na sístole (mm-IVS;s), diâmetro diastólico (mm-LVID;d), diâmetro sistólico (mm-LVID;s), espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (mm-LVPW;d), espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole (mm-LVPW;s), fração de ejeção (%-EF), fração de encurtamento (%-FS), massa ventricular esquerda (mg-LV Mass), massa ventricular esquerda corrigida (mg-LV Mass corrected), volume diastólico ventricular esquerdo (uL-LV Vol;d), volume sistólico ventricular esquerdo (uL-LV Vol;s), Frequência cardíaca (BPM-FC) e débito cardíaco calculado (mL/min-CO calculated). Valores expressos como média  $\pm$  EPM. N= 7-3-13-9/grupo. \* $p < 0,05$  vs sham.

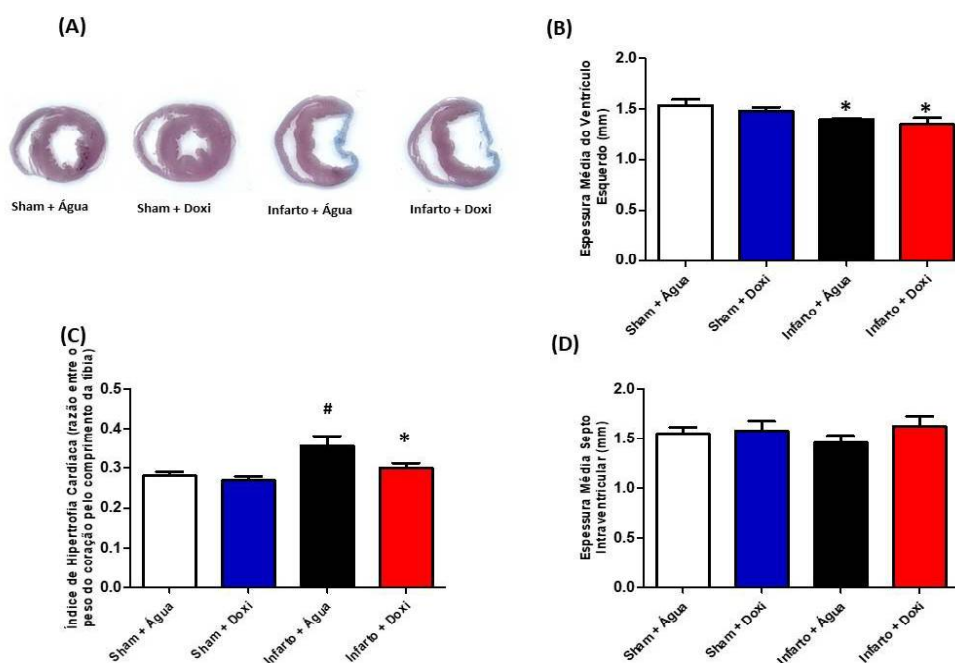
Parâmetros	MODO M				p
	Sham+Água (n=7)	Sham+Doxi (n=3)	Infarto+Água (n=13)	Infarto+Doxi (n=9)	
IVS; d (mm)	1.916 ( $\pm$ 0.2019)	1.695 ( $\pm$ 0.2157)	1.175 ( $\pm$ 0.1519) *	1.130 ( $\pm$ 0.3518) *	< 0.0001
IVS; s (mm)	3.097 ( $\pm$ 0.3818)	2.864 ( $\pm$ 0.1728)	1.209 ( $\pm$ 0.1916) *	1.134 ( $\pm$ 0.6948) *	< 0.0001
LVID; d (mm)	6.993 ( $\pm$ 0.3140)	7.456 ( $\pm$ 0.2138)	10.03 ( $\pm$ 0.7025) *	10.05 ( $\pm$ 0.8507) *	< 0.0001
LVID; s (mm)	3.992 ( $\pm$ 0.4657)	4.575 ( $\pm$ 0.3597)	8.632 ( $\pm$ 0.8756) *	8.440 ( $\pm$ 1.229) *	< 0.0001
LVPW; d (mm)	1.609 ( $\pm$ 0.3318)	1.629 ( $\pm$ 0.3456)	1.695 ( $\pm$ 0.6363)	1.645 ( $\pm$ 0.2645)	NS
LVPW; s (mm)	2.440 ( $\pm$ 0.5309)	2.452 ( $\pm$ 0.4989)	2.341 ( $\pm$ 0.7467)	2.435 ( $\pm$ 0.4074)	NS
EF (%)	72.29 ( $\pm$ 6.857)	67.06 ( $\pm$ 6.311)	28.25 ( $\pm$ 8.416) *	32.39 ( $\pm$ 10.14) *	< 0.0001
FS (%)	42.93 ( $\pm$ 5.955)	38.59 ( $\pm$ 5.243)	14.09 ( $\pm$ 4.493) *	16.44 ( $\pm$ 5.856) *	< 0.0001
LV Mass (mg)	866.4 ( $\pm$ 106.7)	884.1 ( $\pm$ 77.08)	1197 ( $\pm$ 267.5) *	1149 ( $\pm$ 198.6) *	0.0018
LV Mass (Corrected) (mg)	693.1 ( $\pm$ 85.35)	707.3 ( $\pm$ 61.67)	957.9 ( $\pm$ 214.0) *	919.1 ( $\pm$ 158.9) *	0.0018
LV Vol; d (ul)	255.4 ( $\pm$ 26.37)	294.6 ( $\pm$ 18.76)	572.0 ( $\pm$ 85.71) *	575.2 ( $\pm$ 103.2) *	< 0.0001
LV Vol; s (ul)	70.91 ( $\pm$ 19.66)	96.70 ( $\pm$ 17.58)	413.0 ( $\pm$ 89.72) *	397.6 ( $\pm$ 117.2) *	< 0.0001
CO (Calculated) (ml/min)	116.7 ( $\pm$ 20.88)	94.77 ( $\pm$ 16.74)	80.66 ( $\pm$ 21.99) *	84.86 ( $\pm$ 29.72) *	0.0258
HR (BPM)	337.7 ( $\pm$ 22.06)	308.0 ( $\pm$ 44.00)	358.5 ( $\pm$ 79.49)	329.4 ( $\pm$ 36.85)	NS

## 6.2. Efeitos da doxiciclina sobre o remodelamento cardíaco decorrente do infarto agudo do miocárdio

Na Figura 4A é possível observar imagens escaneadas dos corações com as áreas de infarto com a coloração azul. Como observado nos achados do ecocardiograma, o infarto promove diminuição na espessura da parede ventricular esquerda ( $p < 0,05$ ; Figura 4B) que não foi revertida pelo tratamento com doxiciclina ( $p > 0,05$  vs IAM, Figura 4A e

4B). Porém, quando o coração foi pesado e normalizado pelo comprimento da tibia, a doxíciclina atenuou de maneira significativa a hipertrofia encontrada nos animais infartados ( $p < 0,05$ ; Figura 4C). Não houve diferença significativa entre os grupos e os tratamentos para espessura média do septo intraventricular ( $p > 0,05$ ; Figura 4D).

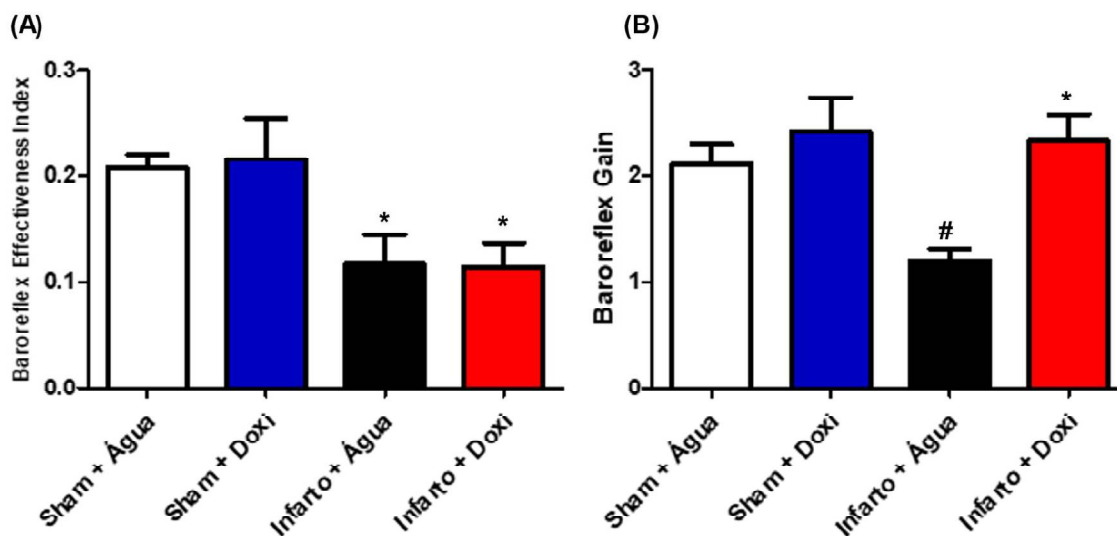
**Figura 04** - Imagens representativas de corte transversal de coração de ratos sham, ratos sham+doxi, IAM e IAM+doxi (A). Espessura média da parede ventricular esquerda (B). Índice de hipertrofia cardíaca obtido por meio da relação entre o peso do coração (g) pelo comprimento da tibia (mm) (C) e espessura média do septo (D). Valores expressos como média  $\pm$  EPM. N= 13-9-9-11/grupo. \* $p < 0,05$  vs SHAM. # $p, 0,05$  vs Infarto+Água.



