

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

Evandro Manoel Neto Neves

**Efeito protetor miocárdico da inibição de
metaloproteinases de matriz extracelular
durante embolia pulmonar aguda em cães**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Evandro Manoel Neto Neves

**Efeito protetor miocárdico da inibição de
metaloproteinases de matriz extracelular
durante embolia pulmonar aguda em cães**

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

RIBEIRÃO PRETO – SP

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha Catalográfica

Neto-Neves, Evandro Manoel

Efeito protetor miocárdico da inibição de metaloproteinases de matriz extracelular durante embolia pulmonar aguda em cães/ Evandro Manoel Neto Neves; orientador Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos. Ribeirão Preto, 2008

96 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

1. Embolia pulmonar aguda; 2. Ventrículo direito; 3. Metaloproteinases da matriz extracelular; 4. Troponina I cardíaca; 5. Zimografia

FOLHA DE APROVAÇÃO

Evandro Manoel Neto Neves

Efeito protetor miocárdico da inibição de metaloproteinases de matriz extracelular durante embolia pulmonar aguda em cães

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

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em: 04 de setembro de 2008

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Instituição: FMRP-USP

Assinatura:

Prof. Dr. Paulo Roberto Barbosa Évora

Instituição: FMRP-USP

Assinatura:

Prof(a). Dr(a). Patrícia Rieken Macedo Rocco

Instituição: UFRJ

Assinatura:

***Dedico este trabalho aos meus pais, Esmeraldo e Angélica,
ao meu irmão Eduardo e ao meu querido avô materno,
Manoel de Oliveira Neto, pela confiança, apoio e incentivo
para a busca do conhecimento.***

Meus sinceros agradecimentos,

Á Deus, pois me concedeu sabedoria, paciência, persistência, saúde para que eu pudesse realizar este trabalho.

A minha família por acreditar e incentivar a minha dedicação pelos estudos.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, por ter me acolhido em seu laboratório e acreditado no meu potencial, pela orientação dedicada não somente a este trabalho, mas também ao meu trajeto pela pós-graduação.

Aos membros da banca, Prof. Dr Paulo Évora e Prof(a). Dr(a) Patrícia Rocco por aceitarem o convite para participar da banca de defesa do meu mestrado contribuindo desta forma na minha formação.

Ao amigo Carlos, que foi um grande colaborador desse trabalho, mostrando realmente que é um “menino de ouro”.

A importante colaboradora Fabiane Sônego, que com grande boa vontade me ajudou na realização de parte deste trabalho.

Aos amigões que de alguma forma me ajudaram a vencer mais uma batalha: Aline, Maria Adrielle, Alisson, Stéfani, Vanessa, Valquíria, Juliano, David, Sabrina, Quintino, Alexandre Kanashiro, Frederico, Caroline e Jefferson.

Aos grandiosos amigos do Laboratório: Michele, Ellen, Carla, Marcelo Montenegro, Joice, Flávia, Vanessa, Vivian, Lisandra, Ana Carol, Ana Laura, Ingrid, Tatiane, Caroline Demaq, Marcelo Luizon, Marília, Vânia, Valéria Gomes, Valéria Sandrin e Juliana.

Aos professores deste Departamento pelos ensinamentos e contribuição com a minha formação acadêmica.

A Sônia, Fátima e Ramon pela paciência e ajuda na parte administrativa referente à pós-graduação, bem como pela amizade oferecida.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro durante o mestrado.

Por mais longa que seja a caminhada o mais importante é dar o primeiro passo.

“Vinícius de Moraes”

RESUMO

Efeito protetor miocárdico da inibição de metaloproteinases de matriz extracelular durante embolia pulmonar aguda em cães

Embolia pulmonar aguda (EPA) é uma importante causa de morbidade e mortalidade. Recentes estudos têm mostrado a importância da vasoconstrição pulmonar que ocorre após a EPA. Um grupo de enzimas zinco dependentes designadas metaloproteinases de matriz extracelular estão envolvidas na degradação de componentes da matrix extracelular e possivelmente participam da lesão miocárdica. Atualmente tem sido mostrado aumento na liberação de TnIc em pacientes com disfunção ventricular em decorrência de EPA. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a inibição das MMPs poderia resultar em efeitos benéficos na disfunção ventricular induzida pela EPA.

Os cães do grupo Sham (n=5) receberam apenas salina, EPA foi induzida por infusão de coágulos autólogos injetados dentro do ventrículo direito no grupo Emb (n=10); os cães do grupo Doxy (n=5) receberam apenas infusão de doxiciclina (10mg/kg) por via intravenosa em 5 minutos; e os cães do grupo Doxy+Emb (n=10) receberam a mesma dose de doxiciclina antes da indução da EPA. Foram realizadas medidas da atividade das MMPs em amostras de plasma e de ventrículo direito. A migração de neutrófilos para o ventrículo direito foi avaliado pelo ensaio de atividade da mieloperoxidase (MPO) e a liberação de TnIc por imunoenensaio enzimático.

Nenhuma diferença significativa foi encontrada nos grupos Sham e Doxy. A indução da EPA aumentou a pressão média da artéria pulmonar (de 12 ± 1 para 31 ± 2 mmHg), o índice de resistência vascular pulmonar (de 142 ± 23 para 828 ± 120 dyn.s.cm), a atividade das MMPs (avaliada por gel de zimografia, espectrofluorimetria e zimografia in situ), a migração de neutrófilos e a liberação de troponina I no grupo Emb ($P < 0,05$). Entretanto, o pré-tratamento com doxiciclina preservou o índice cardíaco, reduziu a pressão média da artéria pulmonar para 26 ± 1 mmHg, o índice de resistência vascular pulmonar para 514 ± 41 dyn.s.cm, a atividade das MMPs, a migração de neutrófilos, bem como a liberação de troponina I (de 61% para 41%) 120 minutos após a indução da EPA no grupo Doxy+Emb ($P < 0,05$).

Esses resultados sugerem que a inibição das MMPs protegem o miocárdio contra aumentos na liberação de troponina I induzido pela EPA, possivelmente resultando em efeitos hemodinâmicos benéficos.

Palavras chaves: embolia pulmonar aguda; ventrículo direito; metaloproteinases da matriz; troponina I cardíaca; zimografia

ABSTRACT

Myocardial protective effects of extracellular matrix metalloproteinases inhibition during acute pulmonary embolism in dogs

Acute pulmonary embolism (APE) is an important cause of morbidity and death. Recent studies have addressed the relevance of pulmonary artery vasoconstriction in APE. A group of zinc-dependent endopeptidases called matrix metalloproteinases (MMPs) are involved in the degradation of components of extracellular matrix and may play a role in the myocardial injury. Recently, studies showed an elevation of troponins cTnI in patients with a ventricular dysfunction caused by APE. Thus, the aim of this study was evaluates whether MMPs inhibition could result in beneficial effects in ventricular dysfunction induced by APE.

Sham operated dogs (N=5) received only saline. APE was induced by autologous blood clots injected into the right atrium in the Emb group (N=10); Doxy group (N=5) received only doxycycline (10 mg/kg), intravenous infusion during 5 minutes; and Doxy+Emb group (N=10) received doxycycline before APE. Measurement of gelatinolytic matrix metalloproteinases activity in cardiac and plasma samples were performed. The extent of neutrophil accumulation in the heart was measured by assaying myeloperoxidase (MPO) activity and cTnI was measured by fluorimetric enzyme immunoassay.

No significant hemodynamic changes were found in Sham and Doxy groups. Embolization increased mean pulmonary arterial pressure (from 12 ± 1 to 31 ± 2 mmHg), the pulmonary vascular resistance index (from 142 ± 23 to 828 ± 120 dyn.s.cm), gelatinolytic matrix metalloproteinases activity, the neutrophil accumulation and serum cTnI in Emb group ($P < 0.05$). Doxycycline improved the cardiac index, reduced pulmonary vascular resistance index to 514 ± 41 dyn.s.cm, mean pulmonary arterial pressure to 26 ± 1 mmHg, gelatinolytic matrix metalloproteinases activity, the neutrophil accumulation and serum cTnI (by 61% and 43%), 120 min after APT in Doxy+Emb group ($P < 0.05$).

These results suggest that matrix metalloproteinases inhibition protects the myocardium against APE-induced increases in cTnI, possibly resulting in beneficial hemodynamic effect.

Keywords: acute pulmonary embolism; right ventricle; matrix metalloproteinases; cardiac troponin I; zymography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1: Fisiopatologia da disfunção ventricular direita após embolia pulmonar aguda.....	29
Figura 2: Ações da MMP-2 dentro dos cardiomiócitos	36
Figura 3: Ilustração do procedimento experimental	46
Figura 4: Ilustração do cateter de Swan-Ganz 7,5 F.....	48
Figura 5: Evolução do cateter de Swan-Ganz	50
Figura 6: Determinação do débito cardíaco	51
Figura 7: Pressão média da artéria pulmonar (PMAP).....	62
Figura 8: Índice de resistência vascular pulmonar (IRVP).....	63
Figura 9: Pressão arterial média (PAM)	64
Figura 10: Índice de resistência vascular sistêmica (IRVS).....	65
Figura 11: Índice cardíaco (IC).....	66
Figura 12: Frequência cardíaca (FC)	67
Figura 13: dP/dt máxima	68
Figura 14: dP/dt mínima	69
Figura 15: Zimografia da MMP-2 no plasma	70
Figura 16: Zimografia da MMP-9 no plasma	71
Figura 17: Gel de zimografia para MMP-2 e -9	72
Figura 18: Zimografia de MMP-2 e -9 em amostra de VD.....	72
Figura 19: Atividade da MMP-2 e -9 no VD.....	73
Figura 20: Fotografia de cortes de VD	74
Figura 21: Zimografia in situ para MMP-2 e -9 no VD	74
Figura 22: Ensaio da mieloperoxidase	75
Figura 23: Troponina I no soro	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância univariada

ASC: área de superfície corpórea

BL: Basal

CaCl₂: cloreto de cálcio

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

CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

DC: débito cardíaco

E30: 30 minutos após a embolia

E60: 60 minutos após a embolia

E120: 120 minutos após a embolia

ECG: eletrocardiograma

EDTA: ácido etilenodiamino tetracético

EP: embolia pulmonar

EPA: embolia pulmonar aguda

EPM: erro padrão da média

ET: endotelina

ET-1: endotelina 1

FC: frequência cardíaca

HAP: hipertensão arterial pulmonar

HTAB: brometo de hexadeciltrimetilamônio

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IC: índice cardíaco

IRVP: índice de resistência vascular pulmonar

IRVS: índice de resistência vascular sistêmico

IRVP: índice de resistência vascular pulmonar

MANOVA: anova de variância multivariada

MCL-1: miosina de cadeia leve 1

MMPs: metaloproteinases de matriz

MMP-1: metaloproteinase de matriz 1

MMP-2: metaloproteinase de matriz 2
MMP-8: metaloproteinase de matriz 8
MMP-9: metaloproteinase de matriz 9
MPO: mieloperoxidase
MT1-MMP: metaloproteinase de membrana tipo 1
NANC: Não adrenérgico não colinérgico
ONOO⁻: peróxido de nitrito
PAF: fator ativador de plaquetas
PAM: pressão arterial média
PaO₂: pressão parcial arterial do oxigênio
PAP: pressão arterial pulmonar
PcwP: pressão capilar pulmonar em cunha
PMAP: pressão média artéria pulmonar
Poap: pressão de oclusão da artéria pulmonar
Pró-MMP: forma latente das metaloproteinases de matriz
PSAP: pressão sistólica da artéria pulmonar
PVC: pressão venosa central
RVP: resistência vascular pulmonar
RVS: resistência vascular sistêmica
SDS: dodecil sulfato de sódio
SDS/PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com o uso de SDS
TIMPs: inibidores teciduais das MMPs
Tnlc: troponina I
TxA₂: tromboxano A₂
VD: ventrículo direito
VE: ventrículo esquerdo
Zn²⁺: zinco

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1.INTRODUÇÃO.....	17
1.1- Fisiologia da circulação pulmonar	18
1.2- Estatística e importância clínica da embolia pulmonar aguda (EPA).....	20
1.3- Hipertensão pulmonar induzida por EPA.....	22
1.4- Disfunção ventricular induzida por EPA.....	27
1.5- Troponina I como possível biomarcador para EPA	30
1.6- Metaloproteinases da matriz extracelular e EPA	31
1.7- Processo inflamatório durante a EPA.....	37
2. HIPÓTESE	38
3. OBJETIVOS	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1- Preparo e monitorização dos animais.....	43
4.2- Protocolo experimental	45
4.3- Cateter de Swan-Ganz	47
4.4- Determinação do débito cardíaco pelo método da termodiluição	51
4.5- Cálculo dos parâmetros hemodinâmicos.....	52
4.6- Zimografia para MMP-2 e MMP-9 das amostras de plasma.....	53
4.7- Zimografia para MMP-2 e MMP-9 das amostras de ventrículo direito	54
4.8- Ensaio de atividade gelatinolítica	55
4.9- Zimografia <i>in situ</i>	55
4.10- Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase no ventrículo direito	56

4.11- Dosagem da troponina I cardíaca.....	57
4.12- Análise estatística.....	58
5. RESULTADOS	60
5.1- Resultados hemodinâmicos.....	61
5.2- Resultados da atividade gelatinolítica das metaloproteinases 2 e 9.....	70
5.3-Resultado da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	75
5.4-Resultado da dosagem de troponina I.....	76
6. DISCUSSÃO.....	77
7. CONCLUSÕES.....	85
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fisiologia da circulação pulmonar

A circulação pulmonar caracteriza-se por ser, em condições normais, um circuito de baixa pressão, alta capacitância e baixa resistência ao fluxo sanguíneo (cerca de um décimo da sistêmica). O leito vascular pulmonar pode acomodar grandes volumes sanguíneos com pequenos aumentos na sua pressão arterial, fundamentalmente através do recrutamento de capilares e arteríolas. Por exemplo, durante esforço físico aumentado, observa-se um aumento de até 50% do fluxo, sem grandes aumentos na pressão arterial pulmonar (PAP). Esta propriedade de recrutamento vascular se dá pelo fato de algumas áreas pulmonares ventiladas não serem perfundidas (áreas ou zonas pulmonares tipo I de West) (West, 1977). Além disto, as artérias pulmonares e seus ramos apresentam constituição histológica que os torna mais complacentes do que as artérias sistêmicas. Esta diferença faz com que as artérias pulmonares e seus ramos se distendam mais intensamente do que as artérias sistêmicas quando submetidas a aumentos de pressão arterial (Reeves e Rubin, 1998).

Na camada íntima dos vasos pulmonares encontram-se células endoteliais que são capazes de regular o tônus vasomotor, a síntese de substâncias fibrinolíticas, além de regular a permeabilidade vascular (Elliot, 1992). O endotélio é responsável por diversos compostos vasoativos, alguns com função vasodilatadora como o óxido nítrico e as prostaciclina, outros com função vasoconstrictora como a endotelina, a angiotensina II e os endoperóxidos. Anormalidades na produção ou degradação destes mediadores responsáveis por complexos mecanismos reguladores da circulação pulmonar

podem resultar em aumento da resistência vascular pulmonar (RVP), gerando a hipertensão pulmonar (Riedel, 2001).

