

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO - UNAERP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
TESE DE DOUTORADO

MARIANA LANDENBERGER DOS SANTOS

**“EFEITOS DO RESVERATROL SOBRE AS ALTERAÇÕES DA
MATRIZ EXTRACELULAR CARDÍACA E DO TECIDO ADIPOSEO
PERIVASCULAR DECORRENTES DA HIPERTENSÃO
RENOVASCULAR”**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2023

MARIANA LANDENBERGER DOS SANTOS

**“EFEITOS DO RESVERATROL SOBRE AS ALTERAÇÕES DA
MATRIZ EXTRACELULAR CARDÍACA E DO TECIDO ADIPOSEO
PERIVASCULAR DECORRENTES DA HIPERTENSÃO
RENOVASCULAR”**

Tese apresentada à Universidade de
Ribeirão Preto- UNAERP, como
requisito para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof.Dr. Mozart de Azevedo Marins

RIBEIRÃO PRETO - SP

2023

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

- Universidade de Ribeirão Preto -

SANTOS, Mariana Landenberger dos, 1994-

S237e Efeitos do Resveratrol sobre as alterações da matriz extracelular
cardíaca e do tecido adiposo perivascular decorrentes da hipertensão
renovascular / Mariana Landenberger dos Santos. – Ribeirão Preto, 2023.

42 f. : il. color.

Orientador: Prof.º Dr.º Mozart Marins.

Tese (Doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, Doutorado em

MARIANA LANDENBERGER DOS SANTOS

**EFEITOS DO RESVERATROL SOBRE AS ALTERAÇÕES DA MATRIZ
EXTRACELULAR CARDÍACA E DO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR
DECORRENTES DA HIPERTENSÃO RENOVASCULAR**


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

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde


Data da defesa: 19 de maio de 2023

Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA



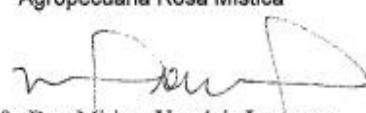
Prof. Dr. Mozart de Azevedo Marins
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP



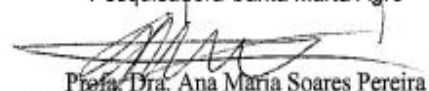
Profa. Dra. Juliana da Silva Coppede
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP



Profa. Dra. Elen Rizzi Sanchez
Agropecuária Rosa Mística



Profa. Dra. Miriam Verginia Lourenço
Pesquisadora Santa Marta Agro



Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP

**RIBEIRÃO PRETO
2023**

Dedico este trabalho à minha mãe, pela oportunidade concedida.

AGRADECIMENTOS

Na vida, Deus nos coloca frente a frente das pessoas que devemos conhecer. Nesta trajetória, cada uma delas deixou parte do seu legado. Tive aprendizados enormes em momentos de alegria, mas também de sofrimento. O ensinamento foi brutal. Agradeço a TODOS que deixaram parte de suas lições em minha jornada.

RESUMO

Resveratrol é o princípio bioativo de alimentos que possui ação benéfica comprovada em doenças cardiovasculares. A hipertensão arterial sistêmica é um problema de saúde mundial. Durante a HAS nota-se aumento da atividade da metaloproteinase da matriz extracelular do tipo-2. O objetivo deste trabalho foi investigar como o resveratrol, atua sobre a morfologia e a atividade da MMP-2, no tecido adiposo perivascular da aorta e cardíaco, em ratos com hipertensão renovascular. Durante a HAS, a angiotensina II ativa NADPH oxidase gerando um aumento de espécies reativas de oxigênio, ativando a MMP-2. Esta via é retratada no modelo experimental de hipertensão 2 rins e 1 clipe (2R1C), que foi utilizado neste trabalho. A pressão arterial foi acompanhada durante todo o período do estudo por pletismografia de cauda (*CODA*). A hipertrofia do ventrículo esquerdo, foi verificada por índice de hipertrofia cardíaca (*INDEX*). A atividade da MMP-2 no miocárdio e tecido adiposo perivascular foi detectada por zimografia em gel. Notou-se que o resveratrol atenuou o aumento da pressão arterial nos animais 2R1C, bem como a hipertrofia cardíaca ($P < 0,05$). De maneira direta, o resveratrol foi capaz de inibir a concentração da MMP-2 e sua atividade no tecido cardíaco. Por outro lado, no tecido adiposo perivascular, foi notado que há alterações morfológicas durante a hipertensão, que o resveratrol é capaz de promover benefícios para o tecido no quadro, muito embora não seja decorrente via MMP-2. Contudo, pode-se concluir que o resveratrol é uma molécula eficiente para atenuar alteração no tecido cardíaco e adiposo perivascular advindos da hipertensão.

Palavras-chave: Alimentos. Princípio Bioativo. Remodelamento cardiovascular.

ABSTRACT

Resveratrol is the bioactive ingredient of food that has proven beneficial action in cardiovascular diseases. Systemic arterial hypertension (SAH) is a worldwide health problem. During SAH, an increase in the activity of extracellular matrix metalloproteinase type-2 (MMP-2) is observed. The objective of this work was to investigate how resveratrol acts on the morphology and activity of MMP-2 in the heart and perivascular adipose tissue of the aorta in rats with renovascular hypertension. During SAH, angiotensin II activates NADPH oxidase, generating an increase in reactive oxygen species, activating MMP-2. This pathway is portrayed in the experimental 2 kidneys and 1 clip (2K1C) model of hypertension, which was used in this work. Blood pressure was monitored throughout the study period by tail plethysmography (CODA). Left ventricular hypertrophy, which was also verified by the cardiac hypertrophy index (INDEX). MMP-2 activity in the myocardium and perivascular adipose tissue was detected by gel zymography. It was noted that resveratrol attenuated the increase in blood pressure in the 2K1C animals, as well as cardiac hypertrophy ($P < 0.05$). Directly, resveratrol was able to inhibit the concentration of MMP-2 and its activity in cardiac tissue. On the other hand, in perivascular adipose tissue, it was noted that there are changes during hypertension, that resveratrol is able to promote benefits to the tissue in the condition, even though it is not due to MMP-2. However, it can be concluded that resveratrol is an efficient molecule to attenuate changes in cardiac tissue and perivascular adipose tissue resulting from hypertension.

Keywords: Bioactive principle. Cardiovascular Remodeling. Foods.

LISTA DE ABREVIATURAS

2R1C	Dois rins e um clipe
ANOVA	Análise de variância
ANG-II	Angiotensina II
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CMLV	Células da musculatura lisa vascular
EROS	Espécies reativas de oxigênio
g	Gramas
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
µg	Microgramas
HCl	Ácido clorídrico
HVE	Hipertrofia do ventrículo esquerdo
INDEX	Índice de hipertrofia cardíaca
KDa	Quilodaltons
Kg	Quilograma
L	Litro
µL	Microlitros
MMP	Metaloproteinases da matriz extracelular
mg	Miligramas
mM	Milimolar
mmol	Milimol
µm	Micrometro
NEM	N-etilmaleimida
NADPH oxidase	Nicotinamida adenosina dinucleotído fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
PVAT	Tecido adiposo perivascular
RESV	Resvertrol
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SHAM	Rato controle
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
TGF-beta	Fator de crescimento transformador-beta
trans-resveratrol	<i>3,4',5-Trihydroxy-trans-stilbene, 5-[(1E)-2-(4-Hydroxyphenyl)ethenyl]-1,3-benzenediol</i>
VEIC.	<i>Veículo (Tween 0,05%)</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 PRINCÍPIO BIOATIVO	13
2.2 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA	14
2.3 TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR	14
2.4 HIPERTROFIA DO VENTRÍCULO ESQUERDO	15
2.5 METALOPROTEINASES DA MATRIZ EXTRACELULAR	16
2.6 ESTRESSE OXIDATIVO	17
3. HIPÓTESE	19
4. JUSTIFICATIVA	20
5. OBJETIVOS	21
5.1 OBJETIVO GERAL	21
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
6. MATERIAIS E MÉTODOS	22
6.1 COMITÊ DE ÉTICA	22
6.2 MODELO EXPERIMENTAL	22
6.3 RESVERATROL	22
6.4 MODELO DE HIPERTENSÃO COM DOIS RINS E UM CLIPE	22
6.5 PLESTIMOGRAFIA DE CAUDA	22
6.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS	23
6.7 PESO CORPORAL	23
6.8 COLETA DAS AMOSTRAS	23
6.9 ÍNDICE DE HIPERTROFIA CARDÍACA	24
6.10 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	24
6.11 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL SOBRE A ATIVIDADE DA MMP-2 IN VITRO	25
6.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA POR ZIMOGRAMA EM GEL	25
6.14 ANÁLISE DOS DADOS	26
7. RESULTADOS	27
7.1 EFEITO DO RESVERATROL NA PRESSÃO ARTERIAL E PESO CORPORAL.	27
7.2 EFEITO DO RESVERATROL NA HIPERTROFIA CARDÍACA	28

7.3 EFEITOS DO TRATAMENTO COM RESVERATROL SOBRE A ATIVIDADE DA MMP-2 NO TECIDO CARDIACO.....	29
7.4 EFEITOS DA INCUBAÇÃO IN VITRO COM RESVERATROL SOBRE A ATIVIDADE DA MMP-2.....	30
7.5 EFEITOS DO TRATAMENTO COM RESVERATROL SOBRE A ATIVIDADE DA MMP-2 NO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR.....	31
7.6 EFEITOS DO TRATAMENTO COM RESVERATROL SOBRE A HISTOLOGIA NO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR.	32
8.DISSCUSSÃO	34
9.CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

O resveratrol é um princípio bioativo de alimentos. Ele está presente em uvas, mirtilos, amendoins, lúpulo, pistache, suco de uva, cranberry e até no cacau. É uma molécula que perpetua a inovação científica desde o seu primeiro trabalho publicado, recentemente contribuindo para novas atuações no campo da genética e mostrando novos papéis no tratamento de doenças cardiovasculares.

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma das principais doenças cardiovasculares, repercutindo em um problema de saúde global. É definida pelo valor crônico da pressão arterial sistólica igual ou maior que 140 mmHg. Embora sua causa seja multifatorial, ênfase é dada ao consumo excessivo de alimentos contendo sódio.