### 6.3 Efeitos da doxíciclina sobre o índice de efetividade barorreflexa e o ganho na resposta barorreflexa.

O infarto do miocárdio reduziu significativamente o índice de efetividade barorreflexa (BEI, índice que mensura aumentos ou quedas espontâneas de PA que respondem a respostas reflexas da FC) quando comparado aos animais sham, como pode ser observado na Figura 5A ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ; Figura 5A). Na Figura 5B, observa-se uma diferença significativa entre os grupos não tratados ( $p < 0,05$ ; Figura 5B) e que os animais com infarto do miocárdio exibiram diminuição da sensibilidade (ganho) do barorreflexo e que o tratamento com a doxíciclina impediu essa alteração de maneira significativa.

**Figura 05** - (A) Índice de efetividade barorreflexa e (B) Ganho de resposta barorreflexa. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. N= 9-9-10-11/grupo. \* $p < 0,05$  vs SHAM. # $p < 0,05$  vs Infarto+Água.



#### 6.4 Efeitos da doxiciclina sobre efetividade do barorreflexo induzido por drogas vasoativas.

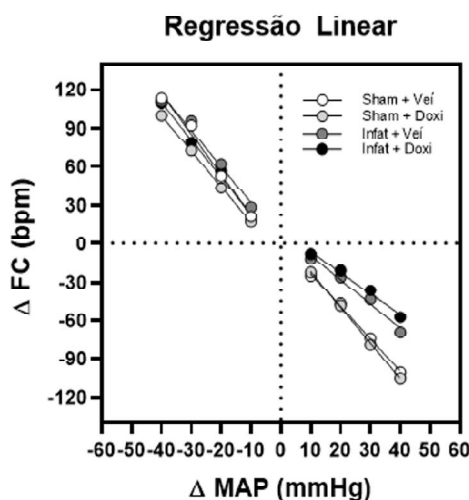
As respostas de bradicardia e taquicardia foram analisadas separadamente e para isso foram pareados os valores de frequência cardíaca dos períodos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 mmHg da pressão arterial média e suas variações calculadas. Estes valores foram utilizados para traçar curvas de regressão linear para cada rato, e as suas inclinações (slope) foram comparadas para examinar modificações no ganho do barorreflexo (CRESTANI *et al.*, 2011).

Em relação ao ganho barorreflexo, a Tabela 2 demonstra que não foi possível detectar diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os grupos em relação a curva taquicárdica, todavia em relação a curva bradicárdica, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos dos animais infartados em relação aos animais sham (Figura 6).

**Tabela 02.** Valores de média e EPM do Ganho barorreflexo das respostas taquicárdicas e bradicárdicas, correlação entre as alterações de PAM para 10, 20, 30 e 40 mmHg e os respectivos valores de FC dos grupos ratos sham, ratos sham+doxi, IAM e IAM+doxi. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. N= 12-10-11-8/grupo. \*p<0,05 vs sham.

GRUPOS					
Parâmetros	Sham+Água (n=12)	Sham+Doxi (n=10)	Infarto+Água (n=11)	Infarto+Doxi (n=8)	P
GANHO FENIL (bpm/mmHg)	-2.534 ( $\pm$ 0.3495)	-2.791 ( $\pm$ 0.4031)	-1.895 ( $\pm$ 0.2804) *	-1.633 ( $\pm$ 0.2239) *	0.0114
GANHO NITRO (bpm/mmHg)	-3.147 ( $\pm$ 0.4014)	-2.767 ( $\pm$ 0.2514)	-2.810 ( $\pm$ 0.3526)	-2.911 ( $\pm$ 0.5075)	NS

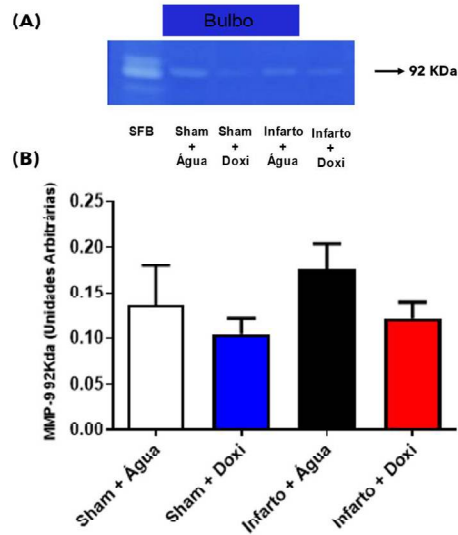
**Figura 6-** Curvas de regressões lineares do barorreflexo dos grupos, ratos sham, ratos sham+doxi, IAM e IAM+doxi. Regressão linear das curvas barorreflexas correlacionando  $\Delta$ PAM e resposta  $\Delta$ FC. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. N= 13-10-12-8/grupo. \*p<0,05 vs SHAM.



## 6.5. Efeitos da doxíciclina sobre a atividade da MMP-2 no bulbo

O bulbo é a região do encéfalo responsável pelas respostas associadas ao barorreflexo (KAUFMANN *et al.*, 2020), portanto a atividade das gelatinases foram avaliadas. Nenhuma banda referente a MMP-2 foi encontrada no gel, mas foi possível observar a presença de bandas de outra gelatinase, a MMP-9. No presente estudo, foi observado que há tendência, ainda que não significativa, da MMP-9 estar aumentada no bulbo de animais infartados ( $p>0,05$ ; Figura 7B). Nenhuma banda representativa da MMP-2 foi visualizada no gel contendo amostras de bulbo.

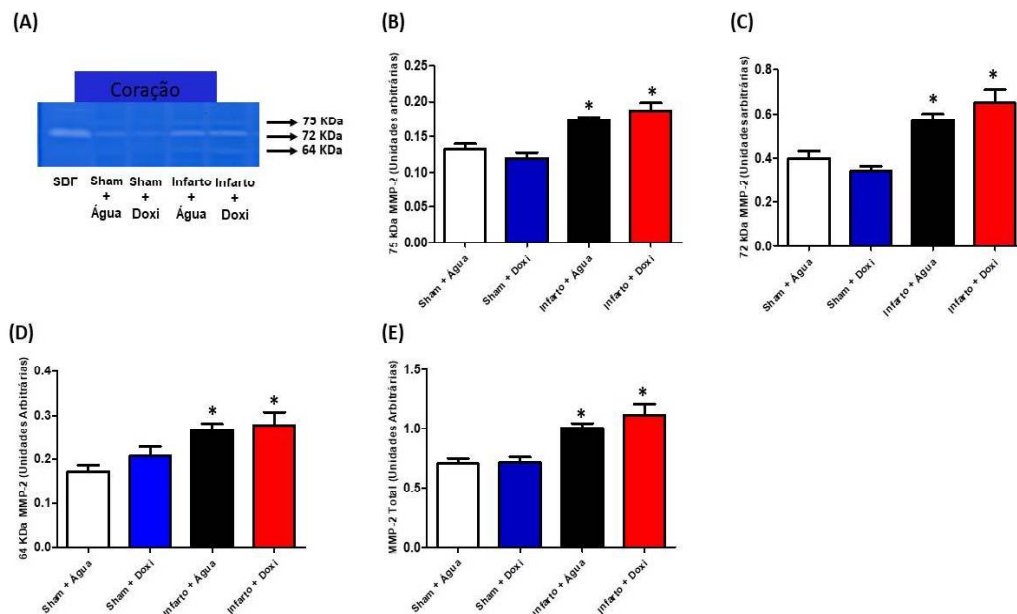
**Figura 07** - (A) Gel representativo de zimografia de extrato de bulbo. SFB: Soro Fetal Bovino. Representação gráfica dos valores para as bandas de peso molecular (B) 92 kDa MMP-9. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. N= 6-5-6-5/grupo. \* $p < 0,05$  vs Sham



## 6.6. Efeitos da doxíciclina sobre a atividade da MMP-2 no miocárdio

Os géis de zimografia do coração revelaram bandas de MMP-2 e nos mostra que houve um aumento significativo da expressão da MMP-2 no coração de animais infartados quando comparados aos animais sham ( $p < 0,05$ ; Figura 8). O tratamento com doxíciclina não atenuou a elevada atividade encontrada nos animais infartados ( $p > 0,05$ ; Figura 8).

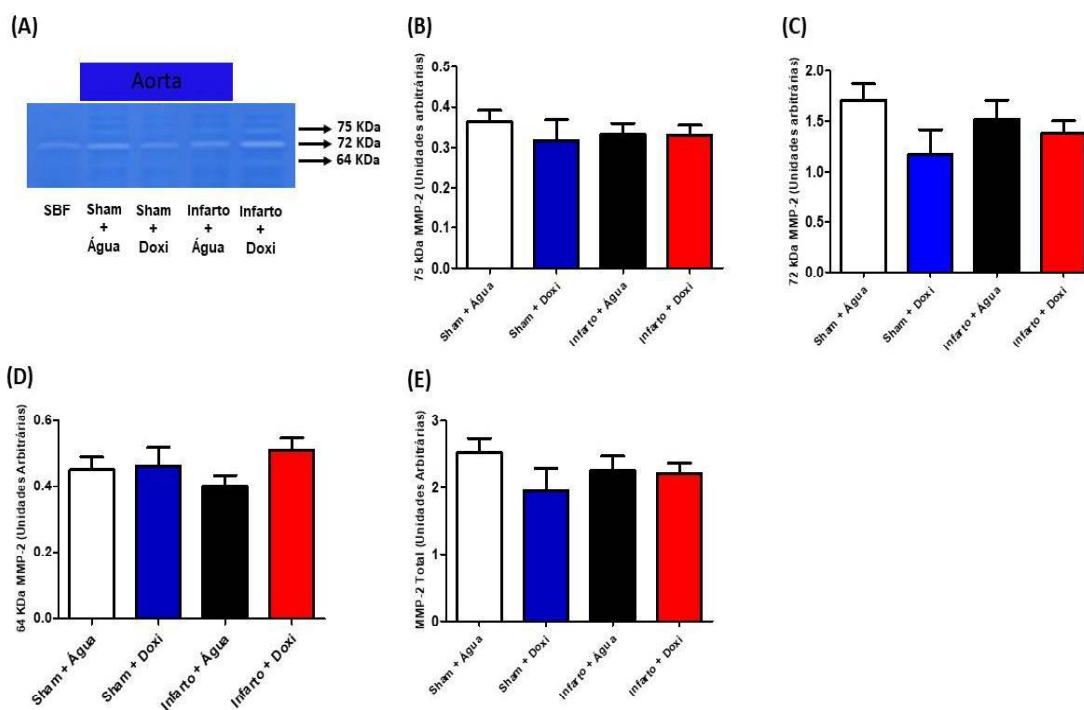
**Figura 08** - (A) Gel representativo de zimografia de extrato de coração. SFB: Soro Fetal Bovino. Representação gráfica dos valores para as bandas de peso molecular (B) 75 kDa MMP-2, (C) 72 kDa, (D) 64 kDa MMP-2 e (E) para a MMP-2 total. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. N= 9-6-10-8/grupo. \* $p < 0,05$  vs Sham.



