

Editora: Fernanda Consolim-Colombo

## **Inibição de metaloproteinases da matriz extracelular: uma possível estratégia terapêutica na hipertensão arterial?**

### **Inhibition of matrix metalloproteinases: a possible therapeutic strategy in arterial hypertension?**

*Danielle Aparecida Guimarães<sup>1</sup>, Élen Rizzi<sup>1</sup>, Carla Speroni Ceron<sup>1</sup>, Alisson Martins-Oliveira<sup>1</sup>, Raquel Fernanda Gerlach<sup>2</sup>, José Eduardo Tanus dos Santos<sup>1</sup>*

#### **RESUMO**

A hipertensão é um importante problema de saúde pública associado ao aumento do risco de doenças cardiovasculares. Dentre outros modelos utilizados experimentalmente para estudar a hipertensão arterial, o modelo de hipertensão 2 rins-1clipe (2R1C) está associado à significativa ativação do sistema renina-angiotensina, produzindo alterações vasculares possivelmente decorrentes do aumento do estresse oxidativo e da ativação excessiva de metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs). As MMPs são reguladas por vários processos, e a ativação dessas proteases promove degradação excessiva dos componentes da matriz extracelular e desse modo provoca um remodelamento vascular patológico. Entre várias dessas enzimas proteolíticas, as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) têm merecido destaque por terem um importante papel nas doenças cardiovasculares. Estudos demonstram que o aumento na atividade e nos níveis de MMP-2 pode prejudicar o relaxamento vascular dependente do endotélio e causar hipertrofia arterial, especialmente da camada média, deposição excessiva de colágeno e elastina e, desse modo, contribuir para disfunção e remodelamento vascular hipertensivo. Portanto, como as MMPs desempenham importante papel no desenvolvimento e progressão de diversas doenças cardiovasculares, a inibição dessas proteases tem sido muito estudada e valorizada como uma importante estratégia terapêutica para o tratamento dessas doenças, inclusive das consequências deletérias da hipertensão arterial.

#### **PALAVRAS-CHAVE**

Hipertensão 2R1C, metaloproteinases da matriz extracelular, remodelamento vascular.

#### **ABSTRACT**

Hypertension is an important public health problem associated with increased risk of cardiovascular disease. The experimental model of hypertension-2 kidney 1clipe (2K1C) promotes significant activation of the renin-angiotensin system, and produces vascular changes associated with increased oxidative stress and upregulation of extracellular matrix metalloproteinases (MMPs). MMPs can be regulated by several processes, and increased activation of these proteases promotes excessive degradation of extracellular matrix components, thereby causing pathological vascular remodeling. Among these proteolytic enzymes, the gelatinases (MMP-2 and MMP-9), have shown an important role in cardiovascular disease. Studies show that increased activity and levels of MMP-2 may impair the endothelium-dependent vasorelaxation and cause artery wall hypertrophy, excessive deposition of collagen and elastin, thus contributing to dysfunction and hypertensive vascular remodeling. Therefore, as the MMPs play an important role in the development and progression of various cardiovascular diseases, inhibiting these proteases has been valued as a possible therapeutic strategy in the treatment of cardiovascular diseases, including the complications associated with hypertension.

#### **KEYWORDS**

2K1C hypertension, extracellular matrix metalloproteinases, vascular remodeling.

Recebido: 12/7/2010 Aceito: 14/8/2010

1 Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

2 Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP).