O quadro da patologia desencadeia alterações na morfologia do coração e do tecido adiposo perivascular (PVAT), além de modificações na função do sistema cardiovascular. Brevemente, uma das vias aborda que nos casos da HAS, há o aumento de angiotensina II (ANG II) que é liberada pelo PVAT, assim a enzima β -Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato (NADPH oxidase) é ativada, aumenta a formação de radicais livres, os quais comprometem a contração dos cardiomiócitos, induzindo a atividade da metaloproteinase da matriz extracelular do tipo 2, MMP-2, que participa do processo de renovação do colágeno e hipertrofia cardiovascular.

Durante a hipertrofia cardiovascular, os cardiomiócitos aumentam de espessura, desencadeando o remodelamento das fibras, que é caracterizado pelo aumento da espessura da parede ventricular esquerda e a diminuição da câmara do ventrículo esquerdo. Por outro lado, o tecido adiposo perivascular, anteriormente conhecido por sua função na contração de vasos sanguíneos, hoje é inovador à ciência, visto que as moléculas secretadas por este tecido, podem não só influenciar na contração, como também no relaxamento dos vasos.

A atividade das proteínas é controlada por diversos fatores, entre eles nota-se o princípio bioativo dos alimentos, responsável por modular genes, influenciando na resposta do organismo. Preconiza-se o campo da pesquisa nutrigenômica, a fim de constatar a importância da ingestão de alimentos contendo o resveratrol, como o princípio bioativo de alimentos que contribuirá no processo saúde-doença, por sua interação no coração e PVAT.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PRINCÍPIO BIOATIVO

Define-se por princípio bioativo a substância que tem como finalidade proporcionar benefícios ao organismo humano (KONSTANTINIDI; KOUTELIDAKIS, 2019). Os princípios bioativos abrangem uma enorme classe, entre eles estão os polifenóis, classificados em flavonoides e não flavonoides (TANGNEY; RASMUSSEN, 2013).

Dentre a classe dos não flavonoides, há mais de 60 anos o resveratrol é estudado, abrangendo uma vasta área de conhecimento no campo da medicina (PEZZUTO, 2019). O resveratrol é um polifenol classificado como um metabólito secundário, sintetizado pela via dos fenilpropanóides em resposta a estresses bióticos (infecção bacteriana ou fungica) e ou abióticos (radiação ultravioleta, temperatura) (PANNU; BHATNAGAR, 2019).

A sua molécula é formada por dois anéis fenólicos ligados entre si por uma ligação dupla de estireno, que é responsável por duas formas isométricas da molécula, a forma *cis* e a *trans*. De acordo com a estereoisomeria, a forma *trans* é abundantemente encontrada na natureza, por ser mais estável a luz solar e a radiação ultravioleta (THAPA; PANDEY; PARK; SOHNG, 2019).

Em um mesmo alimento pode-se encontrar a molécula em sua forma *cis* e *trans*, entretanto com concentrações diferentes (PIOTROWSK; KUCINSKA; MURIAS, 2012). Este princípio bioativo é comumente encontrado em sementes de uvas, frutas vermelhas, mirtilo, amendoim, pistache e mais recentemente no cacau, logo estando presente no chocolate, mas principalmente no chocolate meio amargo, entre outros alimentos (KHURANA *et al.*, 2013).

Recentemente novas atividades do resveratrol foram descritas como a atuação para modular vias de sinalização, miRNAs e genes alvo, assim associada à benefícios para o estado de saúde (KHURANA *et al.*, 2013). Tradicionalmente, é conhecido por sua ação antioxidante, mas evidências apontam suas propriedades imunomoduladoras e vasodilatadoras (TANGNEY; RASMUSSEN, 2013). Os estudos abaixo exemplificam algumas de suas atuações voltadas ao objetivo deste trabalho.

Shoieb e El-kadi (2019) induzindo a angiotensina II para desencadear a hipertrofia nas células, constatou que o resveratrol (cerca de 1g/dia ou mais) protege contra a HAS, através do metabolismo oxidativo da primeira fase dos xenobióticos.

Estudo realizado em animais com hipertensão renovascular, no modelo de 2 rins-1 clipe, mostrou que o resveratrol reduz a pressão e a hipertrofia do coração, além de menor deposição

de colágeno, independentemente do Captopril. Assim, mostrando os efeitos cardioprotetores do resveratrol (RESTINI, 2022).

Enaltecendo sua atuação na função vascular, o resveratrol possui ação protetora na remodelação vascular e também na rigidez arterial. Tal fato foi comprovado em aorta de ratos por reduzir a expressão de TGF-beta1 e colágeno; enquanto em humanos, nas células musculares lisas, o resveratrol foi capaz de inibir a expressão das metaloproteinases da matriz extracelular (MMP-9). Enquanto no tecido adiposo perivascular (PVAT), sua administração foi capaz de restaurar a vasodilatação (LI *et al.*, 2019). No entanto, os efeitos do resveratrol sobre a morfologia do PVAT ainda não foi avaliada durante a hipertensão, sendo este um dos objetivos do trabalho.

2.2 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

De acordo com o Ministério da Saúde (2019), no ano de 2017 houve 141.878 casos de mortes associadas com a hipertensão, refletindo em 388,7 pessoas/dia respectivo a 16,2 óbitos/hora no Brasil. O risco para a obtenção de elevados valores de pressão arterial tende a crescer de acordo com a idade, consecutivamente 20,4% da população brasileira apresenta o quadro de hipertensão acima dos 18 anos de idade (CPPAS, 2018).

Aproximadamente 40% dos pacientes hipertensos não atingem a eficiência do tratamento, mesmo quando associado com a utilização de até três fármacos com atividades diferentes (DRUMMOND; VINH; GUZIK; SOBEY, 2019). Repercutindo como um problema de saúde global (MILLS *et al.*, 2016).

A Sociedade Brasileira de Cardiologia define a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) segundo o valor da pressão arterial igual ou maior de 140/90 mmHg cronicamente. A pressão alta é o principal fator de risco para as doenças cardiovasculares, está associada a uma gama de comorbidades como: o ataque cardíaco, derrame, doença renal crônica, insuficiência cardíaca, diabetes mellitus e outras (IADECOLA *et al.*, 2016).

Entre os fatores de risco para o desenvolvimento da patologia está o tabagismo, dietas ricas em ácidos graxos insaturados, falta de exercício físico, obesidade, recorrentes com a globalização, além dos fatores genéticos e o avanço da idade (THEODOTOU *et al.*, 2017). A fisiopatologia da HAS envolve alterações morfológicas e funcionais, envolvendo não apenas o coração propriamente dito (BROWN *et al.*, 2014), mas também o tecido adiposo perivascular.

2.3 TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR

O tecido adiposo é caracterizado por células que armazenam gordura, denominada de adipócitos. Tal tecido compõe aproximadamente 25% de massa corporal total de um indivíduo saudável e até 80% em indivíduos obesos. O tecido adiposo é classificado por cores: branco, marrom e bege (FRIGOLET; GUTIÉRREZ-AGUILAR, 2020). O tecido adiposo branco é responsável pelo armazenamento do excesso de energia, enquanto os demais tecidos são responsáveis pela termogênese e dissipam a energia na forma de calor (BECHER *et al.*, 2021).

O PVAT pode conter tecido adiposo branco e marrom (MIAO; LI, 2012). Os adipócitos brancos maduros são células relativamente grandes (20-200µm), podem alterar significativamente seu tamanho, tanto em volume como em diâmetro, conforme a quantidade de triacilglicerol é acumulada (POND, 2001).

Por outro lado, o tecido adiposo marrom, é uma célula caracterizada pela presença de várias gotículas lipídicas citoplasmáticas de diferentes tamanhos, citoplasma relativamente abundante, núcleo esférico e ligeiramente excêntrico. Ele é capaz de catabolizar grandes quantidades de ácidos graxos (AZHAR *et al.*, 2016).

O PVAT caracteriza-se por ser um tecido adiposo que envolve vasos sanguíneos com função recentemente descrita. Dentre as regiões que ele pode estar localizado, encontra-se ao redor da aorta (STANEK; BROŻYNA-TKACZYK; MYŚLIŃSKI, 2021).

O PVAT está atrelado a fisiologia e fisiopatologia vascular, desde então o tecido que era visto como mero suporte mecânico para vasos sanguíneos, possui propriedades anti-contrátil por secretar substâncias vasoativas e regular a função vascular por meio de diferentes mecanismos (SUN *et al.*, 2014). É crescente o número de estudos mostrando que nas doenças cardiovasculares o PVAT apresenta o efeito reduzido para a constrição por produzir e secretar substâncias vasoconstritoras (angiotensina II, noradrenalina e citocinas) e reduzir a liberação de substâncias vasodilatadoras, principalmente, óxido nítrico (AGHAMOHAMMADZADEH *et al.*, 2013). Ao liberar ANG-II, o PVAT induz vasoconstrição por diferentes mecanismos, como o aumento da deposição de colágeno (GÁLVEZ-PRIETO *et al.*, 2008).

Outra observação importante, foi que na hipertensão arterial as células do PVAT são reduzidas em relação ao tamanho, ou seja, ao contrário do que é observado na obesidade (o PVAT possui células hipertrofiadas, maiores em número menor). Portanto, seja maior ou menor, as células que compõem o PVAT estão alteradas na obesidade ou hipertensão e sua morfologia está diretamente relacionada com a disfunção deste tecido (CARVALHO *et al.*, 2021).

2.4 HIPERTROFIA DO VENTRÍCULO ESQUERDO

O remodelamento cardíaco acontece com o objetivo de corrigir o aumento da tensão da parede do ventrículo esquerdo, nomeado de hipertrofia do ventrículo esquerdo (HVE). É caracterizada pelo aumento no volume dos miócitos, aumento da massa cardíaca e o aumento das proteínas responsáveis pela contração do coração (BERK; FUJIWARA; LEHOUX, 2007).

Quanto a morfologia, a HVE pode ser classificada em adaptativa ou também nomeada de concêntrica que é caracterizada pelo aumento da espessura da parede ventricular esquerda e a diminuição da câmara do ventrículo esquerdo, podendo ocasionar a disfunção sistólica e diastólica, prejudicando a capacidade do coração em bombear o sangue (BERK; FUJIWARA; LEHOUX, 2007). Embora a HVE seja adaptativa, pode progredir para mal-adaptativa ou excêntrica, caracterizada pelos cardiomiócitos alongados, diminuição da espessura da parede ventricular e a câmara ventricular aumentada (WEHBE *et al.*, 2019).

Simultaneamente às alterações morfológicas, há transformações bioquímicas na composição da matriz extracelular que é a responsável pela integridade do tecido e pela função fisiológica do coração, cujo principal componente é o colágeno (BERK; FUJIWARA; LEHOUX, 2007).