## 6.7. Efeitos da doxiciclina sobre a atividade da MMP-2 na aorta

Os géis de zimografia da aorta também revelaram bandas correspondentes à MMP-2 de 75, 72, 64 kDa e total (soma das bandas) (Figura 9). Não foi possível detectar diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os grupos em relação às concentrações de MMP-2 na aorta.

**Figura 9** - (A) Gel representativo de zimografia de extrato de aorta. SFB: Soro Fetal Bovino. Representação gráfica dos valores para as bandas de peso molecular (B) 64 kDa MMP-2, (C) 72 kDa e (D) 75 kDa MMP-2. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. N= 12-4-9-5/grupo. \* $p < 0,05$  vs Sham.

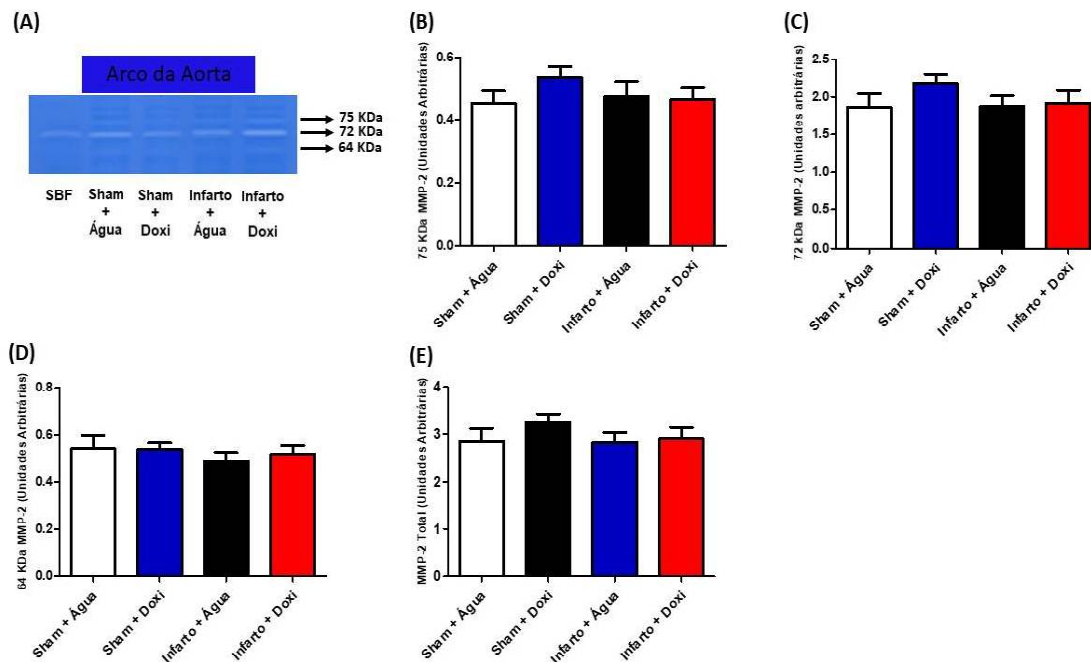


## 6.8. Efeitos da doxiciclina sobre a atividade da MMP-2 no arco da aorta

Os géis de zimografia da aorta novamente revelaram bandas correspondentes à MMP-2 75, 72, 64 kDa e total (soma das bandas) (Figura 10). Não foi possível detectar diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os grupos em relação às concentrações de MMP-2 no arco da aorta.



**Figura 10** - (A) Gel representativo de zimografia de extrato de arco da aorta. SFB: Soro Fetal Bovino. Representação gráfica dos valores para as bandas de peso molecular (B) 64 kDa MMP-2, (C) 72 kDa e (D) 75 kDa MMP-2. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. N= 8-10-6-11/grupo. \* $p < 0,05$  vs Sham.



## 7. DISCUSSÃO

Como já mencionado, no mundo mais de 17 milhões de pessoas morrem por ano vítimas de doenças cardiovasculares e no Brasil, o IAM se apresenta como a maior causa de mortes, com cerca de 360 mil casos anuais. Todavia, a participação das metaloproteinases sobre o barorreflexo após o IAM ainda é desconhecida. No presente estudo, nós observamos que a MMP-2 pode ter uma participação no barorreflexo espontâneo, pois alterou a sensibilidade (ganho) do barorreflexo e que o tratamento com a doxiciclina impediu essa alteração de maneira significativa.

Validando o modelo experimental, foi observado na ecocardiografia que os animais infartados apresentaram redução nos parâmetros morfofuncionais do coração quando comparados aos animais sham, caracterizando a insuficiência cardíaca após o IAM e que a doxiciclina não foi capaz de melhorar os efeitos causados pelo IAM contrariando estudos prévios (VILLAREAL, 2003; GARCIA, 2007; ZHU *et al.*, 2015; SPAULDING *et al.*, 2018), porém a maioria dos estudos experimentais utilizando animais infartados e que observaram benefícios com o tratamento com a doxiciclina trataram os animais com doses diferentes antes da cirurgia e por apenas 2 semanas.

Contudo, Villareal *et al.*, (2003) afirma que 48 horas após IAM a MMP-2 ainda está ativa e sugeriu que estudos com o tempo mais prolongado poderiam mostrar a efetividade da doxiciclina. Considerando esta sugestão, em nosso estudo, realizamos o início do tratamento com a doxiciclina a partir de 24 horas da cirurgia por 4 semanas e concluímos que neste período de tratamento com a dose utilizada a doxiciclina não foi benéfica, portanto embora a MMP-2 seja ativada após 48 horas, sua importância maior possa ser no início da cicatrização como Schultz (2007) demonstrou, que logo após o infarto, na reperfusão, a atividade da MMP-2 é aumentada causando degradação da atividade proteolítica que diminui a função cardíaca. Portanto, nosso estudo concorda que talvez o tratamento com doxiciclina seria mais efetivo para a morfologia e função se tivesse se iniciado antes.

O curso do remodelamento segue com a morte de cardiomiócitos, inflamação, alterações da matriz de colágeno, expansão do infarto, dilatação da câmara cardíaca esquerda, formação da cicatriz e rarefação microvascular (MCKAY *et al.*, 1986). Este processo se inicia imediatamente após IAM e pode continuar por toda a vida (MUHLESTEIN *et al.*, 2014). Um estudo realizado por Cerisano *et al.*, (2014) foi conduzido em 110 pacientes humanos com infarto do miocárdio recente e disfunção ventricular esquerda importante, assegurando assim uma alta taxa de remodelamento ventricular esquerdo. Neste trabalho a dose utilizada de doxiciclina foi de 100 mg por via oral a cada 12 horas, durante 7 dias. Seis meses após o tratamento, o grupo tratado com doxiciclina apresentou um aumento significativamente menor volume ventricular esquerdo na diástole quando comparado ao grupo controle, além de um índice de 50% menos mortes pelo IAM, IC e acidente vascular cerebral. Já no estudo de Noaman *et al.*, (2023), com 103 pacientes humanos que foram submetidos a angioplastia, foram tratados com doxiciclina via intravenosa antes da isquemia/reperfusão seguidos de tratamento com doxiciclina na mesma dose de 100 mg, por 7 dias via oral, demonstrou que a doxiciclina não foi capaz de reduzir o tamanho do infarto e de melhorar o remodelamento adverso do ventrículo esquerdo após 6 meses, evidenciando assim a necessidade de maiores estudo em relação a doses utilizadas e períodos de tratamento. No entanto, nosso grupo evidenciou que em ratos, a dose diária de 100 mg de doxiciclina causou mortalidade dos animais, sendo necessário a interrupção de experimentos (GUIMARAES, 2010).

Não somente com a doxiciclina os dados são controversos, estudos com outros inibidores de MMP também foram encontrados resultados divergentes, como no estudo de Gong *et al.*, (2018) que utilizou a trimetazidina (TMZ), supressor de estresse oxidativo,

como regulador negativo de MMP-2, no qual após 4 dias da cirurgia do infarto, por meio de ecocardiografia, não encontrou diferenças significativas nas alterações morfofuncionais entre os grupos de animais infartados tratados e não na fase aguda do IAM. Já no estudo de Yang *et al.*, (2018), mostrou que a crisina, um bioflavonóide com uma potente ação antioxidante, enfraqueceu a expressão de MMP-2 e melhorou de maneira significativa as funções sistólicas e diastólicas do ventrículo esquerdo após o IAM em ratos, com início do tratamento 24 horas após a cirurgia de infarto, continuado durante 4 semanas.

O IAM é dependente de múltiplos fatores como por exemplo o tabagismo, obesidade, diabetes, hipertensão (BRASIL, 2023), talvez e ainda não avaliado, um estudo em um grupo mais homogêneo de pacientes possa nos dar uma resposta mais fidedigna, porém em humanos é difícil encontrar estudos com indivíduos padronizados e embora o número de indivíduos tenha que ser maior, seria necessário uma seleção mais apurada pelo motivo o qual o infarto foi promovido, pois as MMPs podem ser ativadas por diferentes fatores e condições clínicas.