Correspondência para: José Eduardo Tanus dos Santos. Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre – 14049-900 – Ribeirão Preto, SP, Brasil. Telefax: (+55 16) 3633-2301. Telefone: (+55 16) 3602-3163. E-mail: tanus@fmrp.usp.br/tanussantos@yahoo.com

## ALTERAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS DA HIPERTENSÃO ARTERIAL

A hipertensão é um crescente problema de saúde pública, associado à elevada morbidade e mortalidade<sup>1,2</sup>. É uma doença multifatorial e está intimamente associada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares, bem como a alterações patológicas nos mecanismos vasculares, hormonais, neuronais e renais de controle da pressão arterial<sup>3-5</sup>. Durante a hipertensão, ocorrem várias alterações vasculares e funcionais, incluindo o aumento do estresse oxidativo, o que tem sido evidenciado em pacientes com hipertensão essencial e em modelos experimentais de hipertensão<sup>6,7</sup>. Além disso, ocorre um remodelamento vascular, o qual envolve a ativação de vias proteolíticas que contribuem para a mudança estrutural que ocorre na matriz extracelular<sup>8</sup>.

## REMODELAMENTO VASCULAR

Em condições fisiológicas, a elasticidade intrínseca dos grandes vasos atenua as variações periódicas de pressão<sup>9</sup>. No entanto, em condições de elevada pressão arterial, como na hipertensão arterial crônica, ocorrem mudanças na parede da artéria conhecidas por remodelamento vascular<sup>10</sup>, o que é considerado uma resposta adaptativa para normalizar a tensão na parede do vaso<sup>11</sup>. Algumas modificações específicas que ocorrem no vaso são: disfunção endotelial, espessamento da parede, hipertrofia e hiperplasia das células do músculo liso vascular, migração, proliferação e apoptose celular, além de deposição de componentes da matriz extracelular<sup>10,12-14</sup>.

Nas artérias de condutância, como a aorta, ocorre o remodelamento hipertrófico que envolve tanto o aumento na razão da espessura da média pelo diâmetro do lúmen do vaso (razão M/L) quanto na área de secção transversal (AST), enquanto o lúmen do vaso é inalterado<sup>9,13,15</sup>. Um mecanismo pelo qual o remodelamento vascular ocorre é por meio da degradação e reorganização da matriz na parede do vaso<sup>5</sup>, devido à ativação das metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs)<sup>8</sup>. Além disso, a ativação do sistema renina-angiotensina induz efeitos na estrutura vascular, como crescimento e fibrose, sendo um importante regulador do remodelamento e inflamação vascular<sup>15</sup>.

## O MODELO DE HIPERTENSÃO 2R1C

A fisiopatologia da hipertensão é bastante heterogênea e vários modelos animais têm sido propostos com o intuito de estudar os fenômenos que ocorrem na hipertensão essencial<sup>16</sup>. O modelo experimental de hipertensão 2 rins-1 clipe (2R1C), desenvolvido por Goldblatt (1939), é relacionado à significativa ativação do sistema renina-angiotensina, sendo muito semelhante ao quadro de hipertensão renovascular em humanos<sup>17</sup>. Nesse modelo, ocorre inicialmente uma diminuição na perfusão renal, que leva

à liberação de renina e subsequente produção de angiotensina II circulante (Ang II), o que resulta em vasoconstrição acentuada, retenção de sódio e água (mediados pela aldosterona), entre outros fatores, com consequente aumento da pressão arterial<sup>18,19</sup>.

A Ang II ativa a enzima-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase do endotélio vascular e das células do músculo liso vascular e, subsequentemente, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)<sup>20</sup>. Nesse contexto, demonstrou-se *in vitro* que as EROs podem ativar a MMP-2 e a MMP-9 secretadas do músculo liso vascular, ao reagir com grupo tiol que preserva a latência das MMPs<sup>21</sup>. Desse modo, desencadeia-se um progressivo dano cardiovascular e renal, resultando em acentuadas alterações vasculares associadas a um significativo aumento da atividade das MMPs<sup>17,18,22</sup>.

## AS METALOPROTEINASES DA MATRIZ EXTRACELULAR

Recentes estudos indicam que um grupo de endopeptidases dependentes de cálcio e que também contêm zinco ( $Zn^{2+}$ ), de onde são conhecidas por metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs), desempenha importante papel no remodelamento vascular presente em muitas doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão<sup>12,23-26</sup>.