Durante a HAS, o grau de severidade da HVE está diretamente relacionado com o aumento da deposição de colágeno, dificultando a função diastólica e conseqüentemente podendo acometer a função sistólica (BERK; FUJIWARA; LEHOUX, 2007).

Assim, é de fundamental importância os estudos com enzimas que degradam os componentes da matriz extracelular, sobretudo o colágeno. Segundo Spinale (2007) o aumento da degradação de colágeno na matriz extracelular pode ser notado pelas metaloproteinases da matriz extracelular, como a MMP-2.

2.5 METALOPROTEINASES DA MATRIZ EXTRACELULAR

Por definição, metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) são endopeptidases dependentes de cálcio e zinco, expressas em várias células e tecidos, incluindo o cardíaco e que podem ser reguladas em níveis transcricional, pós-transcricional e pós-traducional (KANDASAMY; CHOW; ALI; SCHULZ, 2009).

As diferentes metaloproteinases apresentem domínios estruturais análogos, mas que se diferenciam pela especificidade em seus substratos (CHOW; CENA; SCHULZ, 2007), sendo as principais endopeptidases classificadas em colagenases, estromelisinases, matrilisinases, tipo de membrana e gelatinases (PITTAYAPRUEK *et al.*, 2016).

As MMPs atuam degradando diversos componentes da matriz extracelular, em várias doenças cardiovasculares (KANDASAMY; CHOW; ALI; SCHULZ, 2009). Dentre elas, a principal gelatinase envolvida no remodelamento cardiovascular é a MMP-2, presente nos cardiomiócitos e nas células da musculatura lisa vascular (CMLV) (PARENTE; CASTRO, 2018).

Mais especificamente, o aumento das MMPs pode ser notado em um depósito de gordura que circunda as grandes artérias, veias e vasos, sendo ele de extrema importância na obesidade e nas doenças cardiovasculares, denominado de tecido adiposo perivascular, PVAT (Xia; Li, 2017). Rizzi e colaboradores (2013) também demonstraram que no coração, o aumento da atividade da MMP-2 a nível pós-traducional é decorrente da produção de espécies reativas de oxigênio.

2.6 ESTRESSE OXIDATIVO

Na HAS o estresse oxidativo nas CMLV é o principal fator para a ativação da MMP-2 (TOGLIATTO; LOMBARDO; BRIZZI, 2017). A enzima é ativada via angiotensina II, potencializando a produção de NADPH oxidase, acarretando o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS), ativando a via TGF-beta (fator de crescimento transformador-beta), assim favorecendo a indução da MMP-2. Entretanto pode ser que o aumento de EROS, induza a MMP-s, ativando a via TGF-beta e conseqüentemente aumento a produção de NADPH oxidase. Embora existam vias diferentes, ambas resultam na recidiva de NADPH oxidase (BELO; GUIMARÃES; CASTRO, 2015).

O aumento de angiotensina II e espécies reativas de oxigênio, pode ser estudado *in vivo* utilizando a técnica de Harry Goldblatt, que conta com o modelo experimental de dois rins e um clipe (2R1C), através do clampeamento de um dos rins, estimulando o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), desencadeando vasoconstrição e a retenção de água e sódio, estimulando o estresse oxidativo via NADPH oxidase (GOLDBLATT, 1958). Guimarães e colaboradores (2010), desenvolveram um estudo utilizando a técnica e observaram a indução da MMP-2 acarretando o remodelamento vascular patológico.

Quando a MMP-2 está ativa, participa do remodelamento da matriz extracelular, ocasionando a degradação do colágeno do tipo IV e elastina, prejudicando o movimento de contração do músculo cardíaco (miocárdio), contribuindo assim para a hipertrofia, proliferação ou migração celular (PARENTE; CASTRO, 2018).

Considerando a via do estresse oxidativo, vários fármacos antioxidantes são utilizados no tratamento da hipertensão. Entretanto, alternativas inovadoras vêm ganhando espaço, como a suplementação alimentar, e os princípios bioativos (WEHBE *et al.*, 2019). A ciência nutrigenômica permite analisar a maneira pela qual estes componentes alimentares modulam a expressão gênica e sua atividade no organismo (COMINETTI; HORST; ROGERO, 2017).

3. HIPÓTESE

O resveratrol atenua alterações no tecido cardíaco e no tecido adiposo perivascular decorrentes da hipertensão renovascular.

4. JUSTIFICATIVA

Devido ao aumento dos casos de hipertensão arterial sistólica associada a uma gama de comorbidades e, considerando que os fatores ambientais como a alimentação, interferem na atividade das proteínas, ou seja, influenciam na resposta do organismo. Torna-se necessário analisar a atividade enzimática da MMP-2, durante a patologia e sua resposta ocasionada pelo resveratrol, a fim de evidenciar a importância do princípio bioativo, resveratrol, no processo saúde-doença.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi investigar como o resveratrol, atua sobre a atividade da MMP-2, no tecido adiposo perivascular da aorta e cardíaco em ratos com hipertensão renovascular.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar os efeitos do resveratrol sobre a pressão arterial sistólica, peso corporal e hipertrofia cardíaca.
- ✓ Avaliar os efeitos do resveratrol sobre a atividade da MMP-2 no coração, in vitro.
- ✓ Avaliar os efeitos do resveratrol sobre a atividade da MMP-2 no coração e tecido adiposo perivascular de ratos hipertensos 2-rins e 1-clipe.
- ✓ Avaliar os efeitos do tratamento com resveratrol no remodelamento do tecido adiposo perivascular em aortas de ratos hipertensos 2-rins e 1-clipe.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 COMITÊ DE ÉTICA

Todos os procedimentos experimentais utilizados nos animais somente tiveram início após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética Institucional da Universidade de Ribeirão Preto (Ribeirão Preto/São Paulo) nº 006/2020.

6.2 MODELO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 60 animais ratos machos Wistar (180 a 200 gramas), provenientes do Biotério fornecidos pelo Anilab Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda- Laboratórios Veterinários (Paulínia, SP) e mantidos no Laboratório de Experimentação Animal da Universidade de Ribeirão Preto-UNAERP. Os mesmos foram mantidos em salas com ciclos claro/escuro de 12 horas, com temperatura controlada (22-25°C) e livre acesso a ração e água.

6.3 RESVERATROL

Para os ensaios biológicos foi utilizado o trans-resveratrol (*3,4',5-Trihydroxy-trans-stilbene, 5-[(1E)-2-(4-Hydroxyphenyl)ethenyl]-1,3-benzenediol*), (Sigma-Aldrich). A dose utilizada de resveratrol foi de 40mg/Kg diluída em Tween 80 na concentração de 0,05%, ministrada por gavagem três vezes por semana, durante duas semanas.

6.4 MODELO DE HIPERTENSÃO COM DOIS RINS E UM CLIPE

Para induzir a hipertensão, foi utilizada a técnica de Goldblatt, que consiste na indução de uma estenose vascular, ativação do SRAA e o aumento da pressão arterial por meio da inserção de um clipe de prata (0,2 mM) na artéria renal esquerda. Os animais controle (Sham) foram submetidos apenas a laparotomia abdominal, sem introdução do clipe na artéria renal.

Os anestésicos e relaxantes musculares utilizados foram Cetamina (100mg/kg) e Xilazina (10mg/kg); analgésicos e antibióticos foram fluxinameglumina (2,5mg/kg) e terramicina (50mg/kg) (MARTINS-OLIVEIRA *et al.*, 2018).

6.5 PLESTIMOGRAFIA DE CAUDA

Para a verificação da pressão arterial sistólica, os animais foram submetidos à ambientação por um período de aproximadamente uma hora, sem privação de água ou ração. Após esse período, os animais foram colocados em contêntores para limitar seus movimentos e, acoplados em cima de uma plataforma aquecida, a fim de evitar vasoconstrição caudal por estresse. O manguito e um transdutor foram colocados na cauda do animal. O transdutor foi acoplado a um computador para monitorar a pressão sanguínea transmitida para o pletismógrafo (*CODA non-invasive blood pressure system*, EUA). A pressão arterial foi avaliada semanalmente pelo método de pletismografia de cauda CODA (Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, EUA). Somente os animais que apresentaram pressão arterial sistólica igual ou maior que 160 mmHg foram mantidos em estudo para compor o grupo 2R1C. Posteriormente, os animais foram divididos aleatoriamente em grupos experimentais conforme descritos abaixo e, após quatro semanas decorridos da cirurgia, teve início os tratamentos com resveratrol.

6.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS

- 1) Sham+veículo: animais controle, submetidos apenas à laparotomia que receberam veículo (Tween 0,05%) por gavagem durante duas semanas.
- 2) Sham+Resveratrol: animais controle, submetidos apenas à laparotomia que receberam resveratrol por gavagem durante duas semanas.
- 3) 2R1C+veículo: animais submetidos à estenose da artéria renal que receberam veículo (Tween 0,05%) por gavagem durante duas semanas.
- 4) 2R1C + Resveratrol: animais submetidos à estenose da artéria renal que receberam resveratrol por gavagem durante duas semanas.

6.7 PESO CORPORAL

A avaliação do peso corporal dos animais foi realizada semanalmente ao longo do experimento e antes da eutanásia, utilizando uma balança digital de precisão (Shimadzu AY220).

6.8 COLETA DAS AMOSTRAS

Decorrido o prazo de seis semanas, procedeu-se a eutanásia dos animais. O coração foi retirado ainda batendo, pesado e fracionado horizontalmente. O PVAT foi removido da

aorta. Para ambos, uma parte da amostra foi transferida para formol e a outra foi congelada em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C.

6.9 ÍNDICE DE HIPERTROFIA CARDÍACA

Os corações retirados dos animais foram pesados em balança de precisão, individualmente. O índice de hipertrofia cardíaca (Index) foi calculado pela razão entre o peso do coração (mg) de cada animal e seu respectivo peso corporal (g), registrados no dia do experimento.