É possível que o tempo e dose de tratamento com a doxiciclina seja um dos fatores que contribuem para a discordância do nosso estudo em relação aos estudos prévios, porém também mostra que mais estudos de efeitos a longo prazo devem ser realizados para esclarecer melhor os mecanismos de ação da doxiciclina.

Ainda, em nossos achados histológicos, assim como os da ecocardiografia, mostram que o infarto promoveu uma diminuição da espessura da parede ventricular esquerda e que a doxiciclina também não foi capaz de atenuar o remodelamento ventricular, porém quando o coração foi pesado e normalizado pelo comprimento da tibia, a doxiciclina atenuou de maneira significativa o índice de hipertrofia cardíaca encontrada nos animais infartados. Uma das principais consequências do IAM na ausência da reperfusão, é o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca seguida por insuficiência cardíaca por meio do remodelamento intenso subsequente ao IAM (DIXON *et al.*, 2011). A hipertrofia cardíaca patológica é um dos fatores de risco mais importantes para prognóstico de doenças cardiovasculares (CHRISTIAANS *et al.*, 2010) e refere-se ao aumento da massa do miocárdio como resposta adaptativa a uma sobrecarga fisiológica ou patológica (LEVY *et al.*, 1990). No IAM, a região do músculo cardíaco não afetada assume a sobrecarga de trabalho acompanhado de espessamento da parede ventricular, devido à morte celular na região infartada, assim tem-se uma resposta inicial adequada que evolui para disfunção do coração (RUBIN *et al.*, 1983) devido a expansão ao longo

do tempo da região infartada do ventrículo esquerdo, e progressão do remodelamento, consequentemente resultando na insuficiência cardíaca (JACKSON *et al.*, 2002). Sendo assim, mostramos que a doxiciclina foi capaz de prevenir a hipertrofia cardíaca em animais infartados. Semelhante aos nossos achados Parente *et al.*, (2021) e Rizzi *et al.*, (2010), mostraram que a doxiciclina previne a evolução da hipertrofia concêntrica em excêntrica de animais hipertensos, reduzindo inclusive o tamanho do coração, como nós encontramos e ainda, Parente *et al.*, (2021), associou que isso pode ser decorrente a uma menor proteólise da distrofina. Em contrariedade ao nosso estudo, mesmo inibindo a MMP-2, Tessone *et al.*, (2005) mostrou que a doxiciclina não reduziu a hipertrofia compensatória do ventrículo esquerdo, o que pode ser decorrente da dose utilizada. Novamente, a dose, o início do estudo e o motivo pelo qual a insuficiência cardíaca foi promovida, podem contribuir para essas controvérsias, no nosso caso, a insuficiência cardíaca foi promovida por isquemia e não devido a hipertensão.

Além disso, nossa pesquisa também explorou o papel dos barorreceptores no contexto cardiovascular. Esses barorreceptores são sensíveis a mudanças na pressão sanguínea e transmitem essas informações aos centros de controle vasomotor no tronco encefálico, que por sua vez, enviam respostas eferentes para órgãos alvo, como o coração (THOMAS *et al.*, 2011). Nesta parte do presente estudo foram avaliadas as funções reflexas do sistema barorreceptor de forma espontânea. Nossos resultados confirmam que o IAM reduz significativamente o índice de efetividade barorreflexa (BEI) quando comparado aos animais sham e que o tratamento com doxiciclina na dosagem proposta, não foi capaz de impedir esta redução. Concordando com nosso estudo, Fernandes Serôdio *et al.*, 2016 também relata que o BEI foi significativamente deprimido em pacientes com IC em comparação aos controles. O BEI é definido como a razão entre o número de rampas de pressão arterial sistólica (PAS) seguidas pelas respectivas rampas de intervalo de pulso (IP) reflexas e o número total de rampas de PAS observadas em uma determinada janela de tempo, ou seja, este índice quantifica o número de vezes que o barorreflexo é eficaz na intervenção de alterações na FC em resposta a mudanças PAS (DI RIENZO *et al.*, 2001). A especificidade deste índice foi demonstrada em um estudo anterior, mostrando que em gatos seu número caiu acentuadamente após a denervação cirúrgica do barorreceptor (BERTINIERI *et al.*, 1988). Considerando que em nosso estudo, a doxiciclina não foi capaz de melhorar nenhum parâmetro morfofuncional do coração e o principal mecanismo de ativação dos barorreceptores é a deformação mecânica das terminações neurais decorrente da distensão da parede vascular (THOMAS

*et al.*, 2011), é possível supor que o volume de sangue ejetado pelo coração infartado, com menor fração de ejeção não foi capaz de produzir força mecânica suficiente para estirar os barorreceptores do arco da aorta e que a atividade exagerada das MMPs no IAM não atuou no remodelamento do arco da aorta conforme nossos resultados que demonstram que apesar dos géis de zimografia revelarem bandas correspondentes à MMP-2 de 75, 72 e 64 kDa, na aorta e no arco da aorta, não foi possível detectar diferenças significativas entre os grupos em relação às concentrações de MMP-2.

Nossa suposição era que o estresse oxidativo, a inflamação e liberação de citocinas pró-inflamatórias induzidas pelo IAM (SHAO *et al.*, 2020) poderiam desencadear a formação e ativação exacerbada de MMP-2 e o consequente remodelamento do arco aórtico. De acordo com Blankestijn *et al.*, 2001, a patofisiologia do IAM ocorre em 4 fases, a primeira fase com duração de 6 horas a 4 dias é onde ocorre a morte dos cardiomiócitos, a segunda fase, com duração de 12 a 48 horas após o início da isquemia, se dá o começo da resposta inflamatória aguda (migração de granulócitos para remoção de cardiomiócitos mortos), a terceira fase se inicia de 2 a 3 dias após o IAM e tem como principal característica o começo da formação de tecido de granulação na margem da área infartada e pôr fim a quarta fase que se inicia de 2 a 3 semanas, podendo continuar por até 1 ano após o IAM, onde ocorre o remodelamento e cicatrização da área infartada. Baseado nestes dados, é importante ressaltar que o tratamento agudo com doxiciclina (24 horas após a cirurgia do infarto), possa ter modulado e suprimido a liberação de mediadores pró inflamatórios, devido as suas características imunomoduladoras e anti-inflamatórias (SINGH *et al.*, 2021), ter reduzido a formação de ERO, devido a sua ação antioxidante (CLEMENS *et al.*, 2018) e consequentemente, ter inibido a atividade exacerbada da MMP-2 no arco da aorta (RIZZI *et al.*, 2010) e impedido seu remodelamento.

Já o ganho barorreflexo, também conhecido como sensibilidade barorreflexa, refere-se à sensibilidade ou capacidade de resposta do mecanismo barorreflexo na regulação da pressão arterial. É uma medida da relação entre as mudanças na pressão sanguínea e as mudanças subsequentes na frequência cardíaca que são provocadas pelo barorreflexo. Ele quantifica a eficiência ou eficácia do barorreflexo na modulação das respostas cardiovasculares (SWENNE *et al.*, 2013). Um ganho barorreflexo mais alto indica uma resposta barorreflexa mais sensível e robusta, o que significa que mesmo pequenas alterações na pressão sanguínea levam a ajustes significativos na frequência cardíaca. As doenças cardiovasculares são acompanhadas pelo comprometimento dos

mecanismos barorreflexos, caracterizado pela redução da atividade inibitória, resultando assim em uma ativação adrenérgica crônica, fatos relatados na hipertensão, infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca (LA ROVERE *et al.*, 2008), prejudicando o ganho barorreflexo (HARTIKAINEN *et al.*, 1995). Os resultados do presente trabalho demonstram uma diferença significativa entre os grupos não tratados, que os animais com IAM exibiram diminuição da sensibilidade do barorreflexo e que o tratamento com a doxiciclina impediu essa alteração de maneira significativa. Esses dados indicam que a doxiciclina pode ser capaz de prevenir a disfunção barorreflexa de animais infartados, entretanto não existe nenhum estudo abordando diretamente a conexão entre a inibição de MMP-2 pela doxiciclina e sua atividade na disfunção barorreflexa ocasionada pelo IAM. A literatura disponível enfoca principalmente o envolvimento da MMP-2 no remodelamento cardiovascular e suas possíveis implicações em suas funções. Embora os mecanismos específicos pelos quais a MMP-2 possa regular a função do barorreflexo não tenham sido estudados, existem várias vias potenciais que podem estar envolvidas. Essas vias e mecanismos são baseados nos papéis conhecidos da MMP-2 na remodelação cardiovascular e na função vascular, no remodelamento arterial causado por placas ateroscleróticas causando o aumento da rigidez ou alterações na composição da matriz extracelular, afetando assim a sensibilidade dos barorreceptores e a transmissão de estímulos mecânicos para a via do barorreflexo (MOMI *et al.*, 2022), também na disfunção endotelial associada a MMP-2 caracterizada pela biodisponibilidade prejudicada do óxido nítrico (NO) e aumento do estresse oxidativo onde as células endoteliais desempenham um papel importante na sinalização dos barorreceptores na regulação do tônus vascular e a disfunção do endotélio que pode levar ao comprometimento da função barorreflexa e à sensibilidade atenuada do barorreflexo (DOUGUET *et al.*, 2019), ainda na modulação de neurotransmissores, onde a MMP-2 pode influenciar a produção neurotransmissores (MAOLOOD *et al.*, 2008) envolvidos na regulação do barorreflexo, além disso na contribuição da MMP-2 para a inflamação e respostas imunes no sistema cardiovascular, onde processos inflamatórios têm sido associados a alterações na sensibilidade do barorreflexo, com a MMP-2 influenciando indiretamente a função barorreflexa por meio de seus efeitos nas citocinas e outros mediadores inflamatórios (DE JAGER *et al.*, 2017), ou ainda, na participação da MMP-2 no processos de remodelamento neural (REMPE *et al.*, 2016; VERSLEGERS *et al.*, 2013) dentro da própria via barorreflexa. A atividade da MMP-2 poderia afetar a plasticidade sináptica, a remodelação da coluna dendrítica ou a orientação axonal nos

componentes centrais e periféricos do circuito barorreflexo. Esses mecanismos são especulativos e mais pesquisas são necessárias para estabelecer seus papéis específicos na regulação da função barorreflexa da MMP-2. Estudos adicionais serão valiosos na investigação desses potenciais mecanismos e seu impacto na sensibilidade dos barorreceptores e nas respostas do barorreflexo. Portanto, nosso estudo é inovador em mostrar que a doxiciclina, um inibidor conhecido de MMP pode realmente atuar no barorreflexo, sendo este resultado, nosso principal achado.