Quantitativamente, temos que, em indivíduos saudáveis e ao nível do mar, a pressão sistólica na artéria pulmonar (PSAP) é de 18 a 25 mmHg, a pressão média da artéria pulmonar (PMAP) de 12 a 16 mmHg (Elliot, 1992; Wood, 2002) e o gradiente transpulmonar normal é de 9 mmHg. Correspondendo a um valor normal de débito cardíaco, temos que a RVP é menor que $320 \text{ dynas.s.cm}^{-5}$ (Reeves e Rubin, 1998). Quando a pressão arterial pulmonar aumenta acima destes valores normais, temos hipertensão pulmonar, caracterizada por PMAP superior a 25 mmHg em repouso, ou 30 mmHg durante esforço, ou por valores de RVP superiores a $320 \text{ dynas.s.cm}^{-5}$, ou ainda quando o gradiente transpulmonar é superior a 10-12 mmHg (Wood, 2002).

O fluxo sanguíneo pelos pulmões é, essencialmente, igual ao débito cardíaco. Por conseguinte, os fatores que controlam o débito cardíaco, principalmente fatores periféricos, também controlam o fluxo sanguíneo pulmonar. Na maioria das condições, os vasos pulmonares atuam como tubos passivos e distensíveis, cujo calibre aumenta com a pressão crescente e diminui com a redução da pressão. Para que ocorra aeração adequada do sangue, é importante que este seja distribuído para os segmentos dos pulmões onde os alvéolos são mais oxigenados. Isso é realizado pelo seguinte mecanismo: quando a concentração de oxigênio nos alvéolos diminui abaixo da normal, particularmente quando cai para menos de 70% (pressão arterial de oxigênio - PaO_2 , abaixo de 73 mmHg), os vasos sanguíneos adjacentes aos alvéolos com baixas pressões de oxigênio se contraem no decorrer de 3 a 10 minutos. Isto

pode levar a aumentos da RVP podendo atingir valores até cinco vezes maiores do que os valores normais, quando em presença de níveis de oxigênio extremamente baixos (Voelkel e Tuder, 2000). Este aumento da RVP por conta da hipóxia é denominado vasoconstrição pulmonar hipóxica e, curiosamente, constitui-se num efeito oposto ao dos vasos sistêmicos que se dilatam em condições de hipóxia. Acredita-se que a baixa concentração de oxigênio determine a liberação de alguma substância vasoconstritora, ainda desconhecida, do tecido pulmonar. Esse efeito dos baixos níveis de oxigênio sobre a resistência vascular pulmonar desempenha importante função: distribuir o fluxo sanguíneo para áreas dos pulmões que estão melhores ventiladas, proporcionando assim, um sistema de controle da distribuição do fluxo sanguíneo para as áreas pulmonares em proporção ao nível de ventilação. (Dantzker, Wagner *et al.*, 1978)

1.2. Estatística e importância clínica da embolia pulmonar aguda

A inexistência de estatísticas nacionais faz com que tenhamos que nos reportar a números obtidos em outros países para que possamos dimensionar problemas de saúde no Brasil. A embolia pulmonar (EP) é um dos melhores exemplos da necessidade de investigação epidemiológica dentro do nosso contexto populacional. Apesar da investigação extensiva e nos avanços nas pesquisas, a embolia pulmonar continua ainda a ser sub-diagnosticada, apenas 30% dos casos de embolia pulmonar são diagnosticados antemortem (Morgenthaler e Ryu, 1995). O insucesso no diagnóstico é a maior ameaça para os pacientes que sofrem de EP, onde a taxa de mortalidade para

pacientes não-tratados é de 30% versus 2,5% para pacientes com EP tratados adequadamente (Carson, Kelley *et al.*, 1992; Smulders, 2000).

O tromboembolismo venoso, que inclui trombose de veias profundas e embolia pulmonar (EP), é uma das principais causas de morbidade e mortalidade. Nos Estados Unidos, estima-se que 2 milhões de pessoas desenvolvam trombose venosa profunda a cada ano, dessas, 600,000 progredem para embolia pulmonar, sendo fatal em 200,000 casos (Gross e Weitz, 2008). Trombos originários de veias profundas são os mais comuns na indução da tromboembolia pulmonar, causando uma intensa obstrução dos vasos pulmonares (Sadosty, Boie *et al.*, 2003), liberação de mediadores vasoconstritores (Layish e Tapson, 1997), gerando assim um aumento da resistência vascular pulmonar (RVP), o qual evolui para uma insuficiência cardíaca direita aguda e choque circulatório (Edlow, 2001). Porém, também existem outros tipos de êmbolos que podem migrar para os vasos pulmonares e induzir EP, como êmbolos de ar ou outros gases, êmbolos gordurosos e líquidos amniótico. Estes diferentes tipos de embolia guardam certo grau de semelhança fisiopatológica (Riedel, 2001; Tanus-Santos e Theodorakis, 2002; Wood, 2002).

A embolia pulmonar aguda (EPA) pode ser classificada em: maciça e não maciça. Os pacientes com manifestações de EPA maciça têm um prognóstico desfavorável associado com aumento do risco de morte prematura, onde temos um período crítico nas primeiras horas da instalação da EPA, que é quando ocorrem a maioria dos óbitos (taxa de mortalidade em torno de 70% na primeira hora). Observa-se instabilidade hemodinâmica com hipotensão sistêmica,

choque cardiogênico, dispnéia severa e insuficiência respiratória. Já os pacientes com EPA não maciça, não estão associados com instabilidade hemodinâmica nem com insuficiência respiratória, apresentando um risco de morte <5%. Entretanto a mortalidade em pacientes com EPA não maciça é significativamente maior (26%), se esses pacientes tiverem novos processos de embolização pulmonar (Almahameed e Carman, 2007).

O tratamento geralmente utilizado em quadros de EPA visa principalmente a remoção dos êmbolos que provocam obstrução mecânica do leito vascular pulmonar, isso inclui tratamento de suporte, agentes trombolíticos e anticoagulantes sistêmicos, bem como embolectomia cirúrgica (Sadosty, Boie *et al.*, 2003). Embora a obstrução mecânica seja a principal causa da EPA, tem sido sugerido que o bloqueio farmacológico da vasoconstrição arterial pulmonar secundária à EPA possa ser utilizada como terapia coadjuvante para o tratamento da EPA (Smulders, 2000; Tanus-Santos e Moreno, 2001; Dias-Junior, Vieira *et al.*, 2005).

Dentro desse contexto uma melhor compreensão dos acontecimentos que conduzem ao aumento da pressão arterial pulmonar (PAP) e da insuficiência cardíaca direita é necessária para o desenvolvimento de tratamentos adicionais visando reduzir ainda mais a mortalidade nesta desafiadora doença.

1.3. Hipertensão pulmonar induzida por EPA

Alguns mecanismos contribuem para o aumento da RVP, levando ao desenvolvimento da hipertensão arterial pulmonar (HAP) durante a EPA.

Dentre eles podemos destacar a obstrução física dos leitos vasculares pulmonares, a vasoconstrição arterial pulmonar gerada por reflexo neurogênico, a liberação de agentes vasoconstritores, bem como a vasoconstrição pulmonar hipóxica (Smulders, 2001).

No que se refere à obstrução mecânica, o tamanho do êmbolo é importante para determinar a magnitude da EP, porém a obstrução mecânica por si só não pode explicar todos os acontecimentos que ocorrem durante EPA. Estímulos neurais e humorais são importantes codeterminantes da gravidade dos distúrbios hemodinâmicos induzidos pela EPA. Apenas 25% a 30% dos vasos pulmonares devem ser obstruídos para que ocorra um aumento da PAP quando ocorre obstrução pulmonar por um trombo-êmbolo (Wood, 2002).

A vasoconstrição pulmonar neurogênica induzida por embolia pulmonar envolve a inervação parassimpática, não adrenérgicos e não colinérgicos (NANC) e nervos simpáticos eferentes. A EP induz o reflexo de Bezold-Jarisch (apnéia, bradicardia e hipotensão), que pode contribuir para algumas das mortes súbitas após a EP. O bloqueio do nervo vago bilateralmente completamente abole o reflexo de Bezold-Jarisch induzido pela serotonina (Comroe, Van Lingen *et al.*, 1953), mas falha em modular aumentos na PAP e na pressão do ventrículo direito, bem como não previne o colapso hemodinâmico depois de tromboembolismo experimental (Stratmann e Gregory, 2003). A vasoconstrição pulmonar neurogênica também ocorre por uma estimulação de nervos simpáticos eferentes, onde trabalhos mostram que a simpatectomia tanto em humanos como em modelos animais pode resultar em efeitos benéficos (Jahn, Waurick *et al.*, 2001).

A vasoconstrição pulmonar mediada por fatores humorais também participa da hipertensão pulmonar induzida por EPA, sendo que a modulação do leito vascular pulmonar é conferida por um equilíbrio entre agentes vasoconstritores e vasodilatadores. Uma vez que um trombo-embolo se aloja no leito vascular pulmonar, existe uma rápida e complexa interação de eventos moleculares e celulares que causam aumento na liberação de agentes vasoconstritores e pró-coagulantes, bem como diminuição dos agentes vasodilatadores e anticoagulantes aumentando assim a pressão da artéria pulmonar. Durante a EPA, existe uma liberação de vasoconstritores pulmonares por plaquetas, leucócitos e por células endoteliais e pulmonares como a serotonina, tromboxano A_2 , endotelina-1, fator de ativação das plaquetas, prostaglandina $F_{2\alpha}$, histamina, entre outros (Smulders, 2001; Wood, 2002).

A ativação e a agregação plaquetária são eventos chaves para a formação do trombo como também da vasoconstrição que ocorre em função da EPA. Uma vez ativada as plaquetas podem liberar diversas substâncias vasoativas, dentre essas temos a serotonina (5-hidroxitriptamina) que é um potente vasoconstritor do leito vascular pulmonar (Smith e Smith, 1955). Outras fontes de serotonina incluem células enterocromafins gastrintestinais, neurônios serotoninérgicos, células neuroendócrinas pulmonares, entre outros. Durante a EPA temos uma diminuição do tamanho funcional do leito vascular pulmonar, diminuindo assim a recaptação e a metabolização da serotonina, promovendo uma maior concentração desta nos vasos pulmonares (Thomas e Vane, 1967). A serotonina promove agregação plaquetária que diminui a lise

dos êmbolos nos pulmões, e também inibe a liberação de prostaciclina (vasodilatador) pelo endotélio pulmonar. Portanto essas ações da serotonina podem iniciar e propagar um ciclo vicioso de aumento da agregação plaquetária, diminuição da lise dos êmbolos e vasoconstrição do leito vascular pulmonar (Stratmann e Gregory, 2003).

Outro potente vasoconstritor pulmonar liberado pelas plaquetas é o tromboxano A_2 (Tx- A_2), que promove hipóxia e estimula a agregação plaquetária, contribuindo para mais liberação de serotonina pelas plaquetas (Stratmann e Gregory, 2003). O Tx- A_2 também pode ser produzido a partir do metabolismo do ácido araquidônico, de monócitos circulantes e por células endoteliais vasculares; porém essas fontes são quantitativamente menos importantes do que as plaquetas. O principal papel do Tx- A_2 é o aumento da agregação plaquetária e vasoconstrição pulmonar e sistêmica (Oates, Fitzgerald *et al.*, 1988), ambos efeitos visando a hemostasia. Vários estudos demonstram um aumento da produção de Tx- A_2 na EPA, especialmente nos estágios iniciais (primeiros 30 minutos) (Utsonomiya, Krausz *et al.*, 1982; Reeves, Demers *et al.*, 1983). Nesse sentido o grau de produção de Tx- A_2 tem sido correlacionado com o risco de mortalidade na EPA experimental em animais (Reeves, Demers *et al.*, 1983).

O fator de ativação derivado das plaquetas (PAF) tem vários papéis. Ele pode contrair os vasos pulmonares diretamente, promover edema pulmonar, ativar a liberação de outros vasoconstritores e promover remodelamento vascular (Deuel e Huang, 1984). Por outro lado pode inibir a ativação e a agregação plaquetária por meio de um “feedback-negativo” que envolve a

produção e liberação de prostaciclina (Bryckaert, Rendu *et al.*, 1986; Vassbotn, Havnen *et al.*, 1994).

Um outro importante fator humoral produzido pelo endotélio vascular que causa intensa e sustentada vasoconstrição pulmonar é a endotelina (ET). Há vários subtipos de endotelina, tais como a endotelina-1 (ET-1), conhecida por sua capacidade de causar hipertensão pulmonar (Maclean, 1999). Um estudo mostrou que o antagonismo do subtipo A do receptor de endotelina, reduziu de forma significativa aumentos na pressão arterial pulmonar (Schmeck, Koch *et al.*, 1998). Esse e outros estudos sugerem que a endotelina-1 pode induzir vasoconstrição pulmonar através da estimulação da produção de Tx-A₂ (Del Basso e Argiolas, 1995). A liberação de endotelina ou de seu precursor (big-endotelina) dos pulmões após EP, pode promover vasoconstrição coronariana que contribui para cardiodepressão (Dschietzig, Laule *et al.*, 1998).

A histamina é encontrada em vários tecidos do corpo, porém está presente em altas concentrações nos pulmões e na pele. Ela causa constrição dos vasos pulmonares, um efeito oposto ao observado na circulação sistêmica (Barnes e Liu, 1995).

Outro possível contribuidor para a vasoconstrição pulmonar tem sido chamado de vasoconstrição pulmonar hipóxica. Quando em hipóxia que pode ocorrer durante a EPA, os vasos sanguíneos pulmonares adjacentes aos alvéolos sob baixas pressões de oxigênio se contraem levando ao aumento da RVP (Voelkel e Tuder, 2000). Este aumento da RVP resultante das pressões parciais de oxigênio diminuídas é denominado vasoconstrição pulmonar hipóxica e, de modo interessante, é um efeito oposto ao observado sobre os

vasos sistêmicos durante a hipóxia, os quais se dilatam. Este mecanismo possibilita a redistribuição do fluxo sanguíneo para áreas dos pulmões que estão mais ventiladas, permitindo melhor oxigenação sanguínea a custo da elevação da pressão arterial pulmonar (Dantzker, Wagner *et al.*, 1978).

1.4. Disfunção Ventricular induzida por EPA

A principal função do ventrículo direito é a de manter as baixas pressões provenientes do átrio direito, otimizando o retorno venoso e proporcionando baixa pressão de perfusão através dos pulmões. Para alcançar esse objetivo o ventrículo direito ejeta sangue quase continuamente a partir do átrio direito para os pulmões. Isso é possível por causa das características favoráveis que o leito vascular pulmonar proporciona, como pressões e resistência vasculares baixas, e alta complacência. Inversamente o ventrículo esquerdo gera pressões mais elevadas e em breves períodos de contração e relaxamento, através de artérias de baixa complacência (Mebazaa, Karpati *et al.*, 2004).

Normalmente um aumento no débito do ventrículo direito é acomodado pelo recrutamento de vasos não perfundidos localizados na porção superior dos pulmões, e por dilatação dos vasos pulmonares de regiões mais utilizadas (parte inferior), (Schulman e Matthay, 1992). Em certas doenças como a EP, os vasos pulmonares não podem ser recrutados e estão contraídos; portanto, há um aumento da pressão arterial pulmonar e o ventrículo direito se dilata. Isso ocorre porque o ventrículo direito está acostumado a trabalhar contra baixas pressões da artéria pulmonar (aproximadamente 15 mmHg); não estando preparado para suportar aumentos rápidos e elevados na pós-carga decorrente

de elevações das pressões e resistência vascular pulmonar (Matthay, Arroliga *et al.*, 1992) observadas na EPA. Assim para compensar, o ventrículo direito se dilata para manter o volume sistólico; porém a fração de ejeção é reduzida, provocando um rápido aumento na pressão da artéria pulmonar (Matthay, Arroliga *et al.*, 1992).