6.10 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As amostras de ambos os tecidos foram trituradas separadamente por animais e tecido, pesadas e colocadas em tubos eppendorf. Nesses tubos, foram adicionados 50 µL de tampão de extração (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, contendo vários inibidores de proteases: 1 mmol/L 1,10- fenantrolina, 1 mmol/L fluoreto de fenil metil sulfonyl, 1 mmol/L N-etilmaleimida, e 10 mmol/L CaCl₂ para cada 10mg de tecido. Posteriormente, foram centrifugadas a 4°C em 12000rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e diluído em água 1:10 para a dosagem de proteínas pelo método de Bradford. A diluição se faz necessária para que o tampão de extração não interfira com o reagente de Bradford. Esse método de dosagem de proteína oferece a leitura de 0,085 µg/µL á 1,4 µg/µL de proteína. Portanto, foi construída uma curva padrão de albumina sérica bovina contendo cinco pontos variando entre a mínima e máxima concentração proteica fornecida por essa metodologia. Placas de 96 poços foram utilizadas, sendo aplicadas em duplicata 5 µL do branco, 5 µL dos 5 pontos da curva e 5 µL das amostras. Em seguida, foram adicionados em todos os poços da placa 250 µL de Bradford e feito a leitura no aparelho (Leitor de Elisa). No programa Excel a curva padrão foi construída utilizando um gráfico de dispersão e o valor de R=0,99 foi aceito para formar a equação da reta que foi utilizada para determinação da concentração de proteína de cada amostra e seus respectivos volumes a serem aplicados no gel foram calculados.

As amostras (contendo 20 µg de proteína) foram diluídas no tampão de amostra (1:1, SDS 2%, Tris- HCl125mM, glicerol 10% e azul de bromofenol) para a aplicação no gel de eletroforese contendo gelatina 1%. Após preparadas, as amostras foram separadas por meio de eletroforese, em um sistema descontínuo de tampões, utilizando géis de poliacrilamida na

concentração de 12%. As formas latentes e ativas da MMP-2 foram identificadas utilizando os padrões de peso molecular de 75 kDa, 72 kDa e 64 kDa, como referência.

6.11 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL SOBRE A ATIVIDADE DA MMP-2 IN VITRO

As amostras de coração de animais hipertensos foram preparadas (em *pool* de amostra) e aplicadas no gel de poliacrilamida na concentração de 12%. Uma mesma amostra (contendo o *pool*) foi aplicada várias vezes no mesmo gel e após separação por eletroforese o gel foi renaturado em solução contendo Triton. Antes de incubar os géis com tampão de ativação, o gel foi cortado em 2 partes que continham as mesmas amostras. Cada parte do gel foi incubado em diferentes recipientes, com solução de ativação acrescida de veículo, resveratrol 50 μ M ou resveratrol 100 μ M. Os géis foram corados com corante Coomassie Blue, descorados com descorante e fotografados. A intensidade da banda de 72kDa foi quantificada com o programa ImageJ e os dados transferidos para o programa Prisma, para gerar os gráficos.

6.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA POR ZIMOGRAFIA EM GEL

Após preparadas, as amostras de coração e PVAT isoladamente, foram separadas por meio de eletroforese, em um sistema descontínuo de tampões, utilizando géis de poliacrilamida na concentração de 12%. Após eletroforese, os géis foram submetidos a 2 banhos de Triton X-100, para remover o SDS e colocados em tampão de ativação (Tris-HCl 50 mM e 10 mM de cálcio) por 24 horas.

Posteriormente, foram corados com solução Coomassie Blue 0,05%, descorados com solução descorante e fotografados. Com auxílio do programa ImageJ, as bandas encontradas nos géis referentes à MMP-2 foram quantificadas. As formas latentes e ativas da MMP-2 foram identificadas utilizando os padrões de peso molecular de 75 kDa, 72 kDa e 64 kDa, como referência.

6.13 ANÁLISE HISTOLÓGICA

No decorrer da eutanásia, o tecido adiposo perivascular da aorta foi colocado em formol tamponado a 10% (pH 7,3) por 2 horas. Após este período, o fixador foi trocado por álcool 70%

e desidratados em diferentes concentrações de álcool para serem inseridos em parafina. O PVAT foi cortado transversalmente (4 μm), sempre na mesma direção, em um micrótomo (Leica RM2025). Esses cortes foram colocados em um banho Maria com temperatura 37°C para promover a abertura dos cortes em parafina para posterior aderência em lâminas de vidro. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina para determinação dos parâmetros estruturais correspondentes ao tamanho das células e a área que as células ocupam. As análises histológicas foram realizadas com ajuda do software Image J. As medidas foram realizadas sem o conhecimento de qual grupo de animal, com um software Leica Qwin (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, UK) em conjunto a um microscópio (Leica DMR, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany), uma câmera e um computador.

6.14 ANÁLISE DOS DADOS

Para a verificação da ocorrência de diferenças significativas dos valores mensurados na pesagem entre os diferentes grupos analisados (Sham+veículo; Sham+Resveratrol; 2R1C + veículo; 2R1C + Resveratrol), os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) – 2 way, seguida de teste *Tukey*, com nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

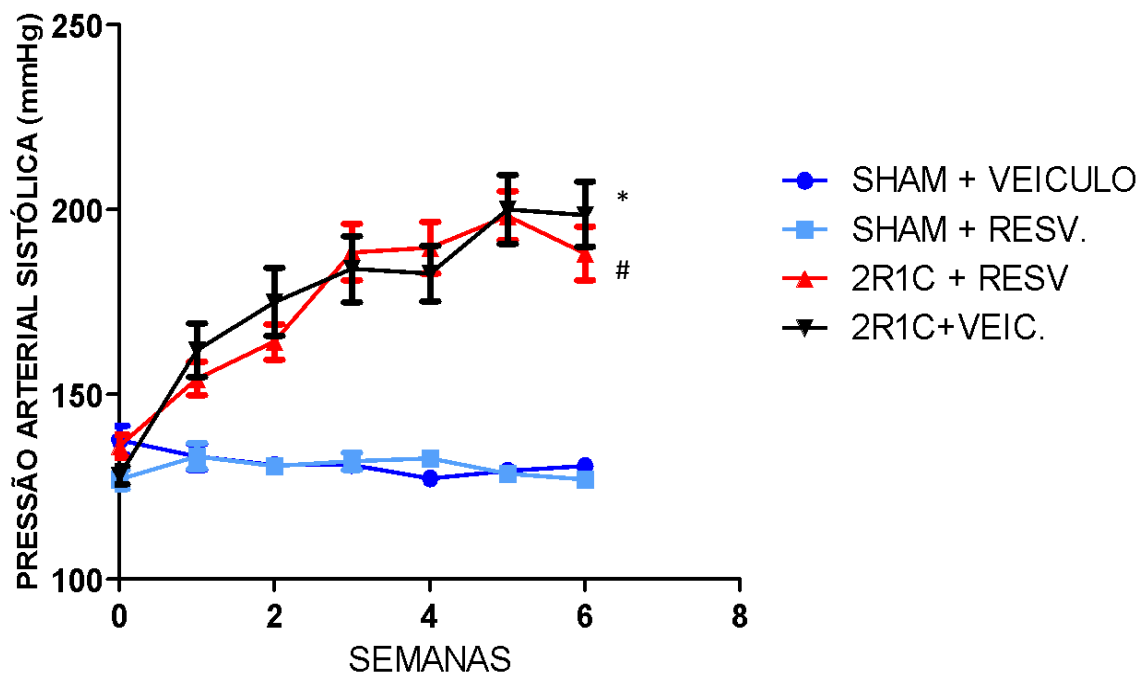
7. RESULTADOS

7.1 EFEITO DO RESVERATROL NA PRESSÃO ARTERIAL E PESO CORPORAL.

Antes de iniciar o tratamento, foram aferidos tanto o peso quanto a pressão, definido como valores basais. Os animais que passaram pela cirurgia de 2R1C, segundo a técnica de Goldblatt, tiveram os valores da pressão arterial elevados, comprovando a eficácia do procedimento cirúrgico. A partir da segunda semana, os animais 2R1C tiveram o valor da pressão aumentado e ao final da quarta semana, os animais que tiveram a pressão maior 160mmHg permaneceram no estudo, por possuírem valores significativamente diferentes quando comparados aos ratos Sham, animais que passaram pela cirurgia, entretanto sem a inserção do clipe de prata na artéria renal esquerda ($P < 0,05$; Figura 1).

Após a quarta semana, começou a administração do tratamento com resveratrol, pode-se notar que o princípio bioativo foi capaz de atenuar o aumento da pressão arterial em animais 2R1C de modo significativo ($P < 0,05$).

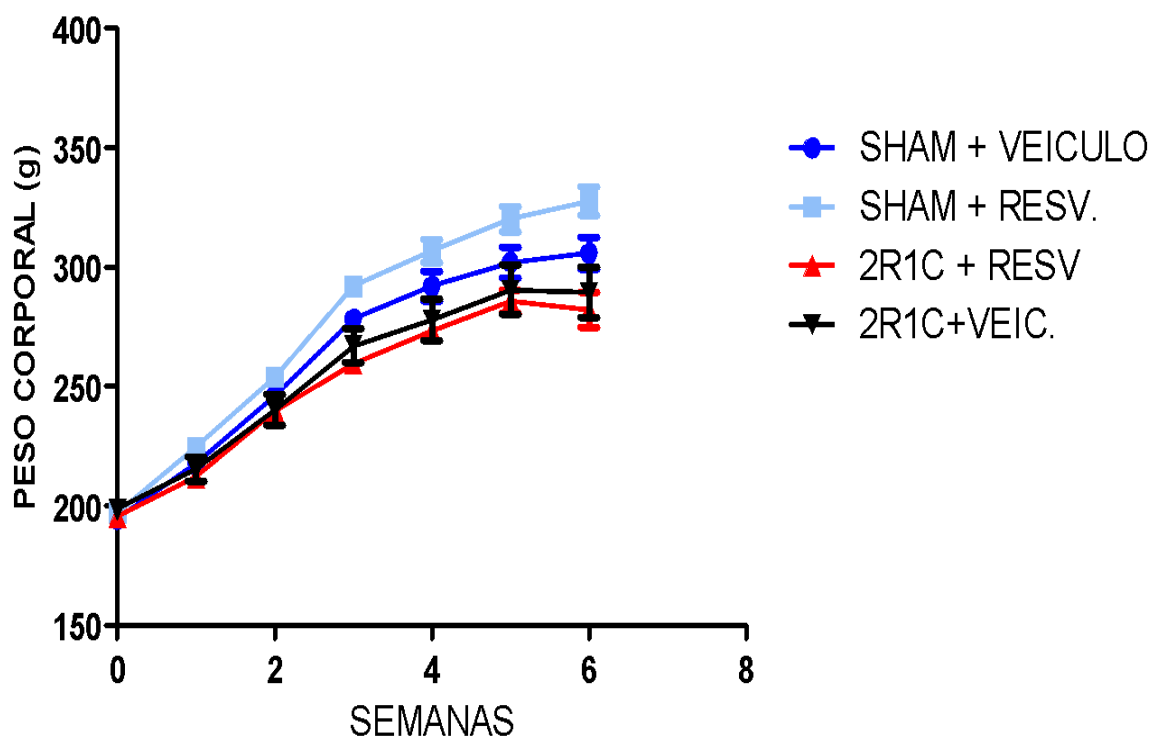
Figura 1 – Efeito do resveratrol na pressão arterial de experimentais, utilizando como metodologia a pletismografia de cauda. * $P < 0,05$ para SHAM+VEIC versus 2R1C +VEIC. # $P < 0,05$ para 2R1C + RESV versus 2R1C + VEÍCULO.