A continuidade da investigação desses potenciais mecanismos e seus efeitos na sensibilidade dos barorreceptores e nas respostas do barorreflexo é crucial para a compreensão abrangente deste fenômeno, portanto também avaliamos o ganho barorreflexo por análise de regressão linear de alterações da FC em resposta a aumentos ou reduções na pressão arterial provocados por infusão intravenosa de fenilefrina ou nitroprussiato de sódio, respectivamente. Na avaliação dos resultados do ganho barorreflexo após a estimulação com a infusão de drogas vasoativas, foi observado que não houve diferença significativa entre os grupos em relação a curva taquicárdica, todavia em relação a curva bradicárdica, houve diferença significativa entre os grupos dos animais infartados em relação aos animais sham e que a doxiciclina não foi capaz de modificar o ganho barorreflexo. Uma possível explicação para esta falta de diferença significativa entre os grupos na curva taquicárdica pode ser devido à uma característica importante dos barorreceptores, a sua capacidade de adaptação. Alterações sustentadas deslocam a faixa de funcionamento destes para um novo nível de PA que passa a ser reconhecido como normal, privando o organismo deste importante mecanismo de controle regulatório, e que o uso de drogas vasoativas para avaliar o barorreflexo pode desencadear a liberação de vasopressina que aumenta a resistência vascular periférica (CARVALHO-GALVÃO *et al.*, 2018), o que poderia interferir nos resultados barorreflexos dos animais.

Estes resultados também demonstram que o infarto é um fator que está afetando os componentes simpáticos e parassimpáticos, causando uma demora na resposta do barorreflexo e evidenciando o desequilíbrio no fluxo simpático-vagal fisiológico para o coração, resultando assim em uma ativação simpática adrenérgica crônica e supressão da ativação parassimpática ocasionada pelas mudanças nas características da função barorreflexa refletidas pelas alterações no controle autonômico do sistema cardiovascular ocasionado pelo infarto (LA ROVERE *et al.*, 2008). Estes resultados também demonstram que a doxiciclina não foi capaz diminuir essa diferença significativamente nos animais tratados.

Sabemos que a alta atividade de MMP-2 pode resultar na sensibilidade barorreflexa prejudicada e função barorreceptora alterada, porém os mecanismos exatos subjacentes ao papel da MMP-2 na fisiopatologia da disfunção barorreflexa ainda não estão totalmente elucidados. Mais estudos são necessários para explorar as interações específicas entre MMP-2, remodelamento da matriz extracelular e função barorreflexa. Compreender o impacto da MMP-2 na curva barorreflexa e sua fisiopatologia associada pode fornecer informações sobre potenciais alvos terapêuticos além disso, explorar a interação entre a MMP-2 e outros fatores envolvidos na sinalização dos barorreceptores pode contribuir para uma compreensão mais abrangente da regulação cardiovascular.

Isto posto, este estudo também foi pioneiro em concentrar-se na avaliação da atividade da MMP-2 no bulbo de animais infartados. A escolha de analisar a atividade das gelatinases no bulbo foi direcionada pelo papel crucial dessa região no contexto da regulação cardiovascular e do controle do barorreflexo. O bulbo é uma área do encéfalo intimamente ligada a respostas associadas ao barorreflexo e à regulação cardiovascular (TERUI, 1990). No entanto, vale ressaltar que não foram identificadas bandas correspondentes à MMP-2 no gel utilizado na análise. Em contraste, observou-se a presença de bandas correspondentes a outra gelatinase, a MMP-9. Embora em condições normais o nível de MMP-9 seja baixo no cérebro, sua expressão e atividade aumentam notavelmente em resposta a condições patológicas como traumatismo craniano (VAFADARI, 2016), esclerose múltipla (COSSINS, 1997), neoplasias (LUKASZEWICZ-ZAJAC, 2014) e isquemia cerebral (LI, 2022). A atividade elevada da MMP-9 está associada a danos nas junções de oclusão da barreira hematoencefálica, resultando em disfunção da barreira e desencadeando processos de neuroinflamação (ROBINSON, 2022). Além disso, é importante destacar que a MMP-9 apresenta uma afinidade particular pela degradação do colágeno tipo IV, que constitui o principal componente das membranas vasculares basais do cérebro (MORODOMI, 1992).

A elevação desta metaloproteinase também tem sido observada em casos de infarto agudo do miocárdio (DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ, 2022), entretanto, no encéfalo ainda não se têm registros que atestem a sua relevância na etiologia do IAM. No presente estudo, a elevação da atividade da MMP-9 foi identificada no bulbo de animais infartados, embora tal elevação não tenha alcançado significância estatística. Esse dado pode ser atribuído, em parte, à presença de MMP-9 circulante derivada do infarto agudo do miocárdio (DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ, 2022), que desestrutura o parênquima das membranas basais da barreira hematoencefálica, resultando em processos inflamatórios



cerebrais (AGRAWAL, 2006). Tal fenômeno pode consequentemente contribuir para o aumento da atividade da MMP-9 no encéfalo, dada sua natureza como uma proteinase inflamatória (VANDOOREN, 2014). Ademais, apesar de nossos resultados não demonstrarem diferenças significativas nas expressões de MMP-9 entre os tratamentos, nem em relação aos efeitos da doxiciclina, o estudo de Robinson *et al.*, 2022, demonstrou que o tratamento com doxiciclina como terapia aguda para edema cerebral após trauma cranioencefálico em animais pode ser uma opção viável da inibição molecular da MMP-9 via ligação direta ao sítio ativo da enzima e subsequente preservação da integridade da barreira hematoencefálica, evitando a neuro inflamação.

Em relação a atividade da MMP-2 no coração, conforme o esperado (SPINALE *et al.*, 2000), houve um aumento significativo da expressão da MMP-2 no coração de animais infartados quando comparados aos animais sham, porém o tratamento com doxiciclina não atenuou a elevada atividade da MMP-2 encontrada nos animais infartados. É possível que este estudo tenha uma correlação com os resultados demonstrados no trabalho de Spinale, 2002, que mostrou que existem alterações tempo dependentes nos níveis de MMP do miocárdio após um estímulo agudo e prolongado de sobrecarga de pressão, no qual a sobrecarga de pressão aguda induziu a expressão de MMP-2 do miocárdio e um aumento resultante na atividade zimográfica, no entanto com uma sobrecarga de pressão prolongada, como no nosso estudo, a atividade zimográfica da MMP-2 se normalizou. Kaminski *et al.*, 2020, mostra que o pico de atividade da MMP-2 acontece no sétimo dia após o IAM, como a zimografia em gel dos animais do presente estudo foi realizada somente após 30 dias de tratamento, é possível que a atividade de MMP-2 no grupo dos animais infartado tratados com veículo tenha se normalizado e não foi possível observar se a doxiciclina foi ou não capaz de inibir sua ativação quando comparado ao grupo dos animais infartados tratados com doxiciclina.

Apesar da ativação sustentada de MMP no miocárdio após o IAM estabelecido contribua para um processo mal adaptativo de expansão do infarto e desenvolvimento da IC, Heymans *et al.*, 1999, demonstrou em camundongos que a interrupção na expressão e/ou ativação de MMP no curso do IAM pode ser deletério para o processo de cicatrização normal da ferida causada pelo infarto, este pesquisador relata que a indução e ativação precoce de MMP é essencial para a resposta da cicatrização de feridas e que a inibição farmacológica exógena de MMP pode realmente piorar a viabilidade miocárdica no IAM, sendo esta, também uma possível explicação para ausência de diferença significativa entre os grupos de animais infartados tratados e não tratados com doxiciclina.

## 8. CONCLUSÃO

No modelo experimental empregado, tornou-se evidente a presença de efeitos positivos decorrentes da administração de doxiciclina na dosagem de 30mg/kg e no período de tratamento de 4 semanas, em relação à morfologia cardíaca e a melhora significativa do ganho barorreflexo espontâneo após o IAM. Resultados de estudos clínicos que investigaram os efeitos da doxiciclina na IC subsequente ao infarto agudo do miocárdio têm mostrado variações de resultados associadas à dosagem, à duração do tratamento e à etiologia subjacente. Apesar das investigações sobre a MMP-2 terem abordado amplamente sua relação com doenças cardiovasculares, a conexão direta entre a MMP-2 e a regulação do barorreflexo permanece um campo que demanda investigações adicionais. Essa área de estudo possui um potencial significativo como ferramenta terapêutica na prática clínica, podendo influenciar de maneira substancial o desenvolvimento de novas abordagens destinadas a melhorar o remodelamento e a disfunção cardíaca na IC.

## REFERÊNCIAS

AGRAWAL, S.; ANDERSON, P.; DURBEEJ, M.; VAN ROOIJEN, N. *et al.* Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Exp Med**, 203, n. 4, p. 1007-1019, Apr 17 2006.