A principal causa de morte na EPA é o desenvolvimento de insuficiência cardíaca direita aguda que direciona para choque cardio-circulatório (Tanus-Santos e Theodorakis, 2002). O grau de obstrução vascular pulmonar é um fator muito importante na determinação da resposta do ventrículo direito aos aumentos da pressão pulmonar durante a EPA. Tal como a obstrução aumenta, também existe um aumento da pressão arterial pulmonar (Uzuelli, Dias-Junior *et al.*, 2008). Além disso existe a liberação de mediadores vasoconstritores que aumentam a resistência vascular pulmonar, resultando em hipertensão pulmonar (Lualdi e Goldhaber, 1995).

O súbito aumento na pressão arterial pulmonar (PAP) reflete um aumento abrupto na pós-carga do ventrículo direito, com conseqüente elevação da tensão sobre a parede do ventrículo direito, seguido por dilatação e disfunção ventricular direita (Lualdi e Goldhaber, 1995). A disfunção ventricular direita contrátil aguda pode diminuir o débito do ventrículo direito, reduzindo assim a pré-carga do ventrículo esquerdo (Jardin, Dubourg *et al.*, 1987). A dilatação ventricular direita atribuída ao aumento na PAP causa um deslocamento do septo interventricular em direção ao ventrículo esquerdo (interdependência ventricular). Nesse contexto, a diástole do ventrículo esquerdo é prejudicada pelo deslocamento interventricular que reduz a distensibilidade ventricular

esquerda e conseqüentemente atrapalha o enchimento do ventrículo esquerdo durante a diástole (Goldhaber e Elliott, 2003). Esse comprometimento do enchimento da câmara ventricular esquerda, diminui tanto o débito cardíaco como a pressão arterial sistêmica, bem como a perfusão coronariana, produzindo assim isquemia miocárdica (Brooks, Kirk *et al.*, 1971). A elevação na tensão da parede do ventrículo direito também aumenta a demanda de oxigênio pelo miocárdio, comprime a artéria coronariana direita, diminui a perfusão subendocárdica e limita a oferta de oxigênio para o miocárdio gerando isquemia que pode promover mais disfunção ventricular direita e choque cardiogênico (Goldhaber e Elliott, 2003). A perpetuação desse ciclo pode direcionar para enfarto do ventrículo direito, colapso circulatório e morte (Lualdi e Goldhaber, 1995), conforme ilustrado na figura 1.

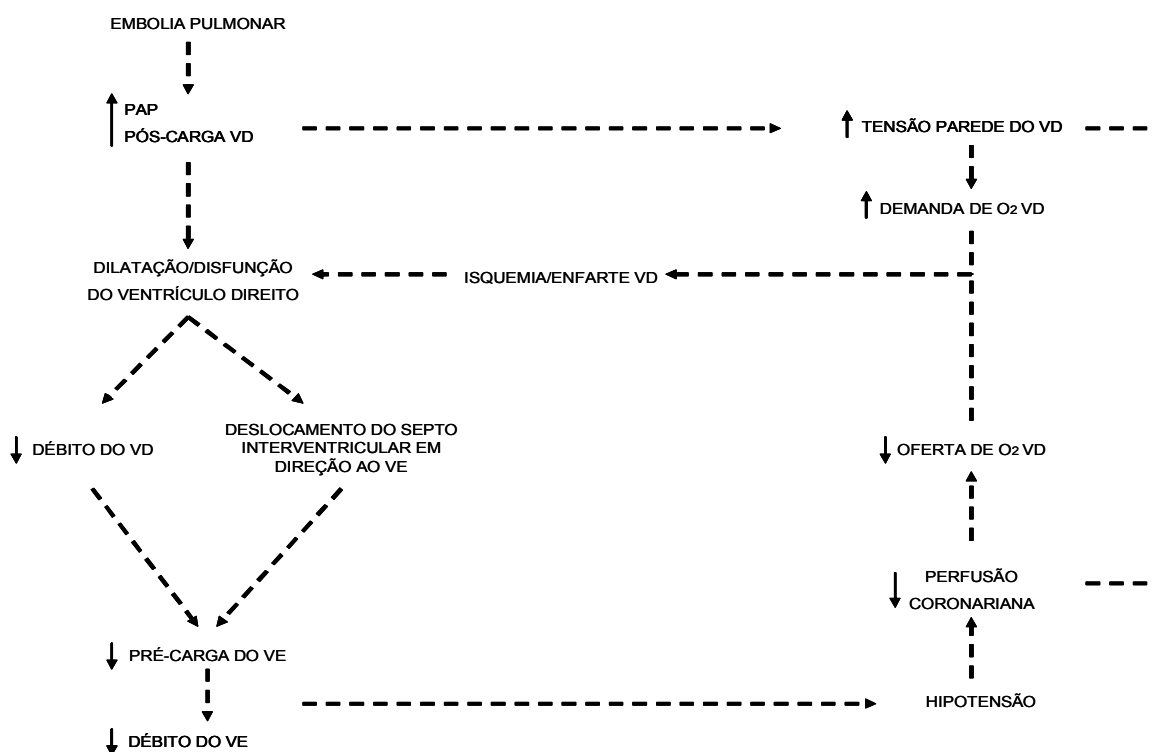


Figura 1: Fisiopatologia da disfunção ventricular direita após embolia pulmonar aguda. PAP, pressão arterial pulmonar; VD, ventrículo direito; VE, ventrículo esquerdo; O₂, oxigênio. Adaptado de Lualdi & Goldhaber, 1995.

1.5. Troponina I como possível biomarcador para EPA

Vários estudos têm demonstrado que a mensuração das troponinas cardíacas é utilizada com o intuito de avaliar o risco de pacientes com angina pectoris, síndrome coronariana aguda, embolia pulmonar e infarto do miocárdio (Meyer, Binder *et al.*, 2000; Douketis, Crowther *et al.*, 2002; Konstantinides, Geibel *et al.*, 2002). As troponinas I e T funcionam juntas como subunidades de um complexo de troponina associado com o filamento fino de actina dentro das células do músculo estriado e são liberadas na corrente sanguínea como resultado de necrose miocárdica (Meyer, Binder *et al.*, 2000). A troponina I cardíaca (TnIc) é exclusivamente de origem cardíaca, não sendo encontrada no tecido muscular esquelético, isso mostra ser específica para a detecção de lesão miocárdica (Mehta, Jani *et al.*, 2003), não sendo influenciada por lesões agudas do músculo esquelético (Douketis, Crowther *et al.*, 2002).

As troponinas cardíacas têm surgido como promissores biomarcadores para a estratificação do risco de pacientes com EPA. Os níveis de TnIc podem ser usados para distinguir os pacientes de baixo, médio e alto risco; sendo portanto, um valioso parâmetro para triagem de pacientes com embolia pulmonar (Konstantinides, Geibel *et al.*, 2002). Aumentos nos níveis de troponina em associação com disfunção ventricular direita diagnosticada por ecocardiografia, podem ajudar na identificação de pacientes hemodinamicamente estáveis, porém com alto risco de morte (Kucher e Goldhaber, 2003). Mais de 50% dos pacientes com EPA tem aumento nas concentrações de troponina I cardíaca nas amostras de soro. Nesse sentido, o aumento na concentração de troponina I cardíaca apresenta-se como um confiável marcador de disfunção ventricular direita

associada com um prognóstico desfavorável e aumento no risco de morte (Uzuelli, Dias-Junior *et al.*, 2008).

A obstrução embólica e a vasoconstrição das artérias pulmonares em consequência à EPA, leva ao aumento das pressões do ventrículo direito e da artéria pulmonar. Em resposta ao rápido aumento da pós-carga o ventrículo direito se dilata, ocorrendo aumentos na demanda de oxigênio e diminuição da perfusão da artéria coronária direita. Isso gera isquemia e lesão miocárdica que é seguida da liberação de troponinas cardíacas (Goldhaber, 2003).

A disfunção ventricular direita tem sido reconhecida como um fator determinante no prognóstico da embolia pulmonar (Konstantinides, Geibel *et al.*, 2002). A validade da ecocardiografia para a detecção da disfunção ventricular direita a curto e longo prazo já é bem estabelecida (Goldhaber, 2003). No entanto, a ecocardiografia tem algumas limitações técnicas, não podendo ser utilizada para a avaliação quantitativa da gravidade da disfunção do ventrículo direito, é pouco disponível e pode ter um incômodo pela dificuldade de captar a imagem do ventrículo direito. Em contraste os ensaios para troponina são baratos, rápidos e bem padronizados (Goldhaber, 2003). Nesse contexto os ensaios de troponina cardíaca podem ser utilizados em conjunto com parâmetros clínicos e ecocardiográficos de disfunção ventricular, para orientar o tratamento de pacientes com EP, e sobre tudo melhorar o prognóstico de pacientes de alto risco.

1.6. Metaloproteinases da matriz extracelular e EPA

As metaloproteinases de matrix (MMPs) são enzimas que degradam proteínas da matrix extracelular, compostas por uma família de

aproximadamente 28 enzimas divididas em grupos incluindo as colagenases, estromelinas, matrilisinas, MMPs de membrana e as gelatinases. Algumas MMPs foram sub-classificadas de acordo com as proteínas da matriz extracelular que elas degradam, no entanto elas também desempenham outras funções importantes, participando de processos fisiológicos, incluindo a embriogênese (Vu e Werb, 2000), angiogênese (Roy, Zhang *et al.*, 2006), involução uterina e reabsorção óssea (Rouet-Benzineb, Buhler *et al.*, 1999); mas também participam de processos patológicos como metástases tumorais (Deryugina e Quigley, 2006), inflamação e artrite (Mohammed, Smookler *et al.*, 2003). Desta diversificada família de enzimas, as MMP-2 e MMP-9 também denominadas de gelatinases A e B respectivamente, estão importantemente envolvidas em diversas doenças do aparelho cardiovascular; incluindo aterosclerose, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, embolia pulmonar e aneurisma (Dollery, Mcewan *et al.*, 1995; Spinale, Coker *et al.*, 2000; Creemers, Cleutjens *et al.*, 2001; Spinale, 2002; Fatar, Stroick *et al.*, 2005; Souza-Costa, Zerbini, Palei *et al.*, 2005; Thompson e Cockerill, 2006; Fortuna, G.M., Figueiredo-Lopes, L. *et al.*, 2007). Embora as MMPs sejam mais conhecidas por suas ações no remodelamento da matrix extracelular, recentes estudos tem demonstrado que em particular as MMPs-2 e -9, também desempenham importantes papéis intracelulares (Chow, Cena *et al.*, 2007; Schulz, 2007).

No coração as MMPs são encontradas predominantemente na forma enzimática inativa (pró-MMPs) e associadas a seus inibidores endógenos (TIMPs) (Tyagi, Matsubara *et al.*, 1993). A MMP-2 é expressa em todas as células que compõem o coração, sendo encontrada nos cardiomiócitos normais,

bem como no endotélio, nas células da musculatura lisa vascular e nos fibroblastos (Coker, Doscher *et al.*, 1999; Wang, Schulze *et al.*, 2002). Já a MMP-9 é uma enzima cuja expressão é induzida por ativação imune, ou seja, em resposta a citocinas pró-inflamatórias; e está relacionada com a ativação de leucócitos e macrófagos (Heymans, Lutun *et al.*, 1999; Schulz, 2007).

As MMPs são inicialmente expressas como enzimas latentes (pró-MMPs), podendo ser ativadas por clivagem proteolítica no meio extracelular passando para uma forma enzimaticamente ativa (O'connor e Fitzgerald, 1994; Cao, Sato *et al.*, 1995). Esse tipo de ativação pode ser feito por MMPs tipo membrana (MT1-MMP), como por outras proteases, onde ocorre uma remoção proteolítica da região do pró-peptídeo inibitório, expondo o sítio catalítico do zinco (Zn^{2+}), tornando a enzima ativa (Birkedal-Hansen, 1995). Acredita-se que esse mecanismo de ativação ocorra para todas as MMPs. Porém espécies reativas de oxigênio e nitrogênio também estão envolvidas na ativação de algumas MMPs numa via que não necessariamente envolve a remoção proteolítica do pró-peptídeo inibitório. Esse processo ocorre por mudanças conformacionais no domínio do pró-peptídeo inibitório, permitindo o acesso do substrato ao sítio catalítico do Zn^{2+} . Esse processo de modulação da atividade das MMPs por estresse oxidativo tem sido descrito para as MMPs-1, -2, -8 e -9 (Okamoto, Akaike *et al.*, 2001)

As mudanças conformacionais no domínio do pró-peptídeo inibitório durante o processo de ativação das MMPs por estresse oxidativo, envolve o grupamento sulfidril presente nos resíduos de cisteína que interagem com o sítio catalítico do zinco que são altamente sensíveis a mudanças no ambiente

redox, sendo susceptíveis de serem submetidos a vários estados de oxidação dependendo do tipo do desafio oxidativo (Schulz, 2007). Isso pode resultar numa variedade de mudanças que incluem não apenas a indução da atividade da enzima, mas também modulação da atividade da enzima, e até mesmo inativação por elevados aumentos do estresse oxidativo (Chow, Cena *et al.*, 2007). Logo baixas concentrações (1-10 μM) de peróxido de nitrito (ONOO^-) resulta em aumento da atividade proteolítica das MMPs (Okamoto, Akaike *et al.*, 2001), em contraste, altas concentrações de ONOO^- têm sido mostrado inativar as MMPs possivelmente por nitração de resíduos de tirosina (Rajagopalan, Meng *et al.*, 1996; Owens, Milligan *et al.*, 1997).

As MMPs têm sua atividade modulada tanto pelos TIMPs como por drogas sintéticas que atuam primariamente pela habilidade de quelar Zn^{2+} , as quais tem sido utilizadas como ferramenta experimental para o estudo das MMPs. Os inibidores das MMPs tem sido utilizados em estudos para a descoberta de drogas antiinflamatórias, anticancerígenas e também para o tratamento de doenças cardiovasculares (Peterson, 2006). Os antibióticos da classe das tetraciclina são de interesse especial pelo fato de terem a capacidade de inibir a atividade das MMPs, propriedade esta distinta de sua ação antibacteriana (Schulz, 2007). Essa classe de drogas inibe a atividade das MMPs pelo fato de serem queladores de cátions divalentes, e preferencialmente quelam o Zn^{2+} que é imprescindível para a atividade das MMPs (inibição de forma não seletiva). Dentre essa classe de drogas, a doxiciclina é o mais potente inibidor de MMPs e já é utilizada clinicamente

como inibidor de MMPs para o tratamento da periodontite em dose subantibiótica (Golub, Lee *et al.*, 1998).