Fonte: Próprio Autor.

Na avaliação do peso corporal, nota-se um aumento gradativo no peso dos animais Sham. A administração com resveratrol não interferiu no ganho de peso dos animais Sham. Muito embora, o aumento da pressão nos animais 2R1C possa estar associado com a redução do peso corporal, ao administrar resveratrol é sabido que na patologia os animais tendem a ficar menos pesados se comparados aos animais controle ($P < 0,05$; Figura 2).

Figura 2 – Efeito do tratamento com resveratrol no peso corporal de animais experimentais. Pesagem em balança de precisão. * $P < 0,05$ para SHAM+VEIC versus 2R1C +VEIC. # $P < 0,05$ para 2R1C + RESV versus 2R1C + VEÍCULO.



Fonte: Próprio Autor.

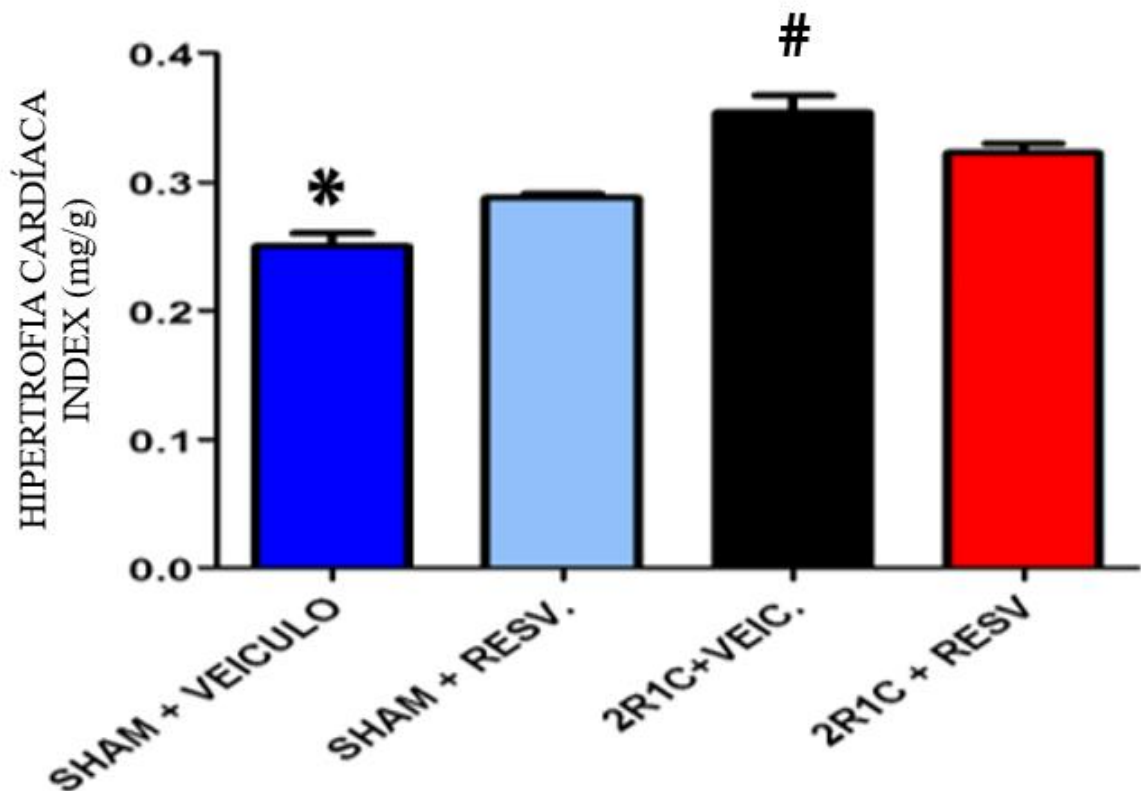
7.2 EFEITO DO RESVERATROL NA HIPERTROFIA CARDÍACA

Com o aumento da pressão em animais 2R1C, espera-se que o coração fique hipertrofiado, como uma resposta adaptativa dos miócitos mediante a pressão que é imposta sobre as células cardíacas.

Visto que os animais 2R1C apresentaram menor ganho de massa corporal quando comparado ao controle, ao calcular a hipertrofia cardíaca, considerando-se o peso corporal, observou-se que os animais 2R1C+VEIC possuem diferença significativa quanto ao índice de hipertrofia cardíaca comparado aos animais Sham+VEIC, enaltecendo também que o

resveratrol é capaz de amenizar a hipertrofia nos animais 2R1C+RESV, ao comparar com o grupo 2R1C+VEIC ($P < 0,05$; Figura 3).

Figura 3 – Efeito do tratamento com resveratrol na hipertrofia cardíaca em ratos 2R1C. Pesagem em balança de precisão. * $P < 0,05$ para SHAM+VEIC versus 2R1C +VEIC. # $P < 0,05$ para 2R1C + RESV versus 2R1C + VEÍCULO.



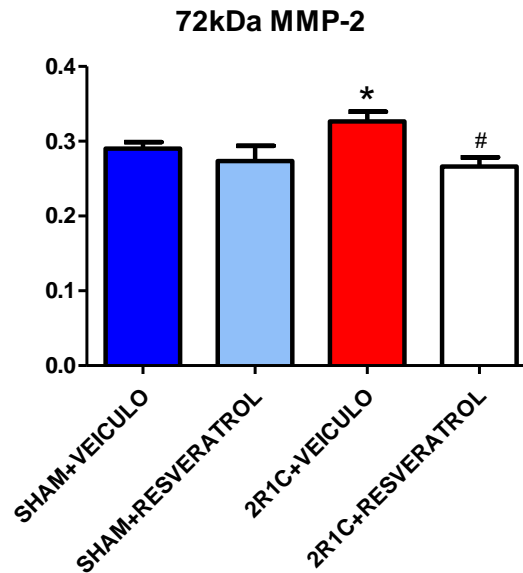
Fonte: Próprio Autor.

7.3 EFEITOS DO TRATAMENTO COM RESVERATROL SOBRE A ATIVIDADE DA MMP-2 NO TECIDO CARDIACO.

A atividade de MMP-2 é regulada por diferentes fatores, sendo o estresse oxidativo um dos principais reguladores da atividade das MMPs. É sabido que o resveratrol possui atividade antioxidante, o que pode diminuir a atividade das metaloproteinases.

Ao realizar zimografia em gel, observou-se que a MMP-2 estava aumentada na patologia (2R1C+VEIC) quando comparada com grupo controle (SHAM+VEIC) e destaque é relatado pelo resveratrol atenuar significativamente sua atividade na banda de 72kDa ao comparar 2R1C+RESV com 2R1C+VEIC.

Figura 4 – Efeitos do tratamento com resveratrol sobre a expressão da MMP-2 no tecido cardíaco. Representação gráfica dos valores para as bandas de peso molecular 72 kDa MMP-2. *P<0,05 para Sham+VEIC versus 2R1C +VEIC. # P<0,05 para 2R1C + resv versus 2R1C + veículo.



Fonte: Próprio Autor.

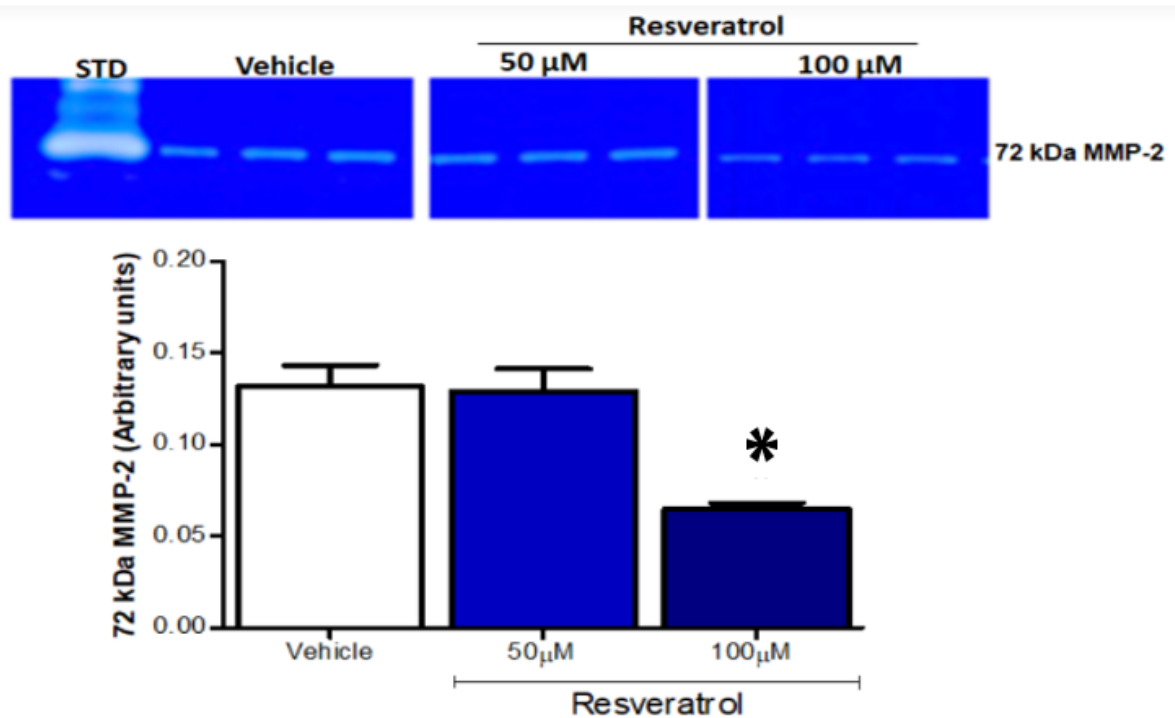
7.4 EFEITOS DA INCUBAÇÃO IN VITRO COM RESVERATROL SOBRE A ATIVIDADE DA MMP-2.