ALVES, M. J. D. N. N.; DOS SANTOS, M. R.; NOBRE, T. S.; MARTINEZ, D. G. *et al.* Mechanisms of Blunted Muscle Vasodilation During Peripheral Chemoreceptor Stimulation in Heart Failure Patients. **Hypertension**, 60, n. 3, p. 669-676, 2012-09-01 2012.

AMBROSY, A. P.; FONAROW, G. C.; BUTLER, J.; CHIONCEL, O. *et al.* The global health and economic burden of hospitalizations for heart failure: lessons learned from hospitalized heart failure registries. **J Am Coll Cardiol**, 63, n. 12, p. 1123-1133, Apr 01 2014.

ANGELOVA, P. R.; ABRAMOV, A. Y. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. **Federation of European Biochemical Societies Letters**. 2018 Mar;592(5):692-702. doi: 10.1002/1873-3468.12964. Epub 2018 Jan 18. PMID: 29292494.

AXISA, B.; LOFTUS, I. M.; NAYLOR, A. R.; GOODALL, S. *et al.* Prospective, Randomized, Double-Blind Trial Investigating the Effect of Doxycycline on Matrix Metalloproteinase Expression Within Atherosclerotic Carotid Plaques. **Stroke**, 33, n. 12,

p. 2858-2864, 2002-12-01 2002.

BERTINIERI, G.; DI RIENZO, M.; CAVALLAZZI, A.; FERRARI, A. U. *et al.* A new approach to analysis of the arterial baroreflex. **Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension**, 3, n. 3, 1985 Dec 1985.

BERTINIERI, G.; DI RIENZO, M.; CAVALLAZZI, A.; FERRARI, A. U. *et al.* Evaluation of baroreceptor reflex by blood pressure monitoring in unanesthetized cats. **Am J Physiol**, 254, n. 2 Pt 2, p. H377-383, Feb 1988.

BLANKESTEIJN, W. M.; CREEMERS, E.; LUTGENS, E.; CLEUTJENS, J. P. *et al.* Dynamics of cardiac wound healing following myocardial infarction: observations in genetically altered mice. **Acta Physiol Scand**, 173, n. 1, p. 75-82, Sep 2001.

BOUVET, C. L.; GILBERT, L.-A.; GIRARDOT, D.; DEBLOIS, D. *et al.* Different Involvement of Extracellular Matrix Components in Small and Large Arteries During Chronic NO Synthase Inhibition. **Hypertension**, 45, n. 3, p. 432-437, 2005-03-01 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Infarto Agudo do Miocárdio. <https://www.gov.br/saude/pt-br>, 2023. Disponível em < <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/i/infarto>>. Acesso em 09/08/2023.

CAMP, T. M.; TYAGI, S. C.; ARU, G. M.; HAYDEN, M. R. *et al.* Doxycycline ameliorates ischemic and border-zone remodeling and endothelial dysfunction after myocardial infarction in rats. **The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation**, 23, n. 6, 2004 Jun 2004.

CARVALHO-GALVÃO, A.; GADELHA, D. D. A.; DE BRITO ALVES, J. L.; KHAN, B. A. *et al.* A Newly Isolated Carboxymethyl-Glucan (CM-G) Restores Depressed Baroreflex Sensitivity in Renovascular Hypertensive Rats. **Front Physiol**, 9, p. 607, 2018.

CASTRO, M. M.; RIZZI, E.; FIGUEIREDO-LOPES, L.; FERNANDES, K. *et al.* Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. **Atherosclerosis**, 198, n. 2, 2008 Jun 2008.

CASTRO, M. M.; RIZZI, E.; RODRIGUES, G. J.; CERON, C. S. *et al.* Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. **Free radical biology & medicine**, 46, n. 9, 05/01/2009 2009.

CASTRO, M. M.; RIZZI, E.; CERON, C. S.; GUIMARAES, D. A. *et al.* Doxycycline ameliorates 2K-1C hypertension-induced vascular dysfunction in rats by attenuating oxidative stress and improving nitric oxide bioavailability. **Nitric oxide : biology and chemistry**, 26, n. 3, 03/31/2012 2012.

CERISANO, G.; BUONAMICI, P.; VALENTI, R.; SCIAGRÀ, R. *et al.* Early short-term doxycycline therapy in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction to prevent the ominous progression to adverse remodelling: the TIPTOP trial.

**Eur Heart J**, 35, n. 3, p. 184-191, Jan 2014.

CHRISTIAANS, I.; BIRNIE, E.; VAN LANGEN, I. M.; VAN SPAENDONCK-ZWARTS, K. Y. *et al.* The yield of risk stratification for sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy myosin-binding protein C gene mutation carriers: focus on predictive screening. **Eur Heart J**, 31, n. 7, p. 842-848, Apr 2010.

CLEMENS, D. L.; DURYEE, M. J.; SARMIENTO, C.; CHIOU, A. *et al.* Novel Antioxidant Properties of Doxycycline. **Int J Mol Sci**, 19, n. 12, Dec 17 2018.

CONRAD, N.; JUDGE, A.; TRAN, J.; MOHSENI, H. *et al.* Temporal trends and patterns in heart failure incidence: a population-based study of 4 million individuals. **Lancet**, 391, n. 10120, p. 572-580, Feb 10 2018.

CORRÊA, L. D. M. A.; SANTOS, T. S. N. P.; MOURA, T. H. P.; NEGRÃO, C. E. Autonomics alterations in heart failure: benefits of physical exercise. 2008 2008.

COSSINS, J. A.; CLEMENTS, J. M.; FORD, J.; MILLER, K. M. *et al.* Enhanced expression of MMP-7 and MMP-9 in demyelinating multiple sclerosis lesions. **Acta Neuropathol**, 94, n. 6, p. 590-598, Dec 1997.

CRESTANI, C. C.; DEOLINDO, M. V.; ALVES, F. H.; RESSTEL, L. B. *et al.* Non-N-methyl-d-aspartate glutamate receptors in the lateral hypothalamus modulate cardiac baroreflex responses in conscious rats. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, 36, n. 11, 2009 Nov 2009.

CRESTANI, C. C.; TAVARES, R. F.; GUIMARÃES, F. S.; CORREA, F. M. *et al.* Chronic fluoxetine treatment alters cardiovascular functions in unanesthetized rats. **Eur J Pharmacol**, 670, n. 2-3, p. 527-533, Nov 30 2011.

DE JAGER, S. C. A.; HOEFER, I. E. Beyond the matrix: MMP2 as critical regulator of inflammation-mediated vascular dysfunction. **Cardiovasc Res**, 113, n. 14, p. 1705-1707, Dec 01 2017.

DELEON-PENNELL, K. Y.; MESCHIARI, C. A.; JUNG, M.; LINDSEY, M. L. Matrix Metalloproteinases in Myocardial Infarction and Heart Failure. *In: Progress in Molecular Biology and Translational Science*: Elsevier, 2017. p. 75-100.

DI RIENZO, M.; PARATI, G.; CASTIGLIONI, P.; TORDI, R. *et al.* Baroreflex effectiveness index: an additional measure of baroreflex control of heart rate in daily life. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 280, n. 3, p. R744-751, Mar 2001.

DIXON, J. A.; SPINALE, F. G. Myocardial remodeling: cellular and extracellular events and targets. **Annu Rev Physiol**, 73, p. 47-68, 2011.

DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ, A.; HERNÁNDEZ-VAQUERO, D.; ABREU-GONZÁLEZ, P.; BÁEZ-FERRER, N. *et al.* Early Treatment of Acute Myocardial Infarction with Melatonin: Effects on MMP-9 and Adverse Cardiac Events. **J Clin Med**, 11, n. 7, Mar 30 2022.

DOUGUET, D.; PATEL, A.; XU, A.; VANHOUTTE, P. M. *et al.* Piezo Ion Channels in Cardiovascular Mechanobiology. **Trends Pharmacol Sci**, 40, n. 12, p. 956-970, Dec 2019.

EYYUPKOCA, F.; EYERCI, N.; ALTINTAS, M. S.; FELEKOGLU, M. A.; BITER, H. I.; HIDAYET, S.; SIVRI, S.; DEMIRTAS, B.; ATES O. F. The Relationship between Extracellular Volume Compartments and Matrix Metalloproteinases-2 in Left Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction. **Arq Bras Cardiol**. 2022 Dec;119(6):946-957. English, Portuguese. doi: 10.36660/abc.20220061. PMID: 36541989; PMCID: PMC9814815.

FERNANDES SERÔDIO, J.; MARTINS OLIVEIRA, M.; MATOSO LARANJO, S.; TAVARES, C. *et al.* The arterial baroreflex effectiveness index in risk stratification of chronic heart failure patients who are candidates for cardiac resynchronization therapy. **Rev Port Cardiol**, 35, n. 6, p. 343-350, Jun 2016.

FRENNEAUX, M. P. Autonomic changes in patients with heart failure and in post-myocardial infarction patients. **Heart**, 90, n. 11, p. 1248-1255, 2004-11-01 2004.

GADEMAN, M. G.; VAN BOMMEL, R. J.; YPENBURG, C.; HAEST, J. C. *et al.* Biventricular pacing in chronic heart failure acutely facilitates the arterial baroreflex. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 295, n. 2, p. H755-760, Aug 2008.

GAO, L.; WANG, W.; LI, Y. L.; SCHULTZ, H. D. *et al.* Sympathoexcitation by central ANG II: roles for AT1 receptor upregulation and NAD(P)H oxidase in RVLM. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, 288, n. 5, 2005 May 2005.

GARCIA, R. A.; GO, K. V.; VILLARREAL, F. J. Effects of timed administration of doxycycline or methylprednisolone on post-myocardial infarction inflammation and left ventricular remodeling in the rat heart. **Molecular and cellular biochemistry**, 300, n. 1-2, 2007 Jun 2007.

GOLUB, L. M.; LEE, H. M.; RYAN, M. E.; GIANNOBILE, W. V. *et al.* Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. **Advances in dental research**, 12, n. 2, 1998 Nov 1998.