Recentemente, tem sido demonstrado que as MMPs, especialmente as MMPs-2 e -9 não promovem apenas a degradação da matriz extracelular, mas também desempenham outras ações intracelulares. Nesse contexto, as MMPs degradam proteínas contráteis presentes nos miofilamentos finos, que inclui a Tnlc e a miosina de cadeia leve 1 (MCL-1) gerando assim disfunção cardíaca, ilustrado na figura 2 (Rouet-Benzineb, Buhler *et al.*, 1999; Chow, Cena *et al.*, 2007; Schulz, 2007). Condições patológicas em que ocorre um aumento na produção de radicais livres, especialmente o peróxido de nitrito, favorecem a ativação das MMPs (2 e 9) dentro dos cardiomiócitos levando a uma perda da função cardíaca, que é revertida com o uso de inibidores das MMPs (Chow, Cena *et al.*, 2007). Num estudo in vivo no qual corações de ratos foram submetidos a uma lesão de isquemia e reperfusão, a inibição das MMPs diminuiu a degradação de troponina I e ainda recuperou a função cardíaca (Schulz, 2007).

Recentes estudos têm mostrado que as MMPs em particular as MMPs 2 e 9, estão envolvidas na hipertensão pulmonar aguda associada a EPA (Palei, A. C., Zaneti, R. A. *et al.*, 2005; Souza-Costa, Zerbini, Palei *et al.*, 2005; Fortuna, G. M., Figueiredo-Lopes, L. *et al.*, 2007; Souza-Costa, Figueiredo-Lopes *et al.*, 2007). De fato, estes estudos sugerem que as MMPs possam modular a atividade de alguns peptídeos vasoativos envolvidos na hipertensão pulmonar. Já é conhecido que a MMP-2 cliva a big endotelina-1 (vasoconstritor) à endotelina-1-32, que tem ação vasoconstritora similar à da endotelina-1 (Fernandez-Patron, Radomski *et al.*, 1999). A ativação das MMPs durante a

EPA também pode causar degradação de mediadores vasodilatadores, como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) que promove efeitos vasodilatadores, abolindo dessa forma esse efeito (Fernandez-Patron, Stewart *et al.*, 2000). A MMP-2 também modula as ações da adrenomedulina que é um peptídeo vasodilatador, resultando na geração de produtos vasoconstritores e vasodilatadores (Martinez, Oh *et al.*, 2004). Através dessa ação proteolítica sobre alguns peptídeos vasoativos é possível que as MMPs tenham efeitos sobre o controle do tônus vascular pulmonar, podendo dessa forma contribuir para o agravamento da hipertensão pulmonar.

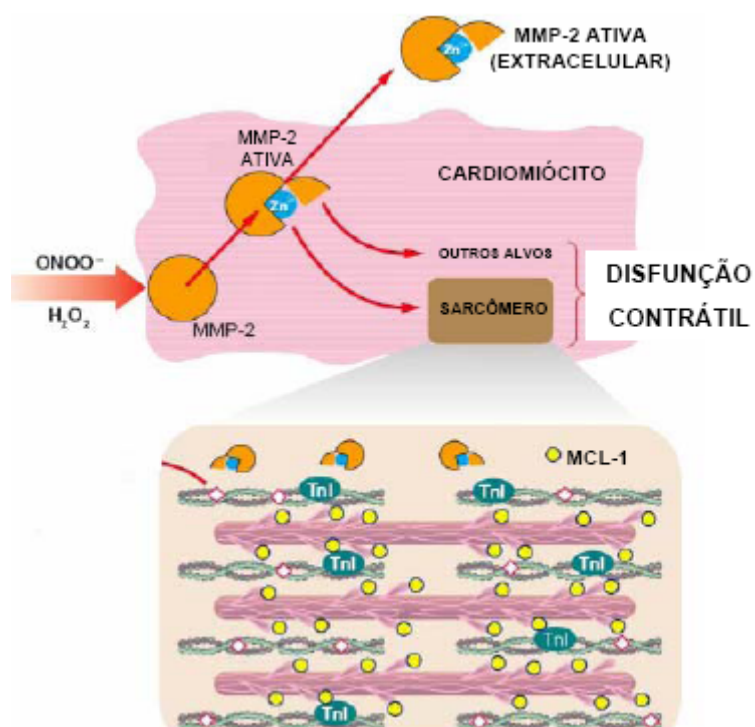


FIGURA 2: Ilustração das ações da MMP-2 dentro dos cardiomiócitos. A ativação da MMP-2 por radicais livres pode resultar na degradação de proteínas cardíacas contráteis como a TnIc e a MCL-1. TnIc, troponina I cardíaca; MCL-1, miosina de cadeia leve 1; ONOO^- , peróxido de nitrito; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio. Adaptado de (Schulz, 2007).

1.7. Processo inflamatório durante a EPA

A inflamação cardíaca contribui para lesão miocárdica durante o processo de isquemia e reperfusão do ventrículo esquerdo (Vinten-Johansen, 2004), porém a contribuição da inflamação na disfunção do ventrículo direito induzida por embolia pulmonar ainda não é bem esclarecida. Em pacientes que faleceram em decorrência de EPA, foi demonstrado que houve um acúmulo de células inflamatórias no miocárdio do ventrículo direito (Iwadate, Doi *et al.*, 2003). Ainda não é bem elucidado se a isquemia e o aumento da tensão na parede do ventrículo direito em decorrência da EPA, favoreça a expressão de quimiocinas e conduza a uma lesão de ordem inflamatória do ventrículo direito. Um estudo demonstrou uma melhora nos parâmetros hemodinâmicos e na sobrevivência de ratos submetidos experimentalmente a EP tratados com antiinflamatórios (Jones, Watts *et al.*, 2003). Outro importante estudo em um modelo de EP em ratos mostrou que o bloqueio da migração de neutrófilos reduziu a inflamação cardíaca, melhorou a função contrátil do miocárdio e mostrou tendência na redução da liberação da troponina I cardíaca. Isso sugere fortemente que a resposta inflamatória excessiva resulta de uma infiltração de neutrófilos para o miocárdio e contribua para a disfunção do ventrículo direito induzida por EPA (Watts, Zagorski *et al.*, 2006). Acredita-se que esta resposta inflamatória se restrinja apenas ao ventrículo direito, pois nenhuma alteração no ventrículo esquerdo foi encontrada (Iwadate, Doi *et al.*, 2003; Watts, Zagorski *et al.*, 2006).

2. HIPÓTESE

Neste trabalho, pretendemos testar a hipótese de que a inibição de MMPs com doxiciclina possa proteger contra a lesão e disfunção ventricular direita observadas após a EPA.

3. OBJETIVOS

3.1. Avaliar os efeitos hemodinâmicos associados à inibição de MMPs previamente à indução da EPA;

3.2. Avaliar alterações nas atividades das enzimas MMP-2 e MMP-9 no ventrículo direito de cães submetidos à EPA;

3.3. Examinar se a inibição de MMPs atenua os aumentos das concentrações circulantes de troponina I, bem como as alterações nas atividades de MMP-2, MMP-9 e mieloperoxidase (indicador de migração de neutrófilos) no ventrículo direito após EPA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Preparo e monitorização dos animais

Os protocolos e procedimentos cirúrgicos empregados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CETEA-FMRP).

Trinta cães mestiços de ambos os sexos (peso médio \pm desvio padrão = $13,5 \pm 2,5$ kg) foram obtidos do Biotério Central – Campus da USP de Ribeirão Preto os quais foram anestesiados com cetamina (25 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intramuscular. A manutenção da anestesia foi feita com injeções intramusculares repetidas a cada hora de cetamina (10 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg). Após ser realizada a indução da anestesia foi iniciada a tricotomia na face medial dos membros pélvicos, para permitir melhor higienização e acesso das veias e artérias femorais. A seguir, a veia femoral foi dissecada e canulada para ser utilizada como via de administração de drogas. Os animais foram ventilados mecanicamente com um ventilador (Ventilador EFRA ROAD C.F., Palmer SWZ Ltda., London, UK), utilizando-se ar ambiente e volume corrente de 15 ml/kg, para isso foram entubados utilizando um traqueotubo de balonete inflável. Para que a ventilação mecânica fosse realizada de forma passiva a fim de se evitar competições respiratórias, foi administrado um bloqueador neuromuscular (brometo de pancurônio - 0,1 mg/kg dose inicial e 0,05 mg/kg dose de manutenção) por via intravenosa (veia femoral esquerda). A frequência respiratória foi ajustada de modo a se obter níveis fisiológicos de pressão parcial de gás carbônico no sangue arterial (PaCO_2) entre 30 e 40 milímetros de mercúrio (mmHg), verificados através da análise gasométrica.

Para a monitorização hemodinâmica, foi introduzido um cateter na artéria femoral esquerda, cuja extremidade ficou posicionada na artéria aorta, visando-se obter medida direta da pressão arterial média (PAM). A veia femoral direita foi dissecada e isolada para a introdução do cateter de Swan-Ganz 7,5-F (Edwards Lifesciences, USA), cuja extremidade distal ficou posicionada num dos ramos da artéria pulmonar, objetivando-se medir os seguintes parâmetros hemodinâmicos: pressão média da artéria pulmonar (PMAP) e pressão de oclusão da artéria pulmonar (Poap) (figura 5). O lúmen proximal do cateter posicionado na veia cava caudal foi utilizado para medir a pressão venosa central (PVC). Com a ajuda do termistor presente no cateter de Swan-Ganz 7,5-F foi possível avaliar o débito cardíaco (DC) em triplicata pelo método da termodiluição (figura 6). A frequência cardíaca (FC) foi avaliada por ECG de superfície (derivação DII). A velocidade máxima de elevação da pressão ventricular direita durante a sístole (dP/dt max, mmHg/s) e a velocidade máxima de diminuição da pressão ventricular direita durante a diástole (dP/dt min, mmHg/s) foram medidas. A dP/dt max e a dP/dt min foram utilizadas como índice de função sistólica e diastólica do ventrículo direito respectivamente, sendo mensuradas a partir de um cateter posicionado no interior da câmara do ventrículo direito. Todos os cateteres de pressão foram acoplados aos transdutores de pressão do monitor hemodinâmico (Dixtal modelo DX2010, Dixtal do Brasil, Manaus, Brasil).

4.2. Protocolo Experimental

Antes do início do experimento propriamente dito, foram coletados 5 mL/kg de sangue venoso do animal com agulha e seringa estéreis. Este sangue foi acondicionado em placa de vidro por 1 hora para a formação de coágulos. Então, o coágulo foi cortado e passado através de uma peneira (tamis), de poros iguais a 3 mm. Assim, conseguimos coágulos de 2-3 mm de diâmetro. Tais coágulos foram misturados a 10 mL de salina 0,9%, 5 minutos antes da indução da embolia.

O estudo foi composto por 4 grupos experimentais:

- ❖ **Grupo Sham** (n=5): recebeu apenas a infusão de salina durante o período experimental;
- ❖ **Grupo Doxy** (n=5): recebeu pré-tratamento com doxiciclina (10 mg/kg) seguido de infusão de salina
- ❖ **Grupo Emb** (n=10): recebeu infusão de salina como pré-tratamento seguido de infusão de coágulos autólogos (5 mL/kg)
- ❖ **Grupo Doxy+Emb** (n=10): recebeu pré-tratamento com doxiciclina (10 mg/kg) seguido de infusão de coágulos autólogos (5 mL/kg)

Após anestesia, monitorização e estabilização hemodinâmica por 20 minutos, foi feita a avaliação hemodinâmica inicial (Basal) utilizando os parâmetros hemodinâmicos (descritos na seção 4.1). Depois de finalizada a avaliação hemodinâmica no momento basal os animais pertencentes aos grupos Doxy e Doxy+Emb receberam pré-tratamento com doxiciclina (10 mg/kg), e os animais pertencentes aos grupos Sham e Emb receberam apenas

infusão de salina como pré-tratamento. A embolia foi induzida por infusão dos coágulos autólogos por 5-10 minutos com o auxílio de uma seringa estéril conectada à cânula de calibre espesso inserida no átrio direito. Em seguida, foram feitas avaliações hemodinâmicas nos respectivos momentos: E30, E60 e E120; correspondentes a 30, 60 e 120 minutos após a infusão de salina no grupo Sham; ou infusão de salina seguida pela indução da embolia no grupo Emb; ou infusão de doxiciclina seguida de infusão de salina no grupo Doxy; ou infusão de doxiciclina antes da indução da embolia no grupo Doxy+Emb. A figura 3 ilustra o procedimento experimental descrito.

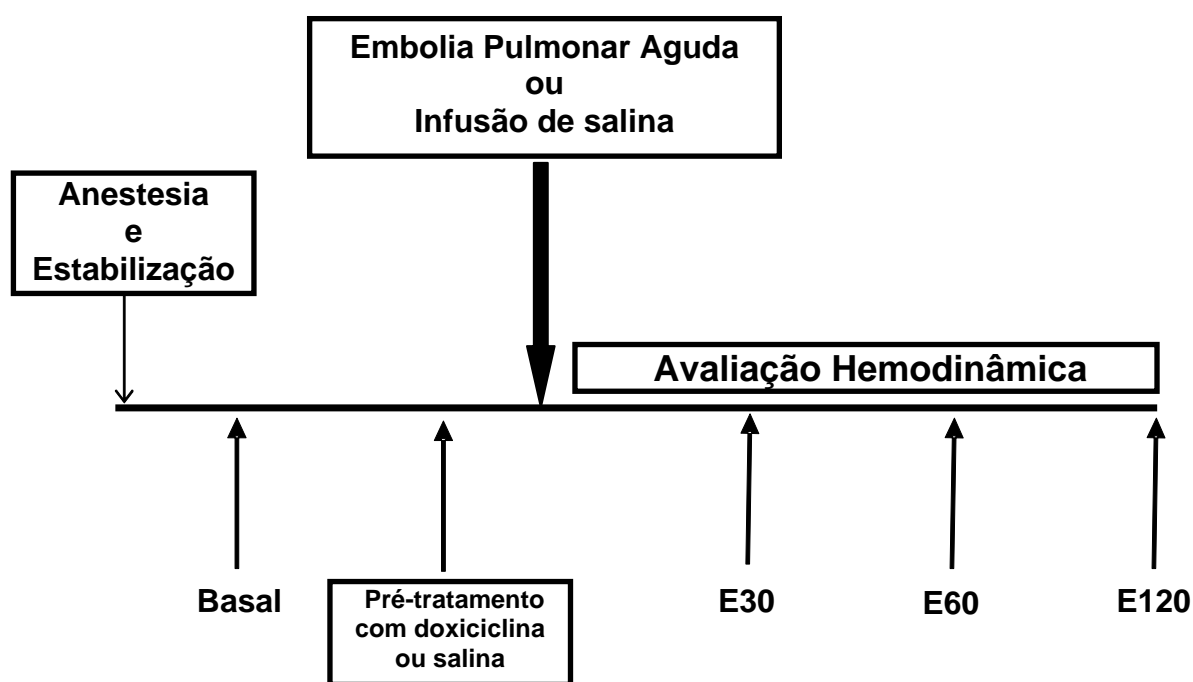


Figura 3: Ilustração do procedimento experimental.

Nos momentos Basal, E60 e E120 foram coletados 4 mL de sangue arterial adicionados a tubos contendo solução de EDTA (1 mg/mL de sangue)

para a separação do plasma por centrifugação (1000g por 10 minutos) e armazenamento a -70°C para posteriores análises bioquímicas. Também nos momentos Basal e E120 foram coletados mais 5 mL de sangue e colocados em tubo estéril para que, após a retração do coágulo, o mesmo fosse centrifugado (1000g por 10 minutos) para a separação do soro. A seguir, alíquotas de 1 mL foram acondicionadas a -70°C para posterior análise bioquímica.