Para verificar o efeito direto da inibição da MMP-2 utilizando o resveratrol, foi realizado este experimento, que conta com a técnica de zimografia, porém após a restauração proteica, o gel foi dividido em duas partes iguais contendo o *pool* de amostra pipetado nos diferentes poços todas de animais 2R1C, posteriormente cada parte foi incubada com veículo e as diferentes concentrações de resveratrol.

A incubação com a concentração de resveratrol (50 μ M) não possui efeito de redução significativo. Porém, com a maior concentração de resveratrol (100 μ M) promoveu a redução significativa na expressão da MMP-2 de 72 kDa, quando comparada com o respectivo grupo veículo (P<0,05; Figura 5).

Assim, pode-se afirmar que o resveratrol interagiu diretamente com a MMP-2, sendo ele capaz de promover a redução de sua atividade de modo independente da ação antioxidante já mencionada na literatura por tantos trabalhos.

Figura 5 - Efeitos da incubação in vitro com diferentes concentrações de resveratrol sobre a atividade da MMP-2 em coração de ratos hipertensos. * $P < 0,05$ para 2R1C+RESV(100 μ M) versus 2R1C +VEIC.

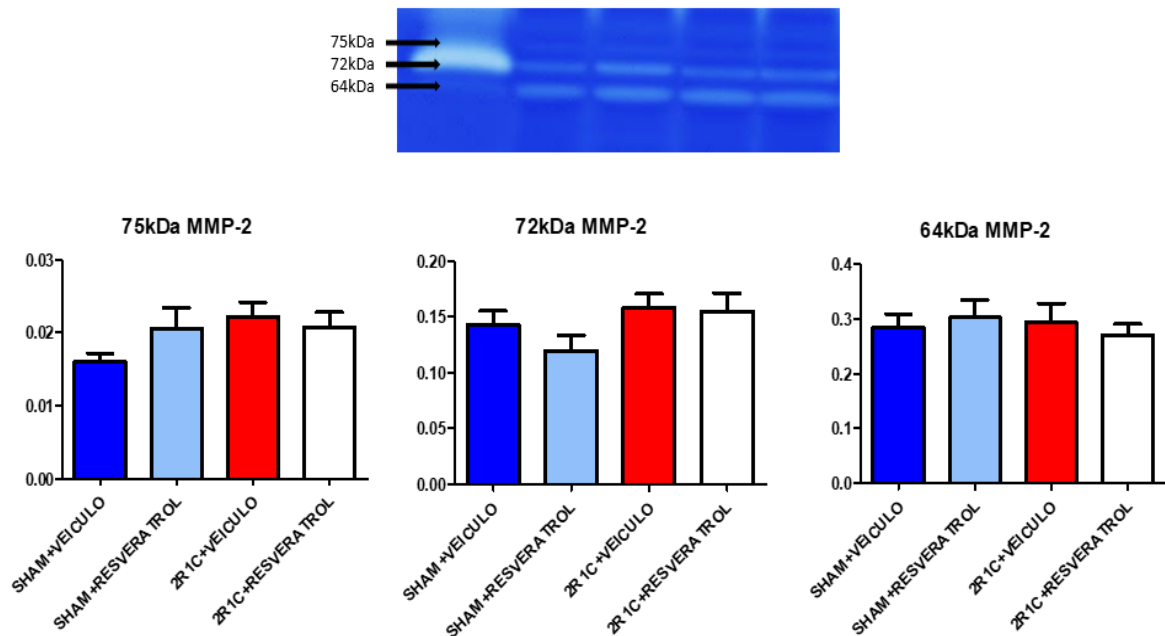


Fonte: Próprio Autor.

7.5 EFEITOS DO TRATAMENTO COM RESVERATROL SOBRE A ATIVIDADE DA MMP-2 NO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR.

Na figura 6 é visto um gel de zimografia demonstrando a quantificação das bandas de 75kDa, 72kDa e 64kDa no PVAT. Observa-se que não houve diferença significativa encontrada em nenhuma das bandas de MMP-2 no PVAT, quando os grupos experimentais foram comparados ($P < 0,05$). Tal fato pode ser justificado devido ao tempo de hipertensão não ter sido suficiente para promover o aumento da expressão proteica de MMP-2 no PVAT dos animais.

Figura 6 – Efeito do tratamento com resveratrol sobre a expressão da MMP-2 no tecido adiposo perivascular. *P<0,05 para 2R1C+RESV (100µM) versus 2R1C +VEIC. * P<0,05 para 2R1C + RESV versus 2R1C + VEÍCULO.

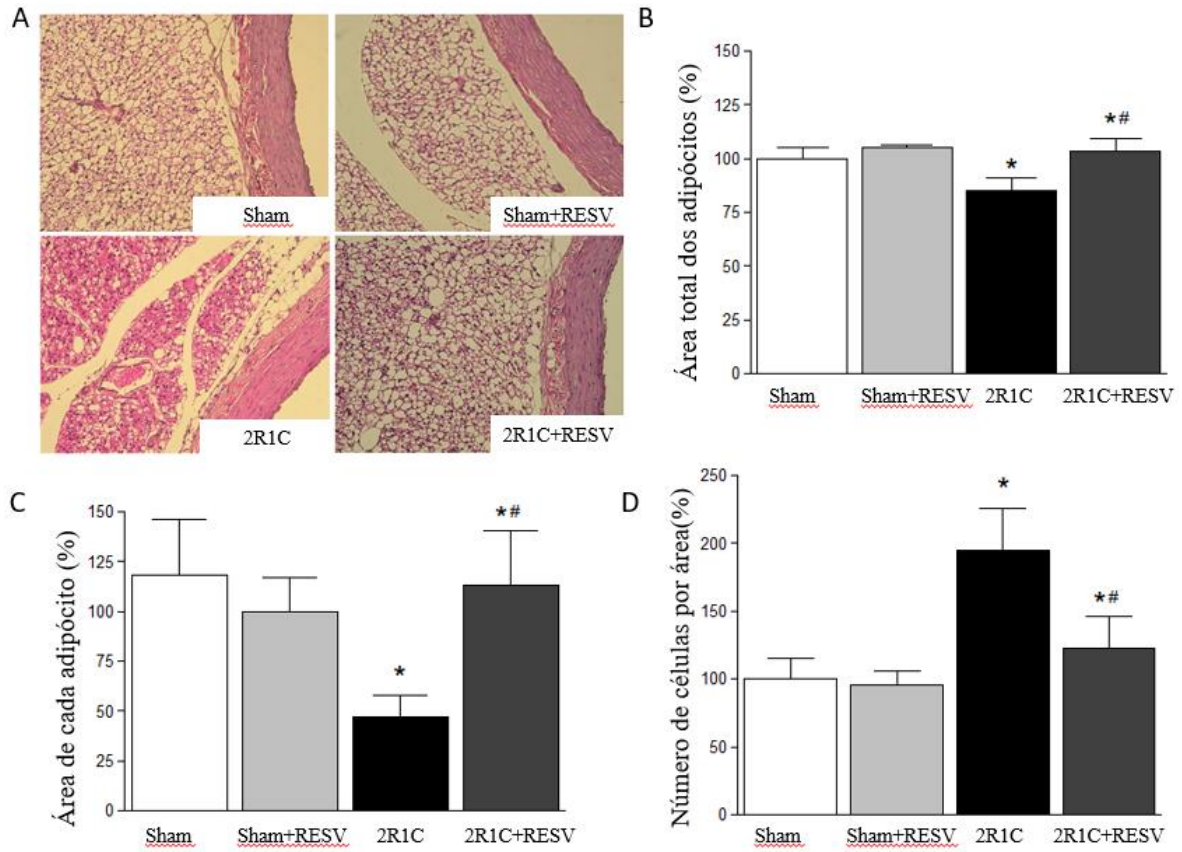


Fonte: Próprio Autor.

7.6 EFEITOS DO TRATAMENTO COM RESVERATROL SOBRE A HISTOLOGIA NO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR.

Na figura 7A, a imagem representativa dos quatro grupos experimentais mostrando a aorta e o tecido adiposo marrom. É possível observar que na figura 7B os animais hipertensos quando comparados aos animais sham apresentaram redução significativa área total ocupada pelos adipócitos, o que resultou da menor área de cada célula que foi avaliada como mostrado na figura 7C e conseqüentemente, maior número de células por área avaliada (Figura 7D). O tratamento com resveratrol reverteu todos esses parâmetros, sendo observado pelas barras dos gráficos que os animais hipertensos tratados com resveratrol, mesmo ainda hipertensos, são muito mais semelhantes aos animais sham do que os animais 2R1C tratados com veículo.

Figura 7 – Efeito do tratamento com resveratrol sobre a morfologia no tecido adiposo perivascular. # $P < 0,05$ para SHAM+VEIC versus 2R1C + RESV. * $P < 0,05$ para 2R1C + RESV versus 2R1C + VEÍCULO.



8. DISCUSSÃO

A hipertensão arterial sistólica está entre as principais doenças cardiovasculares estando associada ao índice de mortalidade global (SIGMUND *et al.*, 2020). O percentual de 10% dos casos apresenta a causa da doença bem estabelecida, ou seja, em oposição a maioria não a possui, repercutindo assim na terapia voltada para a redução da pressão arterial, sendo que 20 a 30% são resistentes a terapia anti-hipertensiva (CALHOUN *et al.*, 2008).

Vários são os fatores que contribuem para o aumento da pressão arterial, dentre eles é indispensável destacar as espécies reativas de oxigênio, que estão presentes na patologia independente do fator de causa e são caracterizadas como estresse oxidativo (MONTEZANO; TOUYZ, 2012).

O desequilíbrio entre as moléculas oxidantes e antioxidantes, desencadeia o acúmulo de EROS, caracterizando o estresse oxidativo no corpo (PUDDU *et al.*, 2008 ; SUGAMURA; KEANEY; JOHN, 2011). O aumento de EROS também é responsável pelo desencadeamento de uma gama de comorbidades, como a hipertrofia cardíaca, o remodelamento da matriz extracelular entre outras.

Com ênfase no coração, estudos mostram que vários mecanismos de sinalização intracelulares estão relacionados ao processo de hipertrofia cardíaca, sendo que o estresse oxidativo é um fator chave para este desencadeamento (RIZZI *et al.*, 2013). O estudo de moléculas antioxidantes para atenuar os casos de hipertensão é um campo próspero.