GONG, W.; MA, Y.; LI, A.; SHI, H. *et al.* Trimetazidine suppresses oxidative stress, inhibits MMP-2 and MMP-9 expression, and prevents cardiac rupture in mice with myocardial infarction. **Cardiovasc Ther**, 36, n. 5, p. e12460, Oct 2018.

GUIMARAES, D. A.; RIZZI, E.; CERON, C. S.; OLIVEIRA, A. M.; OLIVEIRA, D. M.; CASTRO, M. M.; TIRAPELLI, C. R.; GERLACH, R. F.; TANUS-SANTOS, J. E. Doxycycline dose-dependently inhibits MMP-2-mediated vascular changes in 2K1C hypertension. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. 2011 May;108(5):318-25. doi: 10.1111/j.1742-7843.2010.00656.x. Epub 2010 Dec 22. PMID: 21176109.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat Rev Neurosci**, 7, n. 5, p. 335-346, May 2006b.

HAACK, K. K. V.; ZUCKER, I. H. Central mechanisms for exercise training-induced

reduction in sympatho-excitation in chronic heart failure. **Autonomic Neuroscience**, 188, p. 44-50, 2015-03-01 2015.

HAINSWORTH, R. Cardiovascular control from cardiac and pulmonary vascular receptors. **Exp Physiol**, 99, n. 2, p. 312-319, Feb 2014.

HARRISON, D. G.; GONGORA, M. C. Oxidative stress and hypertension. **The Medical clinics of North America**, 93, n. 3, 2009 May 2009.

HARTIKAINEN, J. E.; TAHVANAINEN, K. U.; MÄNTYSAARI, M. J.; TIKKANEN, P. E. *et al.* Simultaneous invasive and noninvasive evaluations of baroreflex sensitivity with bolus phenylephrine technique. **Am Heart J**, 130, n. 2, p. 296-301, Aug 1995.

HEYMANS, S.; LUTTUN, A.; NUYENS, D.; THEILMEIER, G. *et al.* Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. **Nat Med**, 5, n. 10, p. 1135-1142, Oct 1999.

HIROOKA, Y.; SAGARA, Y.; KISHI, T.; SUNAGAWA, K. Oxidative Stress and Central Cardiovascular Regulation - Pathogenesis of Hypertension and Therapeutic Aspects -. **Circulation Journal**, 74, n. 5, p. 827-835, 2010-01-01 2010.

JACKSON, B. M.; GORMAN, J. H.; MOAINIE, S. L.; GUY, T. S. *et al.* Extension of borderzone myocardium in postinfarction dilated cardiomyopathy. **J Am Coll Cardiol**, 40, n. 6, p. 1160-1167; discussion 1168-1171, Sep 18 2002.

JAKUBCZYK, K.; DEC, K.; KALDUŃSKA, J.; KAWCZUGA, D. *et al.* Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. **Pol Merkur Lekarski**, 48, n. 284, p. 124-127, Apr 22 2020.

JURIC, D.; WOJCIECHOWSKI, P.; DAS, D. K.; NETTICADAN, T. Prevention of concentric hypertrophy and diastolic impairment in aortic-banded rats treated with resveratrol. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, 292, n. 5, 2007 May 2007.

KAMINSKI, A. R.; MOORE, E. T.; DASEKE, M. J.; VALERIO, F. M. *et al.* The compendium of matrix metalloproteinase expression in the left ventricle of mice following myocardial infarction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 318, n. 3, p. H706-H714, Mar 01 2020.

KAUFMANN, H.; NORCLIFFE-KAUFMANN, L.; PALMA, J. A. Baroreflex Dysfunction. **The New England journal of medicine**, 382, n. 2, 01/09/2020 2020.

KOBA, S.; HISATOME, I.; WATANABE, T. Central command dysfunction in rats with heart failure is mediated by brain oxidative stress and normalized by exercise training. **The Journal of Physiology**, 592, n. 17, p. 3917-3931, 2014-09-01 2014.

LA ROVERE, M. T.; PINNA, G. D.; RACZAK, G. Baroreflex sensitivity: measurement and clinical implications. **Ann Noninvasive Electrocardiol**, 13, n. 2, p. 191-207, Apr 2008.

LEVY, D.; GARRISON, R. J.; SAVAGE, D. D.; KANNEL, W. B. *et al.* Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. **N Engl J Med**, 322, n. 22, p. 1561-1566, May 31 1990.

LI, Y.; GAO, L.; ZUCKER, I.; SCHULTZ, H. NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-enhanced carotid body chemoreceptor sensitivity in heart failure rabbits. **Cardiovascular Research**, 75, n. 3, p. 546-554, 2007-08-01 2007.

LI, Y.; HAN, X.; LUO, S.; HUANG, H. *et al.* Predictive value of longitudinal changes of serum matrix metalloproteinase-9 and brain-derived neurotrophic factor in acute ischemic stroke. **Front Aging Neurosci**, 14, p. 952038, 2022.

LI, Y.-L.; SUN, S.-Y.; OVERHOLT, J. L.; PRABHAKAR, N. R. *et al.* Attenuated outward potassium currents in carotid body glomus cells of heart failure rabbit: involvement of nitric oxide. **The Journal of Physiology**, 555, n. 1, p. 219-229, 2004-02-15 2004.

LI, Z.; MAO, H. Z.; ABOUD, F. M.; CHAPLEAU, M. W. Oxygen-Derived Free Radicals Contribute to Baroreceptor Dysfunction in Atherosclerotic Rabbits. **Circulation Research**, 79, n. 4, p. 802-811, 1996-10-01 1996.

LINDLEY, T. E.; INFANGER, D. W.; RISHINIW, M.; ZHOU, Y. *et al.* Scavenging superoxide selectively in mouse forebrain is associated with improved cardiac function and survival following myocardial infarction. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, 296, n. 1, 2009 Jan 2009.

LUKASZEWICZ-ZAJĄC, M.; MROCZKO, B.; KORNHUBER, J.; LEWCZUK, P. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in the tumors of central nervous system (CNS). **J Neural Transm (Vienna)**, 121, n. 5, p. 469-477, May 2014.

MA, H.-J.; CAO, Y.-K.; LIU, Y.-X.; WANG, R. *et al.* Microinjection of resveratrol into rostral ventrolateral medulla decreases sympathetic vasomotor tone through nitric oxide and intracellular  $Ca^{2+}$  in anesthetized male rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, 29, n. 8, p. 906-912, 2008-08-01 2008.

MALTA, D. C.; MOURA, L. D.; PRADO, R. R. D.; ESCALANTE, J. C. *et al.* Mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil e suas regiões, 2000 a 2011. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 23, n. 4, p. 599-608, 2014-12-01 2014.

MAOLOOD, N.; HARDIN-POUZET, H.; GRANGE-MESSENT, V. Matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9 are upregulated by noradrenaline in the mouse neuroendocrine hypothalamus. **Eur J Neurosci**, 27, n. 5, p. 1143-1152, Mar 2008.

MCKAY, R. G.; PFEFFER, M. A.; PASTERNAK, R. C.; MARKIS, J. E. *et al.* Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. **Circulation**, 74, n. 4, p. 693-702, Oct 1986.

MODESTI, P. A. Impairment of cardiopulmonary receptor sensitivity in the early phase

of heart failure. **Heart**, 90, n. 1, p. 30-36, 2004-01-01 2004.

MOMI, S.; FALCINELLI, E.; PETITO, E.; CIARROCCA TARANTA, G. *et al.* Matrix metalloproteinase-2 on activated platelets triggers endothelial PAR-1 initiating atherosclerosis. **Eur Heart J**, 43, n. 6, p. 504-514, Feb 10 2022.

MORODOMI, T.; OGATA, Y.; SASAGURI, Y.; MORIMATSU, M. *et al.* Purification and characterization of matrix metalloproteinase 9 from U937 monocytic leukaemia and HT1080 fibrosarcoma cells. **Biochem J**, 285 ( Pt 2), n. Pt 2, p. 603-611, Jul 15 1992.

MORTARA, A.; LA ROVERE M. T.; PINNA, G. D.; PRPA, A. *et al.* Arterial baroreflex modulation of heart rate in chronic heart failure: clinical and hemodynamic correlates and prognostic implications. **Circulation**, 96, n. 10, 11/18/1997 1997.

MUHLESTEIN, J. B. Adverse left ventricular remodelling after acute myocardial infarction: is there a simple treatment that really works? **Eur Heart J**, 35, n. 3, p. 144-146, Jan 2014.

MÜNZEL, T.; GORI, T.; KEANEY, J. F.; MAACK, C. *et al.* Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications. **European Heart Journal**, 36, n. 38, p. 2555-2564, 2015-10-07 2015.

NAKAI, K.; TSURUTA, D. What Are Reactive Oxygen Species, Free Radicals, and Oxidative Stress in Skin Diseases? **Int J Mol Sci**, 22, n. 19, Oct 06 2021.

NEGRAO, C. E.; MIDDLEKAUFF, H. R. Adaptations in autonomic function during exercise training in heart failure. **Heart Fail Rev**, 13, n. 1, p. 51-60, Feb 2008.

NIGHTINGALE, A. K.; BLACKMAN, D. J.; FIELD, R.; GLOVER, N. J. *et al.* Role of nitric oxide and oxidative stress in baroreceptor dysfunction in patients with chronic heart failure. **Clinical science (London, England: 1979)**, 104, n. 5, 2003 May 2003.

NOAMAN, S.; NEIL, C.; O'BRIEN, J.; FRENNEAUX, M. *et al.* UpStreAm doxycycline in ST-eLeVation myocAr dial infarction: targetinG infarct hEaling and ModulatioN (SALVAGE-MI trial). **Eur Heart J Acute Cardiovasc Care**, 12, n. 3, p. 143-152, Apr 03 2023.