Após a avaliação hemodinâmica final, os animais foram sacrificados por meio de injeção intravenosa de cloreto de potássio. Assim que os animais vieram a óbito foi realizada uma toracotomia, pela qual o coração foi rapidamente acessado para a retirada de amostras de tecido do ventrículo direito, que foram rapidamente congeladas e estocadas a -70 °C e posteriormente utilizadas para as análises bioquímicas que serão melhores descritas nas seções 4.7 a 4.10.

4.3. Cateter de Swan-Ganz

O cateter de Swan-Ganz 7,5-F (figura 4) possui três lumens e um termistor incorporado, que se destina à medida do débito cardíaco por termodiluição. Por meio da extremidade distal é possível medir a pressão arterial pulmonar (lúmen distal) e a pressão de oclusão da artéria pulmonar (lúmen distal com o balão insuflado).

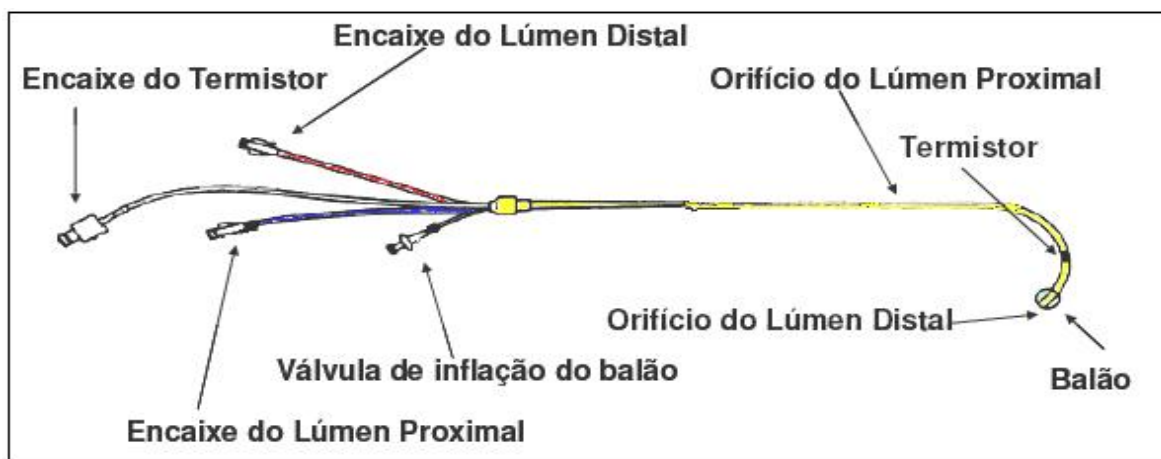


Figura 4: Ilustração do cateter de Swan-Ganz 7,5-F.

O cateter de Swan-Ganz 7,5-F foi introduzido pela veia femoral direita seguindo pela veia cava caudal, átrio direito, ventrículo direito até atingir a artéria pulmonar. A sua localização pelos vasos sanguíneos ou câmaras cardíacas por onde passou foi dada por registros de curvas de pressão características de cada um destes vasos ou câmaras. Assim, o cateter de Swan-Ganz 7,5-F atingiu o átrio direito, prosseguiu até o ventrículo direito, registrando as curvas de pressão típicas destas câmaras ao longo do ciclo cardíaco, que foram confirmadas insuflando-se o balão na extremidade do cateter (figura 5 A e 5 B).

Progrediu-se à circulação pulmonar, onde ocorre uma mudança no padrão de registro de curva, pois a pressão sistólica normal na artéria pulmonar pode variar de 15 a 20 mmHg, sendo esta a mesma pressão sistólica do ventrículo direito. Entretanto, a pressão diastólica ventricular direita é em torno de 0 a 2 mmHg enquanto que a da artéria pulmonar pode variar de 5 a 12 mmHg (ilustrado na figura 5 C). Estes registros de pressão constituem a primeira confirmação da canulação da artéria pulmonar.

A segunda confirmação desta canulação foi dada pela oclusão de um dos ramos da artéria pulmonar que mostrou um traçado de pressão semelhante ao da PVC, porém com identificação das ondas típicas das pressões retrógradas dos capilares pulmonares (Poap), apresentando valores discretamente maiores (8 a 10 mmHg – ilustrado na figura 5 D) em comparação aos valores típicos da PVC (entre 2 e 5 mmHg). A Poap é uma medida indireta da pressão atrial esquerda, sendo assim, um bom parâmetro para auxiliar na avaliação da pré-carga do ventrículo esquerdo. Depois deste procedimento, o volume insuflado no balão do cateter de Swan-Ganz 7,5-F foi liberado e obteve-se novamente o traçado da pressão da artéria pulmonar (figura 5 C). Por fim, confirmou-se o posicionamento do cateter na artéria pulmonar ao se insuflar novamente o balão do cateter e verificar o imediato registro típico da curva de pressão da artéria pulmonar ocluída (figura 5 D).

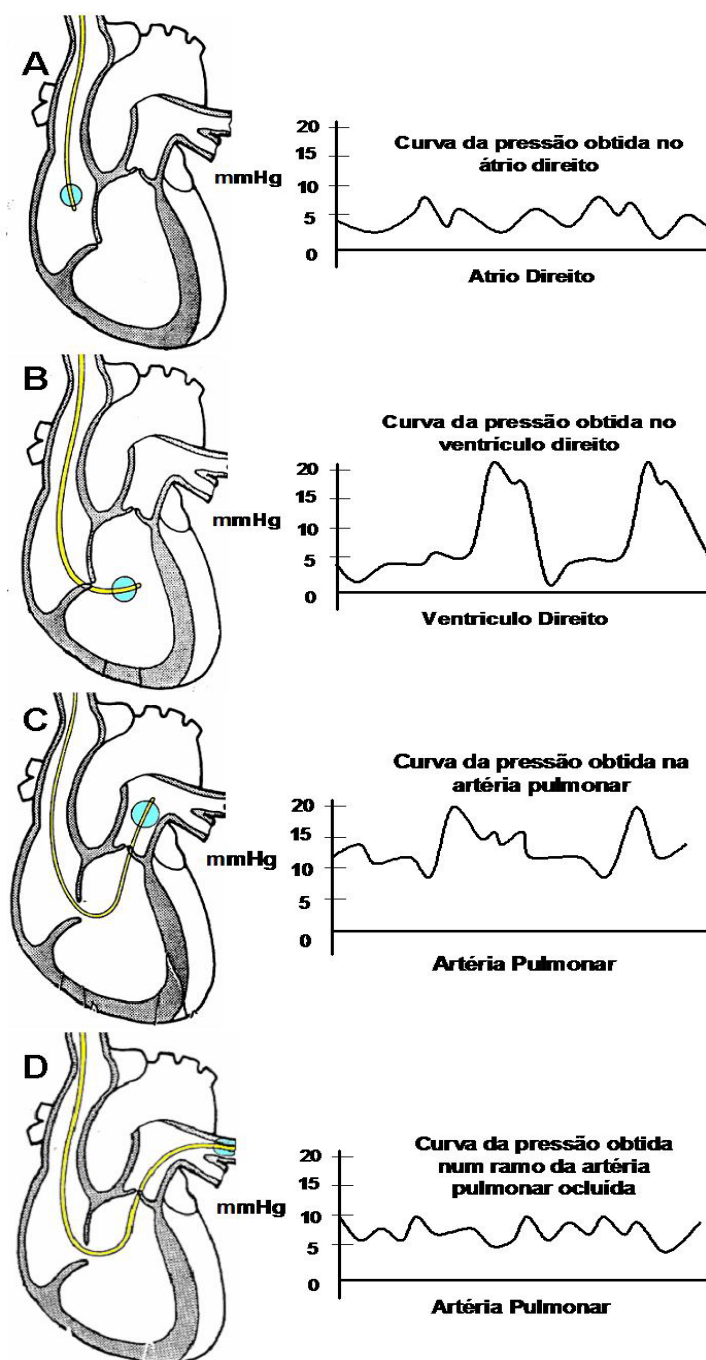


Figura 5: Evolução do cateter de Swan-Ganz ao longo da circulação venosa e registros das curvas de pressões características de cada vaso sanguíneo ou cavidade cardíaca, a saber: átrio direito (A), ventrículo direito (B), artéria pulmonar (C) e artéria pulmonar com um de seus ramos ocluído pelo balão insuflado (D).

4.4. Determinação do Débito Cardíaco pelo método da termodiluição

O método da termodiluição calcula o débito cardíaco (DC) a partir da variação de temperatura, dada pelo resfriamento do sangue circulante em consequência da injeção de salina gelada (3,0 mL, a aproximadamente 0 °C), e do tempo que decorre para que sejam novamente registradas temperaturas basais, em consequência da lavagem da solução gelada ao longo da circulação. As temperaturas são medidas por um termistor proximal incorporado ao cateter de Swan-Ganz.

A diferença de temperatura foi dada por um termistor posicionado em salina resfriada (aproximadamente 0 °C), enquanto outro termistor, encontrado na extremidade do cateter, registra a temperatura corporal do animal. Imediatamente após a injeção de salina resfriada, o tempo necessário para o retorno à temperatura fisiológica (38 °C em um cão saudável) é representado na forma de uma curva de variação da temperatura em função do tempo (ilustrado na figura 6).

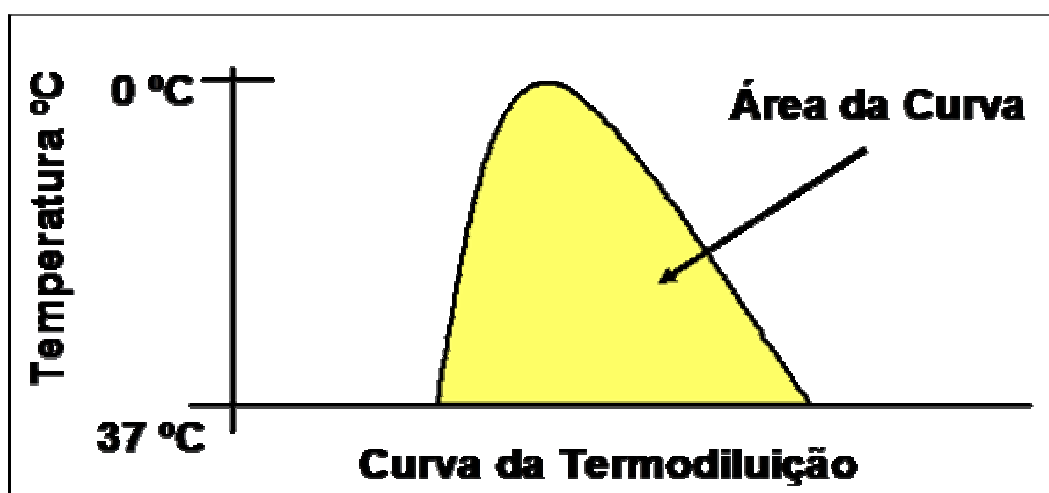


Figura 6: Desenho representativo da curva de variação da temperatura em função do tempo, destacando a área sob a curva.

A área sobre a curva é determinada pelo Monitor pré-programado que, usando uma fórmula convencional, calcula o volume de sangue bombeado pelo coração por minuto, sendo o débito cardíaco (DC) expresso em L/minuto.

4.5. Cálculo dos parâmetros hemodinâmicos

Os parâmetros hemodinâmicos calculados foram: Resistência Vascular Sistêmica (RVS), Índice de RVS (IRVS), Resistência Vascular Pulmonar (RVP), Índice de RVP (IRVP) e Índice Cardíaco (IC), através das seguintes fórmulas:

$$RVS = \frac{PAM - PVC \times 80}{DC}$$

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

$$RVP = \frac{PMAP - Poap \times 80}{DC}$$

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

Onde 80 é uma constante que converte mmHg/L/min em dina.s/cm⁵/m² e IC é o índice cardíaco, que foi calculado conforme a fórmula a seguir:

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

Onde ASC é a área de superfície corpórea e foi calculada segundo a fórmula abaixo (wood 2002b):

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

4.6. Zimografia para MMP-2 e MMP-9 das amostras de plasma

A atividade da MMP-2 e MMP-9 no plasma foi determinada pelo método da zimografia, que consiste em uma eletroforese das amostras em um sistema SDS/PAGE que inclui o substrato da enzima (gelatina) no gel de separação, de modo a permitir a evidenciação e quantificação da atividade da MMP-2 e MMP-9. Um microlitro de plasma foi utilizado para a visualização das bandas das MMPs no gel de eletroforese, diluídas em tampão de amostra não-redutor (solução aquosa de Tris/Cl pH 6,8 - 0,1 mol/L, 20% de glicerol, 1% de SDS e 0,001% de azul de bromofenol), na proporção 1:1. As amostras assim preparadas, bem como um padrão interno de soro fetal bovino (LGC BIO), foram separadas através de eletroforese em um sistema descontínuo de tampões, em géis de poliacrilamida preparados no laboratório a uma concentração de 7% e co-polimerizados com gelatina a 1% (SIGMA). Antes da aplicação no gel, as amostras e o padrão de soro fetal bovino foram submetidos por 15 minutos a um banho maria a 40°C.

Após a corrida de aproximadamente 5 horas, os géis foram submetidos a dois banhos de 30 minutos cada (temperatura ambiente) em solução de Triton X-100 2 % para renaturar as enzimas e, em seguida, incubados durante 16 horas em tampão Tris-HCl a 50 mM, pH 7,4, contendo CaCl₂ a 10 mM, à temperatura de 37°C. Após, os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue G-250* 0,05% por 3 horas, para logo em seguida serem descorados por 15, 30 e 60 minutos em metanol 30% e ácido acético 10% até a visualização das bandas características da atividade gelatinolítica das MMPs: bandas claras contra um fundo azul escuro.

A semi-quantificação da atividade das gelatinases foi realizada através de densitometria das bandas usando o sistema de foto documentação Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290 (Kodak, Rochester, NY). A pró-MMP-2 e a pró-MMP-9 foram identificadas como bandas de 67 KDa e 92 KDa, respectivamente.

4.7. Zimografia para MMP-2 e MMP-9 das amostras de ventrículo direito

Para avaliar a quantidade de MMPs -2 e -9 no ventrículo direito dos cães foi realizado ensaio de zimografia. Resumidamente, amostras de ventrículo direito foram pesadas, colocadas em tampão de extração (50 mmol/L de Tris-HCl, pH 7,4, mmol/L de 1,10-fenantrolina e 1 mmol/L PMSF, 1 mM NEM, e 10 mM CaCl_2 .) e trituradas. Após 16 horas de incubação as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi recolhido para dosagem de proteínas (método de Bradford). Os extratos de tecidos foram normalizados de acordo com a concentração de proteínas (40ug), depois as amostras foram submetidas à eletroforese em 12% SDS-PAGE co-polimerizado com gelatina (1%) como o substrato. Após eletroforese, os géis foram colocados em solução de Triton X-100 a 2% por 30 minutos à temperatura ambiente, por três vezes, e incubadas a 37 °C durante 16 horas em tampão Tris-HCl, pH 7,4, contendo 10 mmol/L CaCl_2 . Os géis foram fixados em 30% de metanol e 10% em ácido acético, coradas com 0,05% Coomassie Brilliant Blue G-250 e, em seguida, descorados com 30% de metanol e 10% de ácido acético. A atividade gelatinolítica foi detectada como as bandas não coradas contra o fundo azul de gelatina coradas com Coomassie azul, analisados por densitometria usando

um sistema de análise e documentação de eletroforese da Kodak (SADE) 290 (Kodak, Rochester, NY). A análise entre gel foi possível após a normalização da atividade gelatinolítica com um padrão interno (soro fetal bovino). As formas pró e ativa da MMP-2 foram identificadas como bandas em 72 e 67 kDa e as formas pró e ativa da MMP-9 como bandas em 92 e 87 kDa.