O resveratrol é uma molécula antioxidante. Foi isolado pela primeira vez em 1939 da planta *Veratrum grandiflorum* pertencente à família das *Melanthiaceae*. Após aproximadamente oito décadas, permanece operando como uma molécula promissora (PEZZUTO, 2019).

O “Paradoxo Francês” trouxe a ideia de que resveratrol seria benéfico à saúde vascular. Os franceses habitualmente faziam um elevado consumo de alimentos ricos em gordura saturada e paralelamente ao fato eles também realizavam um elevado consumo de vinho, o que acreditava minimizar o risco das doenças cardiovasculares (RENAUD; DE LORGERIL, 1992). A atuação do resveratrol é representada por múltiplos alvos, atribuída ao amplo efeito benéfico para a saúde (KHURANA *et al.*, 2013).

O interesse da ação antioxidante do resveratrol para atenuar os casos de HAS tornou-se interessante à ciência, porém a dificuldade apresenta-se em reduzir a pressão em modelos de animais e humanos (POLLACK; CRANDALL, 2013). Recentemente um trabalho mostrando

que o modelo de Goldblast é eficiente para a indução da hipertensão em animais. No mesmo trabalho a utilização de resveratrol foi associada com Captopril, gerando resultado capaz de reduzir a pressão arterial sem que haja o uso do fármaco (RESTINI, 2022). Constatando a veracidade, este trabalho reproduziu-se a técnica, comprovando que a mesma é eficiente para o desencadeamento da patologia. O resveratrol é de fato, um polifenol capaz de reduzir a pressão de maneira independente. Associado ao quadro, o desencadeamento da HVE, avaliada pelo INDEX, mostrou que novamente o resveratrol atenuou o cenário.

É sabido que o aumento de EROS pode repercutir em várias alterações fisiológicas na hipertensão arterial sistêmica (TAKIMOTO; KASS, 2007). Uma dessas alterações é, por exemplo, o aumento das MMPs, perda da contratilidade cardíaca, dentre outras (CAI, 2005; CERON *et al.*, 2010). Diferentes modelos experimentais de hipertensão mostram a importância da MMP-2 na hipertrofia cardíaca (MUJUMDAR; TYAGI, 1999; PETERSON *et al.*, 2001; IWANAGA *et al.*, 2002). No modelo de 2R1C o aumento da MMP-2 provoca danos ao quadro patológico, tal fato é visto neste trabalho no tecido cardíaco e já foi reproduzido em outros. Entretanto, o resveratrol pode ter inibido a MMP-2 pelos seus efeitos antioxidantes, que são amplamente demonstrados na literatura ou pela sua ação direta na MMP-2, assim servindo como uma molécula protetora para a HAS.

Presente na uva, no vinho e outros produtos que contenham resveratrol, a molécula é capaz de reduzir a pressão arterial em uma gama de modelos animais, dentre eles 2R1C, proporcionando atenuação da hipertrofia cardíaca e é capaz de modificar alterações em vários tecidos (HAMZA; DYCK, 2014). Para tanto, ciente dos benefícios do resveratrol no tecido cardíaco e sabendo que há alterações no PVAT durante a HAS, o mesmo tornou-se objeto de estudo. Realmente, alterações no PVAT foram notadas e o quadro foi revertido utilizando o resveratrol, muito embora tais alterações não tenham sido ocasionadas pelo aumento de MMP-2.

Aumentos de MMP-2 são notados nas CMLV no PVAT (MAN *et al.*, 2020). Embora não tenha sido notado o aumento da MMP-2 no PVAT, neste trabalho, o fato pode estar relacionado com o modelo experimental e período utilizados, ficando inapropriado relatar o efeito do resveratrol na MMP-2 neste tecido. Ainda, podendo ser especulado o efeito do resveratrol em modelos que tenham aumento da proteína. Entretanto o resveratrol se mostra efetivo em atenuar as alterações morfológicas, sugerindo assim que outras vias possam estar envolvidas, como a via antioxidantes.

É sabido que durante as doenças cardiovasculares, como na hipertensão arterial, ocorre uma disfunção endotelial do PVAT (PAN, XIAO-XI *et al.*, 2019). A disfunção do PVAT possui

como característica o aumento da produção de citocinas, leptina, bem como o estresse oxidativo levando a disfunção das CMLV e consequentemente caracterizando o quadro da HAS (NOSALSKI; GUZIK, 2017; HU *et al.*, 2021).

É de extrema importância notar que a MMP-2 apresenta maior significância para o tecido cardíaco quando comparada ao PVAT. Porém, no PVAT deve haver outro mecanismo para que o resveratrol apresentou seus benefícios, que não seja a via da MMP-2, podendo ser por exemplo, sua ação antioxidante. Ainda, pode-se afirmar que o resveratrol apresenta benefícios que se complementam por atenuar, a via MMP-2 para o tecido cardíaco e as alterações morfológicas para o PVAT, sustentando a hipótese deste trabalho.

O aumento de MMP-2 encontrado no coração já havia sido encontrado em outros estudos, porém o efeito redutor advindo do resveratrol sobre a MMP-2 foi a primeira vez mostrado na hipertensão, *in vivo* e *in vitro*, repercutindo em efeitos antioxidantes e inibição direta.

9. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que o resveratrol contribui para atenuar a pressão arterial sistêmica e hipertrofia cardíaca. Em destaque, pode-se concluir que o resveratrol possui efeito benéfico no coração, por inibir a MMP-2 neste tecido via antioxidante ou diretamente. Embora seja sabido que há alterações cardíacas no PVAT, não houve aumento de MMP-2 no tecido, sendo assim, outras vias devem ser estudadas, porém, a molécula é eficiente no remodelamento do tecido. Em suma, nota-se que o resveratrol é eficaz no tecido cardíaco e no PVAT por diferentes vias, afim de proporcionar benfeitorias na HAS.

REFERÊNCIAS

- AGHAMOHAMMADZADEH, R.; GREENSTEIN, A. S.; YADAV, R.; JEZIORSKA, M.; HAMA, S.; SOLTANI, F.; PEMBERTON, P. W.; AMMORI, B.; MALIK, R.A.; SORAN H.; HEAGERTY, A. M. Effects of bariatric surgery on human small artery function: evidence for reduction in perivascular adipocyte inflammation, and the restoration of normal anticontractile activity despite persistent obesity. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 2, p. 128-135, 2013.
- AZHAR, Y.; PARMAR, A.; MILLER, C. N.; SAMUELS, J. S.; RAYALAM, S. Phytochemicals as novel agents for the induction of browning in white adipose tissue. **Nutr Metab (Lond)**, v. 13, p. 89, 2016.
- BECHER, T.; PALANISAMY, S.; KRAMER, D.J.; ELJALBY, M.; MARX, S.J.; WIBMER, A.G.; BUTLER, S. D.; JIANG, C.S.; VAUGHAN, R.; SCHÖDER, H.; MARK A.; COHENP.; Brown adipose tissue is associated with cardiometabolic health. **Nature medicine**, v. 27, n. 1, p. 58-65, 2021.
- BELO, V. A.; GUIMARÃES, D. A.; CASTRO, M. M. Matrix metalloproteinase 2 as a potential mediator of vascular smooth muscle cell migration and chronic vascular remodeling in hypertension. **Journal of vascular research**, v. 52, n. 4, p. 221-231, 2015.
- BERK, B. C.; FUJIWARA, K.; LEHOUX, S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 3, p. 568-575, 2007.
- BROWN, N. K.; ZHOU, Z.; ZHANG, J.; ZENG, R.; WU, J.; EITZMAN, D. T.; CHEN, E.; CHANG, L. Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 34, n. 8, p. 1621-1630, 2014.
- CALHOUN, D. A.; JONES, D.; TEXTOR, S.; GOFF, D. C.; MURPHY, T. P.; TOTO, R. D.; WHITE, A.; CUSHMAN, W. C.; WHITE, W.; SICA, D.; FERDINAND, K.; GILES, T.D.; FALKNER, B.; CAREY, R. M. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. **Hypertension**, v. 51, n. 6, p. 1403-1419, 2008.
- CAI, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. **Cardiovascular research**, v. 68, n. 1, p. 26-36, 2005.
- CARVALHO, K. F. D. S.; FERREIRA, A. A. M.; BARBOSA, N. C.; ALVES, J. V.; COSTA, R. M. D. Atorvastatin Attenuates Vascular Remodeling in Mice with Metabolic Syndrome. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 117, p. 737-747, 2021.
- CERON, C. S.; CASTRO, M. M.; RIZZI, E.; MONTENEGRO, M. F.; FONTANA, V.; SALGADO, M. C. D. O.; GERLACH, R.F.; TANUS-SANTOS, J. E. Spironolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and expression in a model of renovascular hypertension. **British journal of pharmacology**, v. 160, n. 1, p. 77-87, 2010.

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

COMINETTI, C.; HORST, M. A.; ROGERO, M. M. Brazilian Society for Food and Nutrition position statement: nutrigenetic tests. **Nutrire**, v. 42, n. 1, p. 10, 2017.

CPPAS - COMISSÃO PERMANENTE DE PROTOCOLOS DE ATENÇÃO À SAÚDE (2018). Protocolo de Atenção à Saúde. Manejo da Hipertensão Arterial Sistêmica e Diabetes Mellitus na Atenção Primária à Saúde. Governo do Distrito Federal, 2018.

DRUMMOND, G. R.; VINH, A.; GUZIK, T. J.; SOBEY, C. G. Immune mechanisms of hypertension. **Nature Reviews Immunology**, p. 1, 2019.

FRIGOLET, M. E.; GUTIÉRREZ-AGUILAR, R. The colors of adipose tissue. **Gazeta Médica do México**, v.156, n. 2, p.142-149, 2020.

GÁLVEZ-PRieto, B.; BOLBRINKER, J.; STUCCHI, P.; DE LAS HERAS; A. I.; MERINO, B.; ARRIBAS, S.; RUIZ-GAYO, M.; HUBER, M.; WEHLAND, M.; KREUTZ, R.; FERNANDEZ-ALFONSO, M. S. Comparative expression analysis of the renin-angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. **Journal of Endocrinology**, v. 197, n. 1, p. 55-64, 2008.

GOLDBLATT, H. "Experimental renal hypertension; mechanism of production and maintenance." **Circulation** v.17, n.4, p.7-642, 1958.