OECD (2021), Health at a Glance 2021: OECD Indicators, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/ae3016b9-en>.

PARENTE, J. M.; BLASCHE DE MELLO, M. M.; SILVA, P. H. L. D.; OMOTO, A. C. M. *et al.* MMP inhibition attenuates hypertensive eccentric cardiac hypertrophy and dysfunction by preserving troponin I and dystrophin. **Biochem Pharmacol**, 193, p. 114744, Nov 2021.

PETERSON, J. T. Matrix Metalloproteinase Inhibitor Development and the Remodeling of Drug Discovery. **Heart Failure Reviews**, 9, n. 1, p. 63-79, 2022. OriginalPaper.

PIZZINO, G.; IRRERA, N.; CUCINOTTA, M.; PALLIO, G. *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxid Med Cell Longev**, 2017, p. 8416763, 2017.



PRADO, A. F. D.; PERNOMIAN, L.; AZEVEDO, A.; COSTA, R. A. P. E. *et al.* Matrix metalloproteinase-2-induced epidermal growth factor receptor transactivation impairs redox balance in vascular smooth muscle cells and facilitates vascular contraction. **Redox Biology**, 18, p. 181-190, 2022.

REMPE, R. G.; HARTZ, A. M. S.; BAUER, B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers. **J Cereb Blood Flow Metab**, 36, n. 9, p. 1481-1507, Sep 2016.

RESSTEL, L. B.; FERNANDES, K. B.; CORRÊA, F. M. Medial prefrontal cortex modulation of the baroreflex parasympathetic component in the rat. **Brain research**, 1015, n. 1-2, 07/23/2004 2004.

RIZZI, E.; CASTRO, M. M.; CERON, C. S.; NETO-NEVES, E. M. *et al.* Tempol inhibits TGF- $\beta$  and MMPs upregulation and prevents cardiac hypertensive changes. **International Journal of Cardiology**, 165, n. 1, p. 165-173, 2013-04-01 2013.

RIZZI, E.; CASTRO, M. M.; PRADO, C. M.; SILVA, C. A. *et al.* Matrix metalloproteinase inhibition improves cardiac dysfunction and remodeling in 2-kidney, 1-clip hypertension. **J Card Fail**, 16, n. 7, p. 599-608, Jul 2010.

ROBINSON, B. D.; ISBELL, C. L.; MELGE, A. R.; LOMAS, A. M. *et al.* Doxycycline prevents blood-brain barrier dysfunction and microvascular hyperpermeability after traumatic brain injury. **Sci Rep**, 12, n. 1, p. 5415, Mar 30 2022.

RUBIN, S. A.; FISHBEIN, M. C.; SWAN, H. J. Compensatory hypertrophy in the heart after myocardial infarction in the rat. **J Am Coll Cardiol**, 1, n. 6, p. 1435-1441, Jun 1983.

SABINO, J. P. J.; DA SILVA, C. A. A.; GIUSTI, H.; GLASS, M. L. *et al.* Parasympathetic activation by pyridostigmine on chemoreflex sensitivity in heart-failure rats. **Autonomic Neuroscience**, 179, n. 1-2, p. 43-48, 2013-12-01 2013.

SALARI, N.; MORDDARVANJOGHI, F.; ABDOLMALEKI, A.; RASOULPOOR, S.; KHALEGHI, A. A.; HEZARKHANI, L. A.; SHOHAIMI, S.; MOHAMMADI, M., 2023. The global prevalence of myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. **BMC Cardiovascular Disorders** 23.. <https://doi.org/10.1186/s12872-023-03231-w>

SANTANA-FILHO, V. J.; DAVIS, G. J.; CASTANIA, J. A.; MA, X. *et al.* Autocrine/paracrine modulation of baroreceptor activity after antidromic stimulation of aortic depressor nerve in vivo. **Autonomic Neuroscience**, 180, p. 24-31, 2014-02-01 2014.

SANTOS, J. D.; MEIRA, K. C.; CAMACHO, A. R.; SALVADOR, P. T. C. D. O. *et al.* Mortalidade por infarto agudo do miocárdio no Brasil e suas regiões geográficas: análise do efeito da idade-período-coorte. **Ciência & Saúde Coletiva**, 23, n. 5, p. 1621-1634, 2018-05-01 2018.

SCHULTZ, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease:

rationale and therapeutic approaches. **Annual review of pharmacology and toxicology**, 47, 2007 2007

SHAO, C.; WANG, J.; TIAN, J.; TANG, Y. D. Coronary Artery Disease: From Mechanism to Clinical Practice. **Adv Exp Med Biol**, 1177, p. 1-36, 2020.

SINGH, S.; KHANNA, D.; KALRA, S. Minocycline and Doxycycline: More Than Antibiotics. **Curr Mol Pharmacol**, 14, n. 6, p. 1046-1065, 2021.

SPAULDING, K.; TAKABA, K.; COLLINS, A.; FARAJI, F. *et al.* Short term doxycycline treatment induces sustained improvement in myocardial infarction border zone contractility. **PLOS ONE**, 13, n. 2, p. e0192720, 2018-02-12 2018.

SPINALE, F. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. **Cardiovascular Research**, 46, n. 2, p. 225-238, 2000-05-01 2000.

SPINALE, F. G. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. **Circ Res**, 90, n. 5, p. 520-530, Mar 22 2002.

SPINALE, F. G. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. **Physiological reviews**, 87, n. 4, 2007 Oct 2007.

SUTTON, M. G. S. J.; SHARPE, N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. **Circulation**, 101, n. 25, p. 2981-2988, 2000-06-27 2000.

SWENNE, C. A. Baroreflex sensitivity: mechanisms and measurement. **Neth Heart J**, 21, n. 2, p. 58-60, Feb 2013.

TALMAN, V.; RUSKOAHO, H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. **Cell and Tissue Research**, 365, n. 3, p. 563-581, 2016-09-01 2016.

TAUFFENBERGER, A.; MAGISTRETTI, P. J. Reactive Oxygen Species: Beyond Their Reactive Behavior. **Neurochem Res**, 46, n. 1, p. 77-87, Jan 2021.

TERUI, N.; MASUDA, N.; SAEKI, Y.; KUMADA, M. Activity of barosensitive neurons in the caudal ventrolateral medulla that send axonal projections to the rostral ventrolateral medulla in rabbits. **Neurosci Lett**, 118, n. 2, p. 211-214, Oct 16 1990.

TESSONE, A.; FEINBERG, M. S.; BARBASH, I. M.; REICH, R. *et al.* Effect of matrix metalloproteinase inhibition by doxycycline on myocardial healing and remodeling after myocardial infarction. **Cardiovasc Drugs Ther**, 19, n. 6, p. 383-390, Dec 2005.

THOMAS, G.D. Neural control of the circulation. **Advances in physiology education**, 35, n. 1, 2011 Mar 2011.

THYGESEN, K.; ALPERT, J. S.; JAFFE, A. S.; CHAITMAN, B. R. *et al.* Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). **European Heart Journal**, 40, n. 3, p. 237-269, 2019-01-14 2019.

VAFADARI, B.; SALAMIAN, A.; KACZMAREK, L. MMP-9 in translation: from molecule to brain physiology, pathology, and therapy. **J Neurochem**, 139 Suppl 2, p. 91-114, Oct 2016.

VANDOOREN, J.; VAN DAMME, J.; OPDENAKKER, G. On the structure and functions of gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 in neuroinflammation. **Prog Brain Res**, 214, p. 193-206, 2014.

VERSLEGERS, M.; LEMMENS, K.; VAN HOVE, I.; MOONS, L. Matrix metalloproteinase-2 and -9 as promising benefactors in development, plasticity and repair of the nervous system. **Prog Neurobiol**, 105, p. 60-78, Jun 2013.

VILLARREAL, F. J.; GRIFFIN, M.; OMENS, J.; DILLMANN, W. *et al.* Early Short-Term Treatment With Doxycycline Modulates Postinfarction Left Ventricular Remodeling. **Circulation**, 108, n. 12, p. 1487-1492, 2003-09-23 2003.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation research**, 92, n. 8, 05/02/2003 2003.

XIA, H.; SUDA, S.; BINDOM, S.; FENG, Y. *et al.* ACE2-Mediated Reduction of Oxidative Stress in the Central Nervous System Is Associated with Improvement of Autonomic Function. **PLoS ONE**, 6, n. 7, p. e22682, 2011-07-27 2011.

YAMAMOTO, D.; TAKAI, S.; MIYAZAKI, M. Inhibitory profiles of captopril on matrix metalloproteinase-9 activity. **European journal of pharmacology**, 588, n. 2-3, 07/07/2008 2008.

YANG, M.; XIONG, J.; ZOU, Q.; WANG, D. D. *et al.* Chrysin attenuates interstitial fibrosis and improves cardiac function in a rat model of acute myocardial infarction. **J Mol Histol**, 49, n. 6, p. 555-565, Dec 2018.

YIN, F. C.; SPURGEON, H. A.; RAKUSAN, K.; WEISFELDT, M. L. *et al.* Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. **The American journal of physiology**, 243, n. 6, 1982 Dec 1982.

ZHOU, L.; KOU, D. Q. Correlation between acute myocardial infarction complicated with cerebral infarction and expression levels of MMP-2 and MMP-9. **European review for medical and pharmacological sciences**, 23, n. 1, 2019 Jan 2019.

ZHU, H.; SUN, X.; WANG, D.; HU, N. *et al.* Doxycycline ameliorates aggregation of collagen and atrial natriuretic peptide in murine post-infarction heart. **European journal of pharmacology**, 754, 05/05/2015 2015.

ZUCKER, I. H.; SCHULTZ, H.D.; PATEL, K. P.; WANG, W. *et al.* Regulation of central angiotensin type 1 receptors and sympathetic outflow in heart failure. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, 297, n. 5, 2009 Nov 2009.