4.8. Ensaio de atividade gelatinolítica

A atividade gelatinolítica, realizada em ventrículos direito de cães, foi determinada usando o Kit EnzChek Gelatinase/Collagenase (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA). Inicialmente, foi analisada a quantidade de proteínas nas amostras pelo método de Bradford (Sigma). Sessenta microgramas de tecido previamente homogeneizado foi aplicado, em duplicatas, em cada poço de uma microplaca. Como substrato, utilizou-se DQ gelatin (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA) na concentração de 5 µg/mL, preparada em tampão Tris-CaCl₂ (Tris a 50 mM, CaCl₂ a 10 mM, ZnCl₂ a 1 µM). A atividade gelatinolítica foi determinada por um espectrofluorômetro ($\lambda_{\text{excitação}}$ 495, $\lambda_{\text{emissão}}$ 515 nm; Gemini EM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA), após 120 minutos de incubação à 37 °C. Fenantrolina 1 mM (inibidor de gelatinases) e fluoreto fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM (inibidor de serina proteases) foram utilizados para confirmar a atividade das MMPs no ventrículo direito.

4.9. Zimografia *in situ*

A atividade das MMPs, *in situ* (ventrículos direito), foi analisada utilizando como substrato DQ gelatin (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA) na

concentração de 20 µg/mL, preparada em tampão Tris-CaCl₂ (Tris a 50 mM, CaCl₂ a 10 mM, ZnCl₂ a 1 µM). Inicialmente, os tecidos foram congelados em OCT, cortados a 4-µm de espessura, e incubados com o substrato DQ gelatin por 60 minutos. Para isto, utilizou uma câmara úmida e escura. Após este período, os cortes foram lavados com PBS e fixados em paraformaldeído a 4%, por 10 minutos. Com auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica) acoplado a uma câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram registradas na objetiva de 40x. A atividade gelatinolítica, *in situ*, foi visualizada por uma cor verde brilhante. Para análise e quantificação da atividade, utilizou-se o programa ImageJ (NIH - Instituto Nacional de Saúde). Fenantrolina 1 mM (inibidor de gelatinases) e fluoreto fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM (inibidor de serina proteases) foram utilizados para confirmar a atividade das MMPs no ventrículo direito.

4.10. Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase no ventrículo direito

A quantificação do acúmulo de neutrófilos no coração (ventrículo direito) foi determinado pelo ensaio da atividade da mieloperoxidase de homogeneizados de ventrículo direito. Amostras de ventrículo direito (aproximadamente 1g) de cada animal foram colocadas em 2 mL de tampão (NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, NaEDTA 0,015 M) gelado, em pH 4,7 e estocados a -20°C. Para se realizar o ensaio, as amostras que estavam estocadas foram homogeneizadas em Pollytron e em seguida centrifugadas a 3.000 xg por 15 minutos a 4°C. Foi realizado um choque hipotônico no “pellet” das células com

10 ml de NaCl 0,2%. Depois de uma nova centrifugação a 3.000 xg por 15 minutos a 4 °C, o “pellet” foi ressuspensão em tampão NaPO₄ (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e novamente homogeneizado em Pollytron. A seguir o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 xg por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante das amostras de ventrículo direito diluído 3:50 em tampão fosfato 0,08 mM pH 5,4. O ensaio foi realizado em placa de ELISA com 96 poços, sendo que em cada poço foram adicionados 25 μ l de TMB (3, 3', 3, 3-tetrametilbenzidina; 1,6 mM) e 100 μ l de H₂O₂ (0,5 mM). O meio de reação foi incubado por 5 minutos à 37 °C, sob proteção da luz, seguido pela interrupção da reação pela adição de ácido sulfúrico 4 M. A quantificação dos neutrófilos foi feita a partir de uma curva padrão de neutrófilos (obtidos da cavidade peritoneal de camundongos, 6 horas após a administração de carragenina) diluídos seriadamente em NaPO₄ 0,08 M, 1 x 10⁵ neutrófilos/poço/50 μ l. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Spectra Max 250; Molecular Devices) no comprimento de onda de 450 nm. Resultados estão expressos como número de neutrófilos por mg de tecido.

4.11. Dosagem da troponina I cardíaca

A troponina I cardíaca foi dosada em amostras de soro através da técnica de imunoensaio enzimático (tipo sanduíche) quimioluminescente com dois sítios em que foi usado o Kit Immulite (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA).

A fase sólida, uma pérola de poliestireno encapsulada dentro da unidade teste IMMULITE é recoberta com anticorpo monoclonal específico a troponina I

de murino. Enquanto o soro do animal e a fosfatase alcalina conjugada a anticorpo policlonal específico a troponina I de cabra são incubados por 30 minutos a 37°C na unidade teste, com agitação intermitente, a troponina I da amostra é ligada de maneira a formar um complexo de anticorpos tipo "sanduíche". O conjugado não ligado é então removido pela lavagem por centrifugação, o substrato é adicionado e a unidade teste é incubada por mais 10 minutos. O substrato quimiluminescente usado na reação enzimática é um éster de adamantil fosfato dioxetano, o qual é submetido à hidrólise na presença da fosfatase alcalina gerando um intermediário instável. A produção contínua deste intermediário resulta na emissão de luz ininterrupta aumentando assim a precisão por prover uma janela para múltiplas leituras. O complexo ligado, assim como sua emissão de fótons são medidos pelo luminômetro, no analisador Immulite (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA), sendo proporcional à concentração de troponina I existente na amostra. A concentração mínima detectável pelo ensaio é de 0,35 ng de troponina I/mL.

4.12. Análise Estatística

Os resultados pertinentes às medidas hemodinâmicas bem como os resultados da troponina I e atividade das MMPs 2 e 9 em amostras de ventrículo direito foram apresentados como média e seus respectivos erro padrão da média (média \pm EPM). Os resultados relacionados à dosagem das MMPs 2 e 9 no plasma foram expressos como delta % e seus respectivos erro padrão da média.

A comparação intra-grupos experimentais ao longo do tempo foi feita por uma análise de variância para amostras repedidas (MANOVA), seguido pelo *post hoc test* de Dunnett. A comparação entre os grupos experimentais a cada momento experimental foi feita por uma análise de variância univariada (ANOVA), seguido pelo *post test* de Dunnett (# = $p < 0,05$ versus grupo Emb).

Foi considerado estatisticamente significativo o valor mínimo de probabilidade $< 0,05$ ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Resultados hemodinâmicos

Os dados hemodinâmicos referentes aos grupos Sham e Doxy se mantiveram constantes, não apresentando quaisquer mudanças significativas durante todo o experimento.

Os parâmetros hemodinâmicos basais, antes da indução da embolia pulmonar aguda (EPA), foram semelhantes em todos os grupos experimentais. A infusão de coágulos autólogos (5mL/kg) foi efetuada em um tempo máximo de dez minutos. Decorridos 30 minutos após este procedimento, foram verificados aumentos estatisticamente significativos em algumas variáveis hemodinâmicas nos grupos embolizados (Emb e Doxy+Emb).

A pressão média da artéria pulmonar (PMAP) aumentou em aproximadamente 160%, quando comparado o momento basal ao E30 (12 ± 1 para 31 ± 2 mmHg, $*P < 0,05$) no grupo Emb, que na ausência de pré-tratamento permaneceu elevada até o fim do experimento. No grupo Doxy+Emb, que foi pré-tratado com doxiciclina (inibidor não-seletivo das MMPs) a PMAP aumentou em cerca de 125% (13 ± 1 para 29 ± 1 mmHg, $*P < 0,05$) comparando o momento basal ao E30, onde no momento E60 apresentou uma tendência de queda, que não foi estatisticamente significativa. Entretanto no momento E120 houve uma redução da hipertensão pulmonar em aproximadamente 20%, se comparados os grupos Emb e Doxy+Emb (32 ± 2 para 26 ± 1 mmHg, $\#P < 0,05$), respectivamente (figura 7).

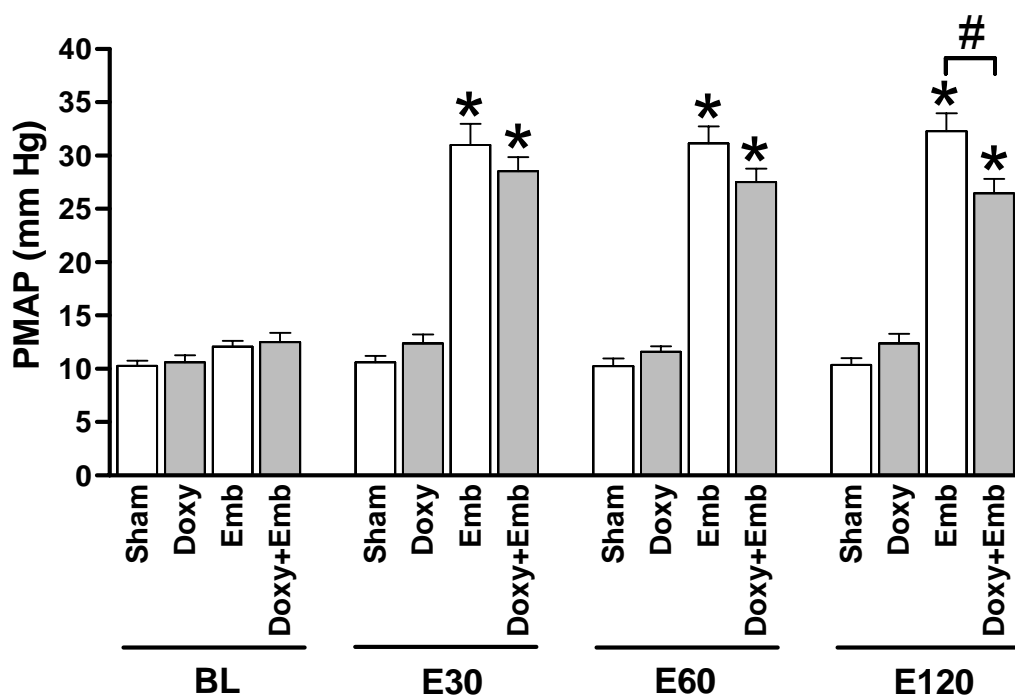


Figura 7: Avaliação da pressão média da artéria pulmonar em função do tempo.

Pressão média da artéria pulmonar (PMAP) em mmHg dos grupos Sham (N=5), Doxy (N=5), Emb (N=10) e Doxy+Emb (n=10) nos momentos Basal (BL), E30, E60 e E120 minutos após a indução da embolia pulmonar aguda. Os valores são as médias \pm E.P.M. * $P < 0,05$ vs respectivo basal, # $P < 0,05$ vs grupo Emb.

O índice de resistência vascular pulmonar (IRVP) aumentou em aproximadamente 362%, quando comparado o momento basal ao E30 (142 ± 19 para 656 ± 103 dina.s.cm⁻⁵.m⁻², * $P < 0,05$) no grupo Emb, que na ausência de pré-tratamento permaneceu elevada até o fim do experimento. No grupo Doxy+Emb, que foi pré-tratado com doxiciclina (inibidor não-seletivo das MMPs) o IRVP aumentou em cerca de 232% (180 ± 28 para 597 ± 51 dina.s.cm⁻⁵.m⁻², * $P < 0,05$) comparando o momento basal ao E30, onde no momento E60 apresentou uma tendência de queda, que não foi estatisticamente significativa. Entretanto no momento E120 houve uma redução IRVP em cerca de 38% se

comparados os grupos Emb e Doxy+Emb (828 ± 120 para 514 ± 41 dina.s.cm⁻⁵.m⁻², #P<0,05), respectivamente (Figura 8).

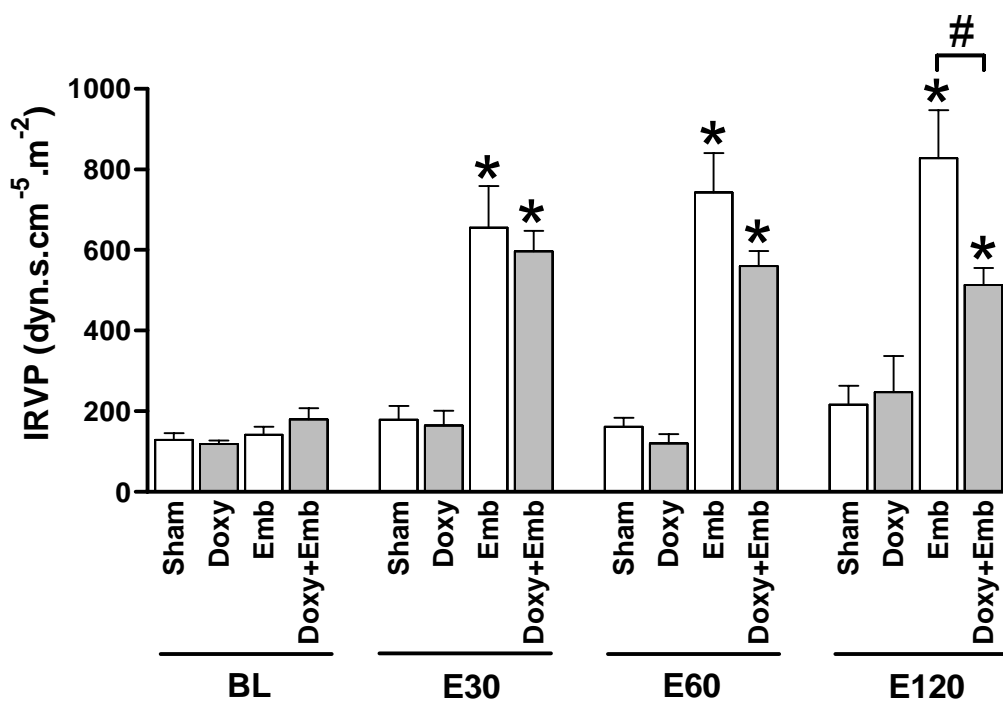


Figura 8: Avaliação do índice de resistência vascular pulmonar em função do tempo.

Índice de resistência vascular pulmonar (IRVP) em dina.s.cm⁻⁵.m⁻² dos grupos Sham (N=5), Doxy (N=5), Emb (N=10) e Doxy+Emb (n=10) nos momentos Basal (BL), E30, E60 e E120 minutos após a indução da embolia pulmonar aguda. Os valores são as médias \pm E.P.M. * P<0,05 vs respectivo basal, # P<0,05 vs grupo Emb.

A indução da EPA não causou diferenças significativas na pressão arterial média nos diferentes grupos, apenas ocorreram pequenas flutuações que não foram estatisticamente significativas nos grupos durante todo o experimento (conforme ilustrado na figura 9).