As MMPs degradam várias proteínas da matriz extracelular quebrando-as em suas ligações peptídicas específicas e são expressas em vários tipos celulares e tecidos, incluindo células da musculatura vascular lisa, endotélio, fibroblastos e células inflamatórias<sup>5,24,27</sup>. Basicamente, as MMPs são compostas de um sítio catalítico contendo  $Zn^{2+}$  e cálcio e de um pró-peptídeo ligado ao sítio catalítico por uma ligação sulfidril<sup>5</sup>. Por terem propriedades potencialmente destrutivas, as MMPs são sintetizadas como pró-formas, enzimaticamente inativas e denominada de zimogênios<sup>28</sup>. Assim, a ativação enzimática requer a remoção do domínio pró-peptídeo por meio da degradação deste por outras proteases, tais como plasmina, ou por MT-MMPs (MMPs do tipo membrana)<sup>29</sup>.

A atividade das MMPs pode ser regulada por vários fatores como citocinas, hormônios, fatores de crescimento, estresse de cisalhamento e estresse oxidativo<sup>30</sup>. Essa regulação pode ser feita em três níveis: indução da transcrição gênica, modificação pós-traducional e interação das MMPs com seus inibidores teciduais endógenos, os TIMPs (inibidores teciduais de MMPs)<sup>28,29,31</sup>. Em condições fisiológicas, existe um equilíbrio entre a razão de MMPs e TIMPs. Entretanto, em processos patológicos como a hipertensão arterial, ocorre um desequilíbrio dessa razão, levando à degradação excessiva das proteínas da matriz extracelular<sup>29</sup> e consequentemente ao remodelamento vascular patológico<sup>32</sup>.

## IMPORTÂNCIA DA MMP-2 NA HIPERTENSÃO ARTERIAL

A atividade aumentada das MMPs participa de vários processos patológicos como a invasão de células tumorais e a formação de metástases<sup>33</sup>, doenças fibróticas e artrite reumatoide<sup>34</sup>. Dentre essas enzimas proteolíticas, MMP-2 e MMP-9 têm apresentado um importante papel nas doenças cardiovasculares como aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, doença cardíaca isquêmica, aneurismas vasculares e hipertensão<sup>12,35-38</sup>.

A MMP-2 é uma gelatinase que é expressa de forma constitutiva. Possui um domínio chamado de "fibronectin like", que é responsável pelo reconhecimento do colágeno tipo I, IV, V, VII e X, gelatina (colágeno desnaturado), laminina e elastina<sup>23</sup>. A pró-MMP-2 (72 KDa) é processada por ação combinada da MMP-14 e do TIMP-2 a uma forma enzimaticamente ativa (64 KDa). Entretanto, o estresse oxidativo aumentado e a ação do peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) podem ativar a pró-MMP-2 sem remover o pró-peptídeo autoinibitório, mantendo-se o mesmo peso molecular da forma inativa (72 KDa)<sup>27,39</sup>.

Recentemente, foram demonstradas elevada expressão e atividade da MMP-2 e da MMP-9 no remodelamento vascular em pacientes hipertensos<sup>40,41</sup> e em modelos animais<sup>12,26,42-46</sup>. Estudos realizados em nosso laboratório sugerem que o aumento na atividade e nos níveis de MMP-2 possa prejudicar o relaxamento vascular dependente do endotélio e causar hipertrofia na parede das artérias e deposição excessiva de colágeno e elastina, contribuindo, assim, para disfunção e remodelamento vascular hipertensivo<sup>12,25,45,47</sup>.