GUIMARÃES, D. A.; RIZZI, E.; CERON, C. S.; MARTINS-OLIVEIRA, A.; GERLACH, R. F.; SANTOS, J. E. T. D. Inibição de metaloproteinases da matriz extracelular: uma possível estratégia terapêutica na hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 17, n. 14, p. 226-30, 2010.

HAMZA, S. M.; DYCK, J. R. B. Systemic and renal oxidative stress in the pathogenesis of hypertension: modulation of long-term control of arterial blood pressure by resveratrol. **Frontiers in physiology**, v. 5, p. 292, 2014.

HU, H.; GARCIA-BARRIO, M.; JIANG, Z. S.; CHEN, Y. E.; CHANG, L. Roles of perivascular adipose tissue in hypertension and atherosclerosis. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 34, n. 9, p. 736-749, 2021.

IADECOLA, C.; YAFFE, K.; BILLER, J.; BRATZKE, L. C.; FARACI, F. M.; GORELICK, P. B.; GULATI, M.; KAMEL, H.; KNOPMAN, D. S.; LAUNER, L. J.; SACZYNSKI, J. S.; SESHADRI, S.; HAZZOURI, A.Z. Impact of hypertension on cognitive function: a scientific statement from the American Heart Association. **Hypertension**, v.68, p. e67–e94, 2016.

IWANAGA, Y.; AOYAMA, T.; KIHARA, Y.; ONOZAWA, Y.; YONEDA, T., SASAYAMA, S. Excessive activation of matrix metalloproteinases coincides with left ventricular remodeling during transition from hypertrophy to heart failure in hypertensive rats. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 39, n. 8, p. 1384-1391, 2002.

- KANDASAMY, A. D.; CHOW, A. K.; ALI, M. A.; SCHULZ, R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. **Cardiovascular research**, v.85, n.3, p. 413-423, 2009.
- KHURANA, S.; VENKATARAMAN, K.; HOLLINGSWORTH, A.; PICHE, M.; TAI, T.C. Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging. **Nutrients**, v. 5, n.10, p. 3779-3827, 2013.
- KONSTANTINIDI, M.; KOUTELIDAKIS, A. E. Functional foods and bioactive compounds: A review of its possible role on weight management and obesity's metabolic consequences. **Medicines**, v. 6, n. 3, p. 94, 2019.
- LI, H.; XIA, N.; HASSELWANDER, S.; DAIBER, A. Resveratrol and vascular function. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 9, p. 2155, 2019.
- MAN, A. W.; ZHOU, Y.; XIA, N.; LI, H. Perivascular adipose tissue as a target for antioxidant therapy for cardiovascular complications. **Antioxidants**, v. 9, n. 7, p. 574, 2020.
- MARTINS-OLIVEIRA, A.; GUIMARAES, D. A.; CERON, C. S.; RIZZI, E.; OLIVEIRA, D. M.; TIRAPELLI, C. R.; ; FERNANDES, F. B.; PINHEIRO, L.C.; TANUS-SANTOS, J. E. Direct renin inhibition is not enough to prevent reactive oxygen species generation and vascular dysfunction in renovascular hypertension. **European journal of pharmacology**, v.821, p.97-104, 2018.
- MIAO, C.; LI, Z. The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. **British journal of pharmacology**, v. 165, n. 3, p. 643-658, 2012.
- MILLS K.T.; BUNDY J.D.; KELLY T.N.; REED J.E.; KEARNEY P.M.; REYNOLDS K.; CHEN, J.; HE J. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-Based Studies From 90 Countries. **Circulation**, v.134, p.441-450, 2016.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Políticas de Saúde. Hipertensão é diagnosticada em 24,7% da população, segundo a pesquisa Vigitel. Brasília (DF), 2019.
- MUJUMDAR, V. S.; TYAGI, S. C. Temporal regulation of extracellular matrix components in transition from compensatory hypertrophy to decompensatory heart failure. **Journal of hypertension**, v. 17, n. 2, p. 261-270, 1999.
- MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Molecular mechanisms of hypertension—reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 28, n. 3, p. 288-295, 2012.
- NOSALSKI, R.; GUZIK, T. J. Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease. **British journal of pharmacology**, v. 174, n. 20, p. 3496-3513, 2017.
- PAN, X. X.; RUAN, C. C.; LIU, X. Y.; KONG, L. R.; MA, Y.; WU, Q. H.; LI, H.; SUN, Y.; CHEN, A.; ZHAO, Q.; WU, F.; WANG, X.; WANG, J.; ZHU, D.; GAO, P. J. Perivascular adipose tissue-derived stromal cells contribute to vascular remodeling during aging. **Aging Cell**, v. 18, n. 4, p. e12969, 2019.

PANNU N.; BHATNAGAR, A. Resveratrol: From enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.109, p.2237-2251, 2019.

PARENTE J. M.; CASTRO M. M. Matrix metalloproteinase in the cardiovascular remodeling of hypertension: current insights and therapeutic potential. **Metalloproteinases In Medicine**, v.5, p.1-11, 2018.

PETERSON, J. T.; HALLAK, H.; JOHNSON, L.; LI, H.; O'BRIEN, P. M.; SLISKOVIC, D. R.; BOCAN, T. M. A.; COKER, M.L.; ETOH, T.; SPINALE, F. G. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure. **Circulation**, v. 103, n. 18, p. 2303-2309, 2001.

PEZZUTO, J. M. Resveratrol: twenty years of growth, development and controversy. **Biomolecules and therapeutics**, v.27, n.1, p. 1-14, 2019.

PIOTROWSKA, H.; KUCINSKA, M.; MURIAS, M. Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 750, n. 1, p. 60-82, 2012.

PITTAYAPRUEK, P.; MEEPHANSAN, J.; PRAPAPAN, O.; KOMINE, M.; OHTSUKI, M. Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 6, p. 868, 2016.

POLLACK, R. M.; CRANDALL, J. P. Resveratrol: therapeutic potential for improving cardiometabolic health. **American journal of hypertension**, v. 26, n. 11, p. 1260-1268, 2013.

POND, C. Ecology of storage and allocation of resources: animals. **Encyclopedia of Life Sciences**, v.1, n.5, 2001.

PUDDU, P.; PUDDU, G. M.; CRAVERO, E.; ROSATI, M.; MUSCARI, A. The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension. **Blood Pressure**, v. 17, n. 2, p. 70-77, 2008.

RENAUD, S. C.; DE LORGERIL, M. Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. **Lancet**, v. 339, p. 1523-1526, 1992.

RESTINI, C. B., GARCIA, A. F., NATALIN, H. M., CARMO, M. F., NOWICKI, V. F., RIZZI, E., RAMALHO, L. N. Resveratrol Supplants Captopril's Protective Effect on Cardiac Remodeling in a Hypertension Model Elicited by Renal Artery Stenosis. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 95, n. 1, p. 57, 2022.

RIZZI, E.; CERON, C. S.; GUIMARAES, D. A.; PRADO, C. M.; ROSSI, M. A.; GERLACH, R. F.; TANUS-SANTOS, J. E. Temporal changes in cardiac matrix metalloproteinase activity, oxidative stress, and TGF- β in renovascular hypertension-induced cardiac hypertrophy. **Experimental and molecular pathology**, v. 94, n. 1, p. 1-9, 2013.

SIGMUND, C. D.; CAREY, R. M.; APPEL, L. J.; ARNETT, D. K.; BOSWORTH, H. B.; CUSHMAN, W. C.; GALIS, Z.S.; PARKER, M. G.; HALL, J. E.; HARRISON, D. G.; MCDONOUGH, A. A.; NICASTRO, H. L.; OPARIL, S.; OSBORN, J. W.; RAIZADA, M.

K.; WRIGHT, J. D.; OH, Y. S. Report of the national heart, lung, and blood institute working group on hypertension: Barriers to translation. **Hypertension**, v. 75, n. 4, p. 902-917, 2020.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2017.

SHOIEB, S. M.; EL-KADI, A. O.S. Resveratrol Protects Against Angiotensin II-Induced Cellular Hypertrophy through Inhibition of CYP1B1/Mid-Chain Hydroxyeicosatetraenoic Acid Mechanism. **The FASEB Journal**, v. 33, n. S1, p. 817.3-817.3, 2019.

SPINALE, F. G. "Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function." **Physiological Reviews** v.87, n.4, p.1285-34, 2007.

STANEK, A.; BROŻYNA-TKACZYK, K.; MYŚLIŃSKI, W. The role of obesity-induced perivascular adipose tissue (PVAT) dysfunction in vascular homeostasis. **Nutrients**, v. 13, n. 11, p. 3843, 2021.

SUGAMURA, K.; KEANEY J.R., JOHN F. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. **Free radical biology and medicine**, v. 51, n. 5, p. 978-992, 2011.

SUN, Y.; LI, J.; XIAO, N.; WANG, M.; KOU, J.; QI, L.; HUANG, F.; LIU, B.; LIU, K. Pharmacological activation of AMPK ameliorates perivascular adipose/endothelial dysfunction in a manner interdependent on AMPK and SIRT1. **Pharmacological Research**, v. 89, p. 19-28, 2014.

TAKIMOTO, E; KASS, D.A. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. **J. Hypertension**, v.49, n.2, p. 241-8, 2007.

TANGNEY, C. C.; RASMUSSEN, H. E. Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. **Current atherosclerosis reports**, v. 15, n. 5, p. 1-10, 2013.

THAPA, S. B.; PANDEY, R. P.; PARK, Y. I.; SOHNG, J. K. Biotechnological advances in resveratrol production and its chemical diversity. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2571, 2019.

THEODOTOU, M.; FOKIANOS, K.; MOUZOURIDOU, A.; KONSTANTINOU, C.; ARISTOTELOUS, A.; PRODROMOU, D.; CHRYSIKOU, A. The effect of resveratrol on hypertension: a clinical trial. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 13, n. 1, p. 295-301, 2017.

TOGLIATTO, G.; LOMBARDO, G.; BRIZZI, M. F. The future challenge of reactive oxygen species (ROS) in hypertension: from bench to bedside. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 9, p. 1988, 2017.

XIA, N.; LI, H. The role of perivascular adipose tissue in obesity-induced vascular dysfunction. **British journal of pharmacology**, v. 174, n. 20, p. 3425-3442, 2017.

WEHBE, N., NASSER, S. A., PINTUS, G., BADRAN, A., EID, A. H., BAYDOUN, E. MicroRNAs in Cardiac Hypertrophy. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n.19, p.4714, 2019.