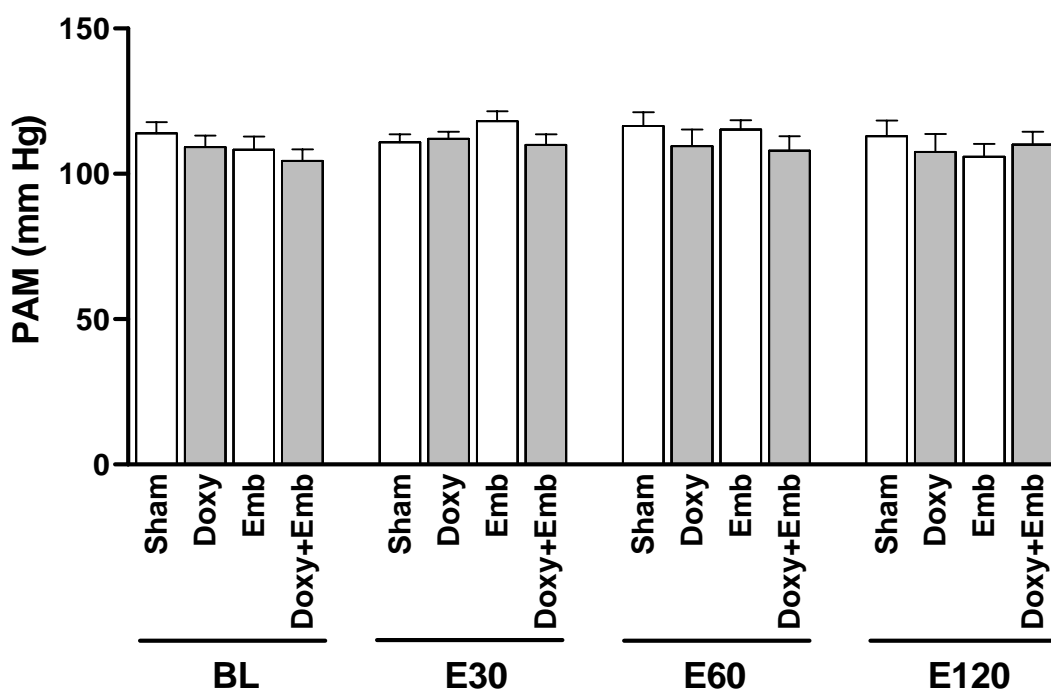


Figura 9: Avaliação da pressão arterial média em função do tempo.

Pressão arterial média (PAM) em mmHg dos grupos Sham (N=5), Doxy (N=5), Emb (N=5) e Doxy+Emb (n=5) nos momentos Basal (BL), E30, E60 e E120 minutos após a indução da embolia pulmonar aguda. Os valores são as médias \pm E.P.M.

De maneira semelhante ao ocorrido com a PAM, a indução da EPA não causou diferenças significativas no índice de resistência vascular sistêmico (IRVS), nos diferentes grupos, apenas ocorreram pequenas flutuações que não foram estatisticamente significativas nos grupos durante todo o experimento (conforme ilustrado na figura 10).

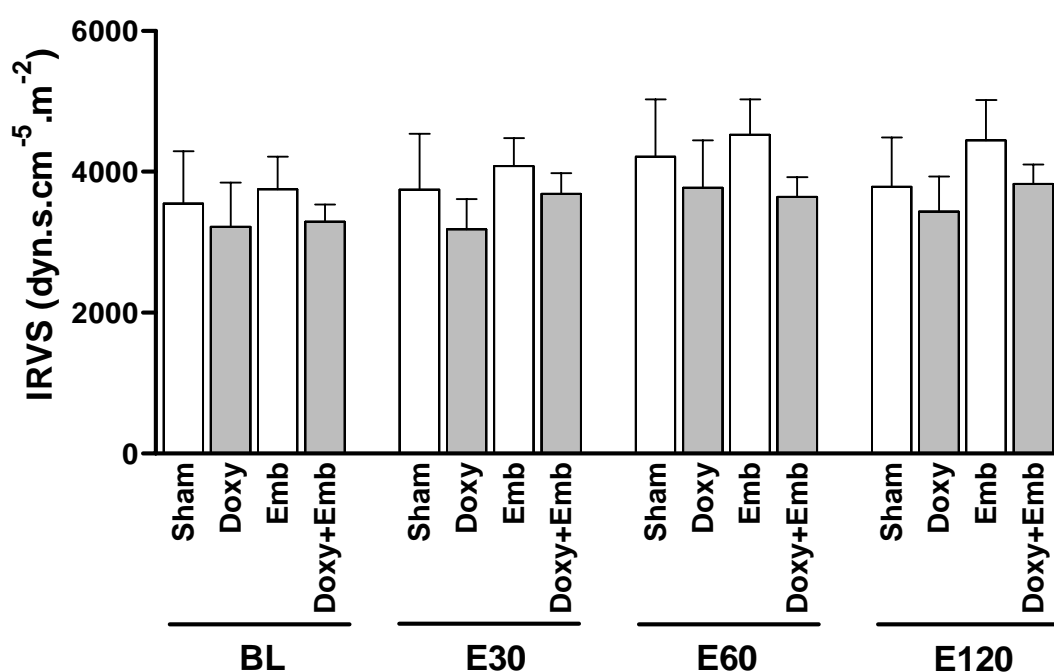


Figura 10: Avaliação do índice de resistência vascular sistêmica em função do tempo.

Índice de resistência vascular sistêmica (IRVS) em $\text{dyn.s.cm}^{-5}.\text{m}^{-2}$ dos grupos Sham (N=5), Doxy (N=5), Emb (N=10) e Doxy+Emb (n=10) nos momentos Basal (BL), E30, E60 e E120 minutos após a indução da embolia pulmonar aguda. Os valores são as médias \pm E.P.M.

A EPA causou uma aparente redução, porém estatisticamente negativa do índice cardíaco (IC) no grupo Emb até o fim do experimento, quando comparado ao momento basal. No grupo Doxy+Emb, não houve redução do índice cardíaco (IC) durante o experimento, no entanto no momento E120 o índice cardíaco do grupo Emb foi estatisticamente diferente do grupo Doxy+Emb em cerca de 20% ($2,5 \pm 0,2$ para $3,0 \pm 0,1$ $\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^2$, # $P < 0,05$) respectivamente (Figura 11).

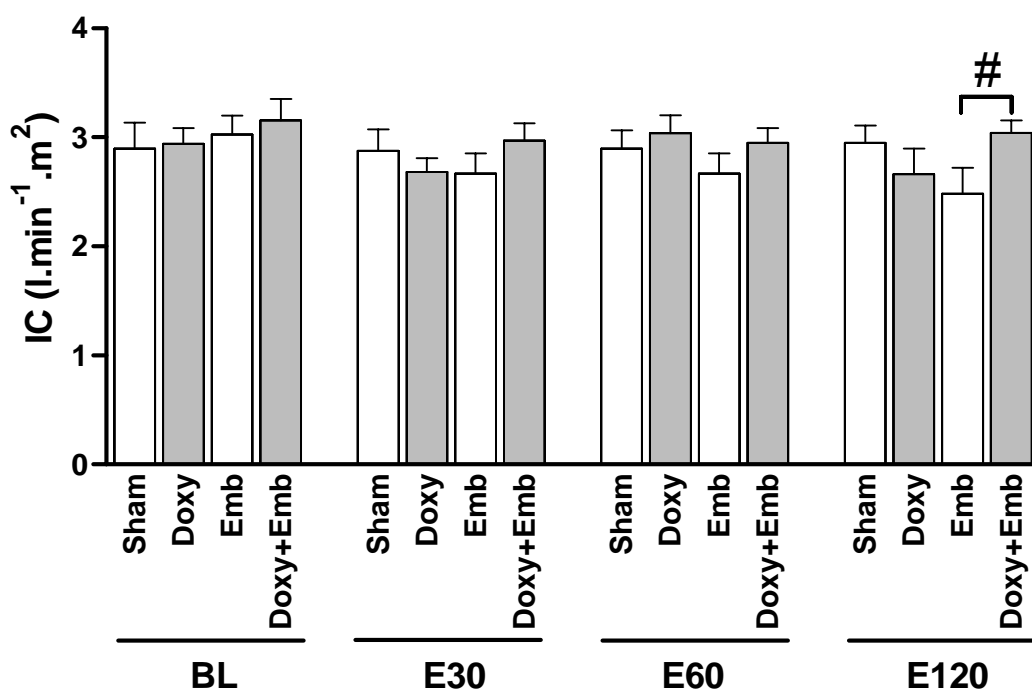


Figura 11: Avaliação do Índice cardíaco em função do tempo.

Índice Cardíaco (IC) em $\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^2$ dos grupos Sham (N=5), Doxy (N=5), Emb (N=10) e Doxy+Emb (n=10) nos momentos Basal (BL), E30, E60 e E120 minutos após a indução da embolia pulmonar aguda. Os valores são as médias \pm E.P.M., # $P < 0,05$ vs grupo Emb.

Não houve mudanças significativas na frequência cardíaca (FC) com a instalação EPA nos diferentes tempos de observação e nem entre os grupos experimentais, como apresentado na figura 12.

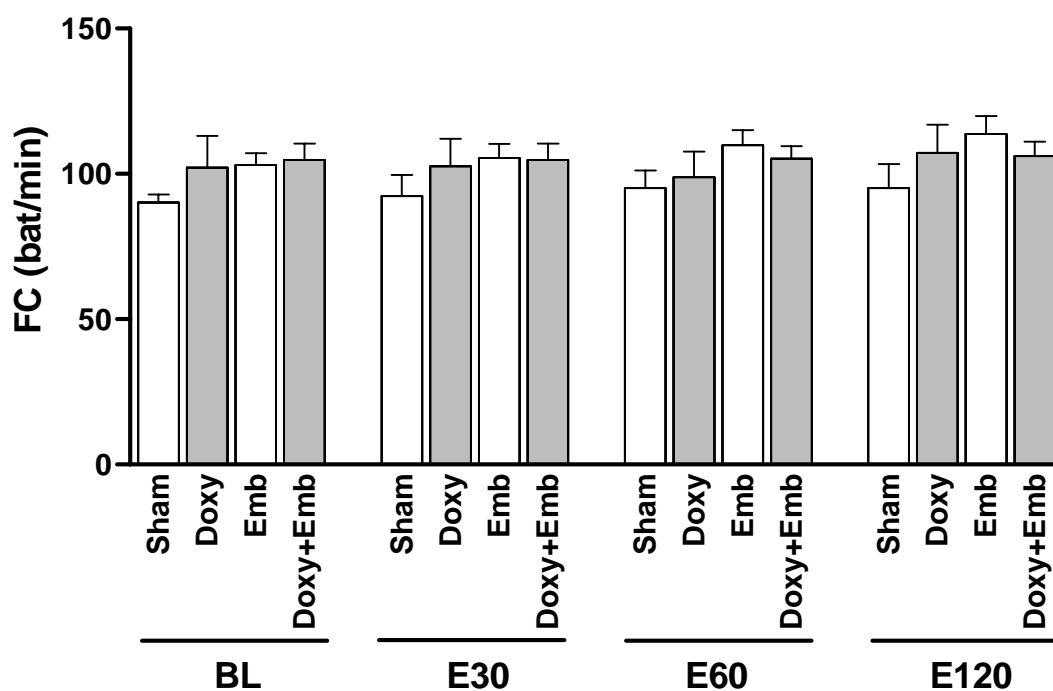


Figura 12: Avaliação da frequência cardíaca em função do tempo.

Frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto dos grupos Sham (N=5), Doxy (N=5), Emb (N=10) e Doxy+Emb (n=10) nos momentos Basal (BL), E30, E60 e E120 minutos após a indução da embolia pulmonar aguda. Os valores são as médias \pm E.P.M.

A dP/dt máxima do ventrículo direito não sofreu mudanças estatisticamente significativas em consequência da embolia pulmonar aguda, apesar de que os grupos Emb e Doxy+Emb mostraram uma tendência de aumento (figura 13). Da mesma forma a dP/dt mínima do ventrículo direito não sofreu alterações estatisticamente significativas após a indução da embolia pulmonar aguda, conforme pode ser visualizado na figura 14.

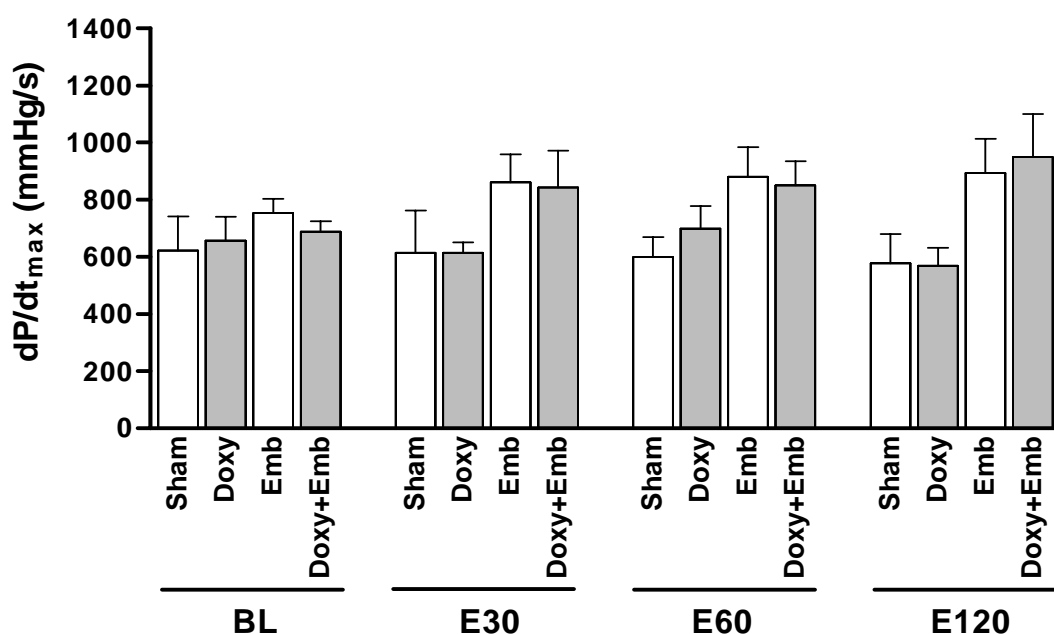


Figura 13: Avaliação da dP/dt máxima em função do tempo.

dP/Dt máxima em mmHg/s dos grupos Sham (N=5), Doxy (N=5), Emb (N=10) e Doxy+Emb (n=10) nos momentos Basal (BL), E30, E60 e E120 minutos após a indução da embolia pulmonar aguda. Os valores são as médias \pm E.P.M.