Uma vez que o estresse oxidativo ativa as MMPs, especialmente a MMP-2, algumas drogas anti-hipertensivas como a lercanidipina, uma di-hidropiridina de terceira geração, bloqueadora de canais de cálcio, são capazes de atenuar o aumento do estresse oxidativo e, conseqüentemente, da atividade da MMP-2 induzidos pela hipertensão 2R1C<sup>45</sup>. Outras di-hidropiridinas de outras gerações, tais como a nifedipina, a amlodipina e a nimodipina, também produzem os mesmos efeitos, sugerindo que esses efeitos não dependem da geração dessas drogas, pelo menos em relação aos seus efeitos antioxidantes, inibição de MMPs e remodelamento vascular na hipertensão 2R1C<sup>48</sup>. Outros estudos também realizados em nosso laboratório demonstram que drogas como o tempol, um sequestrador de EROs, e a espironolactona, um antagonista da aldosterona que produziu efeitos antioxidantes, atenuaram o aumento na expressão e na atividade da MMP-2 e o remodelamento vascular associado ao modelo 2R1C<sup>25,47</sup>.

Embora as MMPs sejam conhecidas pelo seu papel no remodelamento da matriz extracelular, recentes evidências têm mostrado que a MMP-2 também desempenha importante papel intracelular, especialmente em resposta ao estresse oxidativo

durante a injúria de isquemia/reperfusão cardíaca<sup>27,49</sup>. Além disso, a MMP-2 também pode aumentar a contratilidade vascular ao clivar peptídeos envolvidos no controle do tônus vascular como a big endotelina-1<sup>50</sup>, o peptídeo vasodilatador CGRP (peptídeo relacionado ao gene calcitonina)<sup>51</sup> e a adrenomedulina<sup>52</sup>, desse modo promovendo a disfunção vascular encontrada em modelos de hipertensão arterial.

## EFEITOS DA DOXICICLINA SOBRE AS MMPs

Considerando-se as evidências que implicam as MMPs no desenvolvimento e progressão de diversas doenças cardiovasculares, inibi-las tornou-se muito atrativo. De fato, vários estudos recentes têm demonstrado que inibir essas proteases pode ser uma importante estratégia terapêutica para o tratamento, por exemplo, da hipertensão arterial e de suas conseqüências deletérias. A doxiciclina é uma tetraciclina capaz de inibir a atividade das MMPs independentemente de sua ação antimicrobiana<sup>53</sup>. É considerada o inibidor mais potente e não seletivo de MMPs<sup>54</sup>. Embora as tetraciclinas sejam quelantes de Zn<sup>2+</sup><sup>55</sup>, o mecanismo primário de inibição das MMPs pela doxiciclina não está esclarecido. Entretanto, foi proposto que a doxiciclina possa se ligar próximo ao Zn<sup>2+</sup> no sítio catalítico e romper a ligação entre esse íon e o cálcio, bloqueando, assim, o sítio ativo e inibindo a atividade de MMPs<sup>56</sup>.

A doxiciclina é o único inibidor de MMPs aprovado para uso clínico pelo FDA (*US Food and Drug Administration*) para o tratamento de doenças periodontais<sup>57</sup> em dose "subantimicrobiana", ou seja, em doses que produzem concentrações plasmáticas menores do que as requeridas para sua ação antimicrobiana<sup>58</sup>. Além disso, o uso da doxiciclina tem demonstrado efeitos benéficos no tratamento de outras doenças em que as MMPs desempenham papéis patológicos, tais como aneurisma aórtico abdominal<sup>59</sup>, infarto agudo do miocárdio<sup>60</sup> e câncer de colo retal<sup>61</sup>.

Estudos sugerem que a doxiciclina possa reduzir significativamente o aumento da atividade da MMP-2 em artérias de resistência e de condutância<sup>12,42</sup>, atenuando, assim, o remodelamento ventricular após infarto do miocárdio<sup>60</sup> por diminuir a atividade da MMP-2 e MMP-9<sup>62</sup>. Além disso, a doxiciclina parece estabilizar placas ateroscleróticas por inibir MMPs em carótidas<sup>63</sup>, podendo também reduzir a produção de MMP-2 por células do músculo liso vascular. Isso pode decorrer da diminuição da estabilidade do RNAm para MMPs<sup>64</sup>. Também já foi demonstrado que a doxiciclina diminui a degradação da matriz extracelular em aneurisma aórtico abdominal<sup>59,65</sup>.

Castro *et al.*<sup>12</sup> mostraram que a doxiciclina pode inibir o remodelamento vascular induzido pela hipertensão arterial experimental 2R1C em ratos, utilizando-se doses que seriam consideradas muito grandes (30 mg/kg/dia), ao menos em

comparação com o padrão da dose antimicrobiana de doxiciclina usada em humanos<sup>65</sup>. De fato, o uso de doses elevadas de doxiciclina administradas em humanos, visando inibir MMPs, poderia levar ao desenvolvimento de resistência bacteriana, o que poderia dificultar o tratamento de determinadas infecções bacterianas, além de causar outros tipos de efeitos adversos. Assim, em nosso laboratório foi avaliado o efeito de doses inferiores a 30 mg/kg/dia de doxiciclina sobre as alterações vasculares associadas à hipertensão experimental 2R1C<sup>66</sup>. Observamos que a doxiciclina, 30 mg/kg/dia, diminuiu os níveis de MMP-2 na aorta, reverteu a disfunção endotelial, além de ter atenuado as alterações vasculares encontradas em ratos hipertensos 2R1C. Entretanto, doses de 3 e 10 mg/kg/dia não produziram tais efeitos, sugerindo que doses de doxiciclina inferiores a 30 mg/kg/dia não atenuam as alterações vasculares encontradas no modelo de hipertensão 2R1C<sup>66</sup>. Contudo, estudos em humanos deveriam ser realizados visando testar a hipótese de que baixas doses de doxiciclina inibem as alterações cardiovasculares associadas à hipertensão arterial.

Assim, pode-se concluir que as MMPs desempenham importante papel no desenvolvimento das alterações associadas à hipertensão experimental 2R1C, especialmente ao participar do remodelamento vascular patológico. Inibir tais proteases pode tornar-se uma importante estratégia terapêutica para o tratamento das alterações vasculares associadas à hipertensão arterial.

## REFERÊNCIAS

- Sarafidis PA, Bakris GL. Resistant hypertension: an overview of evaluation and treatment. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(22):1749-57.
- VI Diretriz Brasileira de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol*. 2010;1-51.
- Kannel WB. Hypertension as a risk factor for cardiac events: epidemiologic results of long-term studies. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993;21(Suppl 2):S27-37.
- Himmelmann A, Hedner T, Hansson L, O'Donnell CJ, Levy D. Isolated systolic hypertension: an important cardiovascular risk factor. *Blood Press*. 1998;7(4):197-207.
- Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2008;75(2):346-59.
- Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation*. 2003;108(17):2034-40.
- Zhang Y, Griendling KK, Dikalova A, Owens GK, Taylor WR. Vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension is mediated by vascular smooth muscle cell-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Hypertension*. 2005;46(4):732-7.
- Ruddy JM, Jones JA, Stroud RE, Mukherjee R, Spinale FG, Ikonomidis JS. Differential effects of mechanical and biological stimuli on matrix metalloproteinase promoter activation in the thoracic aorta. *Circulation*. 2009;120(11 Suppl):S262-8.
- Arribas SM, Hinek A, Gonzalez MC. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacol Ther*. 2006;111(3):771-91.
- Fridez P, Zulliger M, Bobard F, Montorzi G, Miyazaki H, Hayashi K, et al. Geometrical, functional, and histomorphometric adaptation of rat carotid artery in induced hypertension. *J Biomech*. 2003;36(5):671-80.
- Safar ME, London GM, Asmar R, Frohlich ED. Recent advances on large arteries in hypertension. *Hypertension*. 1998;32(1):156-61.
- Castro MM, Rizzi E, Figueiredo-Lopes L, Fernandes K, Bendhack LM, Pitol DL, et al. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis*. 2008;198(2):320-31.
- Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*. 2001;38(3 Pt 2):581-7.
- Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res*. 2006;69(3):614-24.
- Duprez DA. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in vascular remodeling and inflammation: a clinical review. *J Hypertens*. 2006;24(6):983-91.
- Levy AS, Chung JCC, Kroetsch JT, Rush JWE. Nitric oxide and coronary vascular endothelium adaptations in hypertension. *Vasc Health Risk Manag*. 2009;5:1075-87.
- Martinez-Maldonado M. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension*. 1991;17(5):707-19.
- Lerman LO, Chade AR. Atherosclerotic process, renovascular disease and outcomes from bench to bedside. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006;15(6):583-7.
- Textor SC. Renovascular hypertension update. *Curr Hypertens Rep*. 2006;8(6):521-7.
- Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res*. 2006;71(2):247-58.
- Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest*. 1996;98(11):2572-9.
- Lerman LO, Chade AR, Sica V, Napoli C. Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med*. 2005;146(3):160-73.
- Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*. 2002;90(3):251-62.
- Chow AK, Cena J, Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol*. 2007;152(2):189-205.
- Ceron CS, Castro MM, Rizzi E, Montenegro MF, Fontana V, Salgado MC, et al. Spirinolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and expression in a model of renovascular hypertension. *Br J Pharmacol*. 2010;160(1):77-87.
- Castro MM, Rizzi E, Prado CM, Rossi MA, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling. *Matrix Biol*. 2010;29(3):194-201.
- Schulz R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:211-42.
- Nagase H, Woessner Jr JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999;274(31):21491-4.
- Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med*. 2008;29(5):290-308.
- Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev*. 2007;87(4):1285-342.
- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92(8):827-39.
- Sluijter JP, Kleijn DP, Pasterkamp G. Vascular remodeling and protease inhibition: bench to bedside. *Cardiovasc Res*. 2006;69(3):595-603.
- Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2006;25(1):9-34.
- Mohammed FF, Smookler DS, Khokha R. Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(Suppl 2):ii43-7.
- Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res*. 1995;77(5):863-8.
- Spinale FG, Coker ML, Bond BR, Zellner JL. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovasc Res*. 2000;46(2):225-38.
- Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res*. 2001;89(3):201-10.
- Wilson EM, Spinale FG. Myocardial remodeling and matrix metalloproteinases in heart failure: turmoil within the interstitium. *Ann Med*. 2001;33(9):623-34.
- Kandasamy AD, Chow AK, Ali MA, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc Res*. 2010;85(3):413-23.
- Ahmed SH, Clark LL, Pennington WR, Webb CS, Bonnema DD, Leonardi AH, et al. Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. *Circulation*. 2006;113(17):2089-96.
- Yasmin, McEnery CM, Wallace S, Dakham Z, Pulsalkar P, Maki-Petaja K, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(2):372.

42. Bouvet C, Gilbert LA, Girardot D, De Blois D, Moreau P. Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition. *Hypertension*. 2005;45(3):432-7.
43. Flamant M, Placier S, Dubroca C, Esposito B, Lopes I, Chatziantoniou C, et al. Role of matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling. *Hypertension*. 2007;50(1):212-8.
44. Lehoux S, Lemarié CA, Esposito B, Lijnen HR, Tedgui A. Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. *Circulation*. 2004;109(8):1041-7.
45. Martínez ML, Castro MM, Rizzi E, Fernandes K, Demacq C, Bendhack LM, et al. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-2 activity and reverses vascular dysfunction in renovascular hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 2008;591(1-3):224-30.
46. Watts SW, Rondelli C, Thakali K, Li X, Uhal B, Pervaiz MH, et al. Morphological and biochemical characterization of remodeling in aorta and vena cava of DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(5):H2438-48.
47. Castro MM, Rizzi E, Rodrigues GJ, Ceron CS, Bendhack LM, Gerlach RF, et al. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. *Free Radic Biol Med*. 2009;46(9):1298-307.
48. Marçal DM, Rizzi E, Martins-Oliveira A, Ceron CS, Guimarães DA, Gerlach RF, et al. Comparative study on antioxidant effects and vascular matrix metalloproteinase-2 downregulation by dihydropyridines in renovascular hypertension. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2011;383(1):35-44. Epub 2010 Oct 31.
49. Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JR, Sawicki G, Schulz R. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation*. 2002;106(12):1543-9.
50. Fernandez-Patron C, Radoski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res*. 1999;85(10):906-11.
51. Fernandez-Patron C, Stewart KG, Zhang Y, Koivunen E, Radoski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. *Circ Res*. 2000;87(8):670-6.
52. Martínez A, Oh HR, Unsworth EJ, Bregonzio C, Saavedra JM, Stetler-Stevenson WG, et al. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. *Biochem J*. 2004;383(Pt. 3):413-8.
53. Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res*. 1998;12(2):12-26.
54. Golub LM, Ramamurthy NS, McNamara TF, Greenwald RA, Rifkin BR. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1991;2(3):297-321.
55. Peterson JT. Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery. *Heart Fail Rev*. 2004;9(1):63-79.
56. Garcia RA, Pantazatos DP, Gessner CR, Go KV, Woods VL Jr, Villarreal FJ. Molecular interactions between matrilysin and the matrix metalloproteinase inhibitor doxycycline investigated by deuterium exchange mass spectrometry. *Mol Pharmacol*. 2005;67(4):1128-36.
57. Novak MJ, Johns LP, Miller RC, Bradshaw MH. Adjunctive benefits of subantimicrobial dose doxycycline in the management of severe, generalized, chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2002;73(7):762-9.
58. Lee HM, Ciancio SG, Tüter G, Ryan ME, Komaroff E, Golub LM. Subantimicrobial dose doxycycline efficacy as a matrix metalloproteinase inhibitor in chronic periodontitis patients is enhanced when combined with a non-steroidal anti-inflammatory drug. *J Periodontol*. 2004;75(3):453-63.
59. Thompson RW, Baxter BT. MMP inhibition in abdominal aortic aneurysms. Rationale for a prospective randomized clinical trial. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;878:159-78.
60. Villarreal FJ, Griffin M, Omens J, Dillmann W, Nguyen J, Covell J. Early short-term treatment with doxycycline modulates postinfarction left ventricular remodeling. *Circulation*. 2003;108(12):1487-92.
61. Onoda T, Ono T, Dhar DK, Yamanoi A, Fujii T, Nagasue N. Doxycycline inhibits cell proliferation and invasive potential: combination therapy with cyclooxygenase-2 inhibitor in human colorectal cancer cells. *J Lab Clin Med*. 2004;143(4):207-16.
62. Tessone A, Feinberg MS, Barbash IM, Reich R, Holbova R, Richmann M, et al. Effect of matrix metalloproteinase inhibition by doxycycline on myocardial healing and remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2005;19(6):383-90.
63. Axisa B, Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, Jones L, Bell PR, et al. Prospective, randomized, double-blind trial investigating the effect of doxycycline on matrix metalloproteinase expression within atherosclerotic carotid plaques. *Stroke*. 2002;33(12):2858-64.
64. Liu J, Xiong W, Baca-Regen L, Nagase H, Baxter BT. Mechanism of inhibition of matrix metalloproteinase-2 expression by doxycycline in human aortic smooth muscle cells. *J Vasc Surg*. 2003;38(6):1376-83.
65. Prall AK, Longo GM, Mayhan WG, Waltke EA, Fleckten B, Thompson RW, et al. Doxycycline in patients with abdominal aortic aneurysms and in mice: comparison of serum levels and effect on aneurysm growth in mice. *J Vasc Surg*. 2002;35(5):923-9.
66. Guimarães DA, Rizzi E, Ceron CS, Martins-Oliveira A, Oliveira DM, Castro MM, et al. Doxycycline dose-dependently inhibits MMP-2 mediated vascular changes in 2K1C hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010. doi: 10.1111/j.1742-7843.2010.00656.x. [Epub ahead of print]