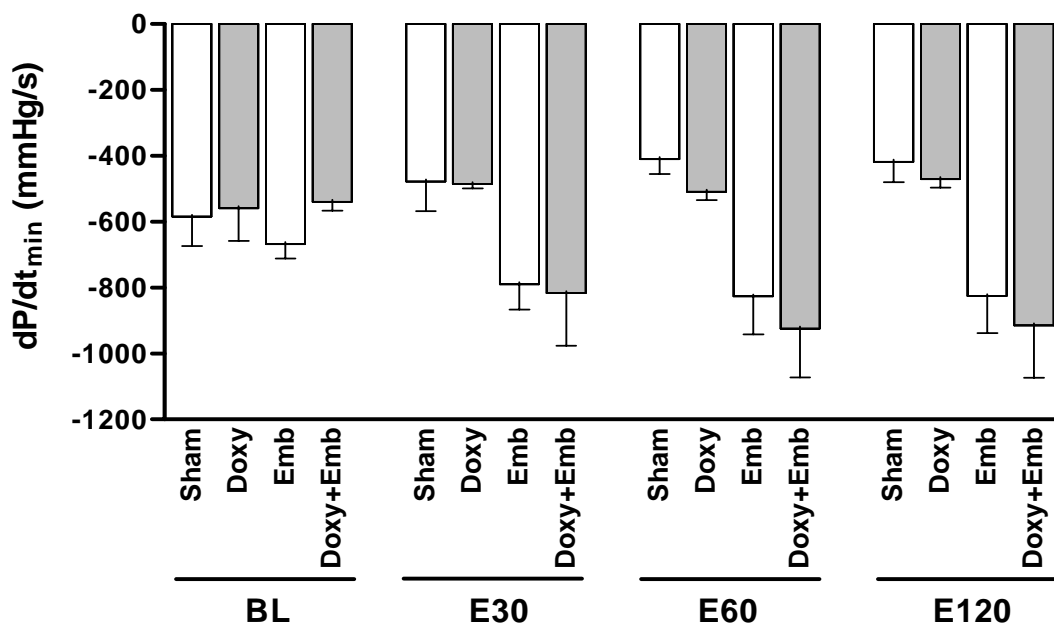


Figura 14: Avaliação da dP/dt mínima em função do tempo.

dP/dt mínima em mmHg/s nos grupos Sham (N=5), Doxy (N=5), Emb (N=10) e Doxy+Emb (n=10) nos momentos Basal (BL), E30, E60 e E120 minutos após a indução da embolia pulmonar aguda. Os valores são as médias \pm E.P.M.

5.2. Resultados da atividade gelatinolítica das metaloproteinasas 2 e 9

Com relação ao ensaio da zimografia nas amostras de plasma, enquanto a atividade da MMP-2 não aumentou significativamente após a EPA (figura 15), a atividade da MMP-9 aumentou aproximadamente 105% no grupo EMB. O pré-tratamento com doxiciclina no grupo Doxy+Emb diminuiu a atividade da MMP-9 no plasma para valores basais (Figura 16).

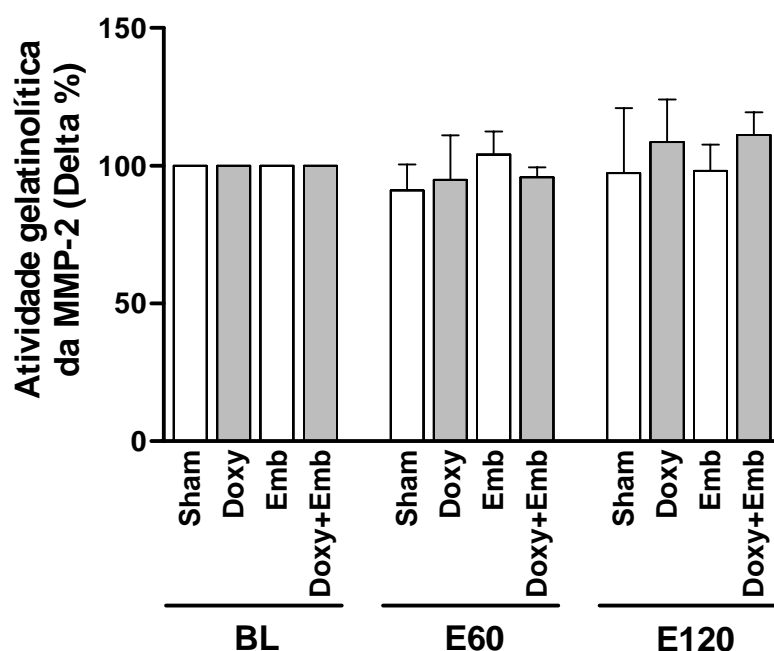


Figura 15: Avaliação da atividade das MMP-2 pelo método da zimografia.

Delta percentual em relação ao momento basal (100%) da atividade gelatinolítica da MMP-2 no plasma nos grupos Sham (N=5), Doxy (N=5), Emb (N=10) e Doxy+Emb (n=10), nos momentos Basal (BL), E60 e E120 minutos após a indução da embolia pulmonar aguda. Os valores são o delta % \pm E.P.M.

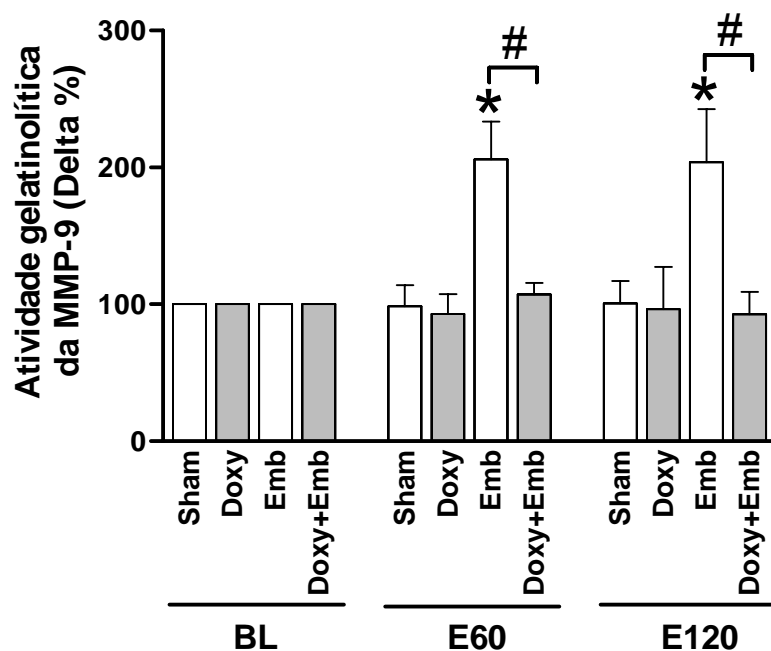


Figura 16: Avaliação da atividade das MMP-9 pelo método da zimografia.

Delta percentual em relação ao momento basal (100%) da atividade gelatinolítica da MMP-9 no plasma nos grupos Sham (N=5), Doxy (N=5), Emb (N=10) e Doxy+Emb (n=10), nos momentos Basal (BL), E60 e E120 minutos após a indução da embolia pulmonar aguda. Os valores são o delta % \pm E.P.M. * $P < 0,05$ vs respectivo basal, # $P < 0,05$ vs grupo Emb.

De forma semelhante à zimografia das MMPs 2 e 9 no plasma; o ensaio da zimografia nas amostras de ventrículo direito também demonstrou que a atividade da MMP-2 não aumentou significativamente após a EPA. No entanto a atividade da MMP-9 teve uma tendência de aumento no grupo Emb, porém não foi significativa (Figura 18).

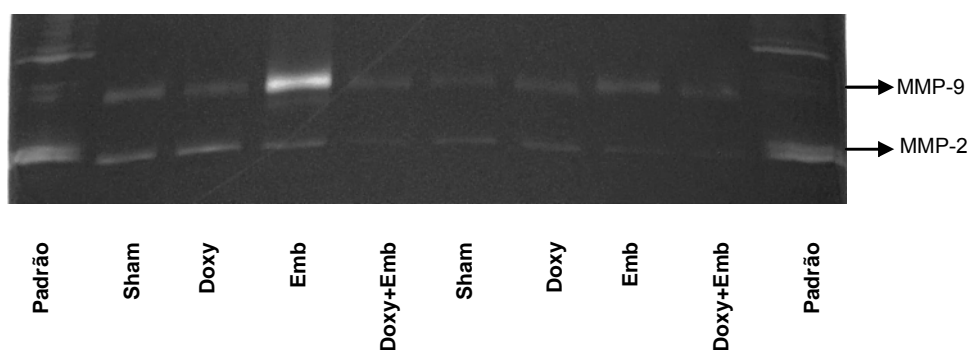


Figura 17: Gel de zimografia exibindo as bandas características de pró-MMP-9 e pró-MMP-2 nos grupos Sham (N=5), Doxy (N=5), Emb (N=10) e Doxy+Emb (n=10).

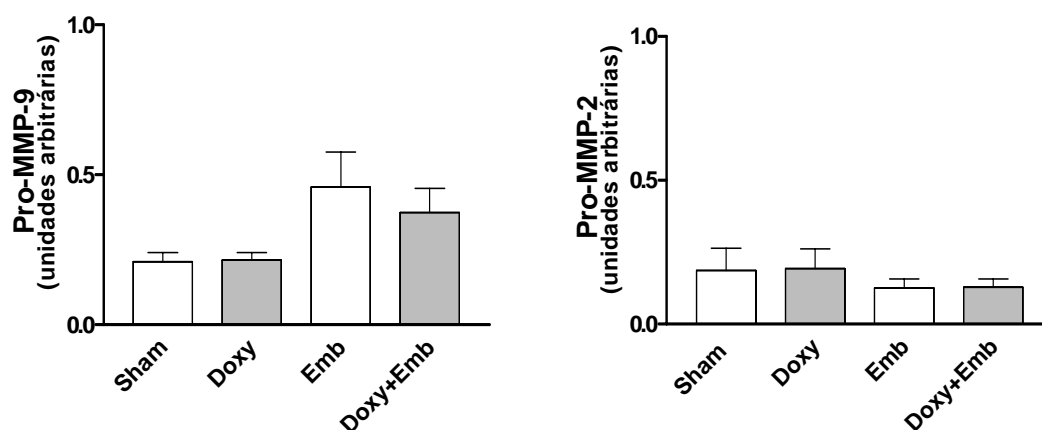


Figura 18: Avaliação da atividade das MMPs 2 e 9 pelo método da zimografia
Atividade gelatinolítica da MMP-9 e MMP-2 em amostras de ventrículo direito nos grupos Sham (N=5), Doxy (N=5), Emb (N=10) e Doxy+Emb (n=10) 120 minutos após a indução da embolia pulmonar aguda. Os valores são a média \pm E.P.M.

No ensaio que avalia a atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9 utilizando um kit de atividade gelatinolítica, os animais do grupo Sham e Doxy não apresentaram mudanças significativas. No entanto, a indução da embolia pulmonar aguda promoveu um aumento da atividade gelatinolítica das MMPs-2 e 9; o pré-tratamento com doxiciclina atenuou esse aumento da atividade

gelatinolítica, respectivamente nos grupos Emb e Doxy+Emb de forma significativa (Figura 19).

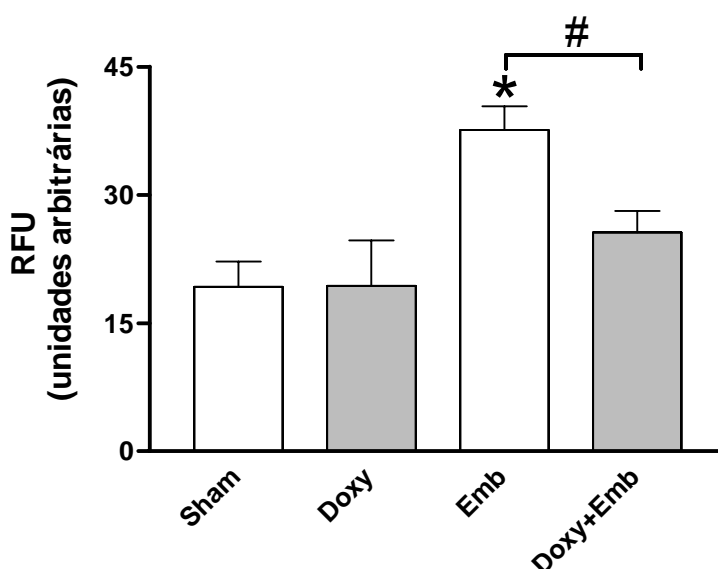


Figura 19: Avaliação da atividade das MMPs 2 e 9 utilizando um kit de atividade gelatinolítica.

Atividade gelatinolítica da MMP-9 e MMP-2 em amostras de ventrículo direito nos grupos Sham (N=5), Doxy (N=5), Emb (N=10) e Doxy+Emb (n=10) 120 minutos após a indução da embolia pulmonar aguda. Os valores são a média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ vs grupo Sham, # $P < 0,05$ vs grupo Emb.

A zimografia *in situ* também foi realizada com o intuito de se avaliar a atividade das gelatinases, onde os animais dos grupos Sham e Doxy não apresentaram mudanças significativas. A indução da embolia pulmonar aguda promoveu um aumento da atividade das gelatinases no grupo Emb, e o pré-tratamento com doxiciclina no grupo Doxy+Emb mostrou uma tendência em diminuir a atividade das gelatinases, porém de forma não significativa (Figura 21).

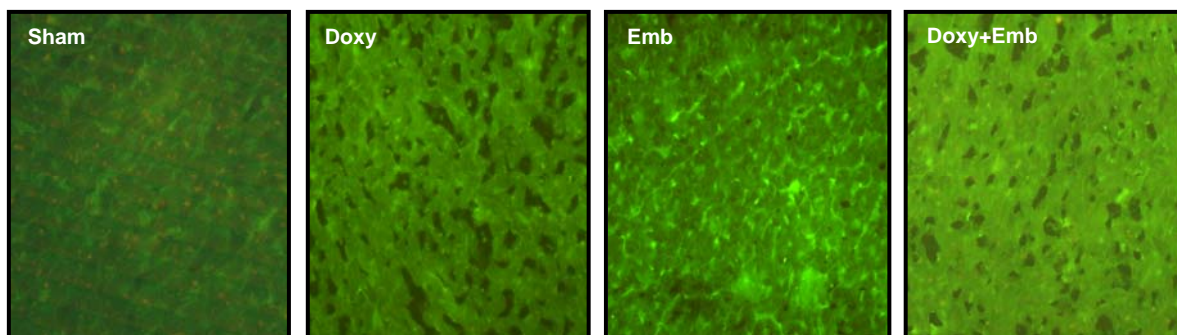


Figura 20: Fotografia de cortes de ventrículo direito de cães nos grupos Sham (N=5), Doxy (N=5), Emb (N=10) e Doxy+Emb (n=10).

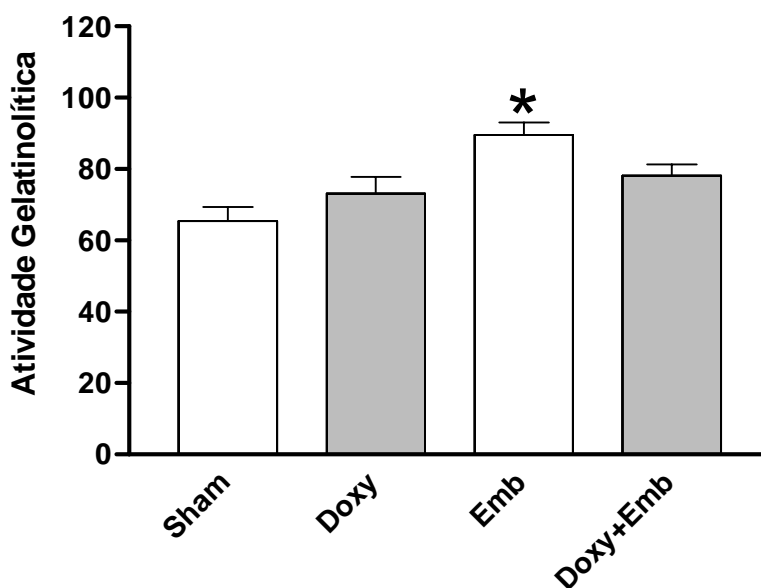


Figura 21: Avaliação da atividade das MMPs 2 e 9 pelo método da zimografia *in situ*.

Atividade gelatinolítica da MMP-9 e MMP-2 em amostras de ventrículo direito nos grupos Sham (N=5), Doxy (N=5), Emb (N=10) e Doxy+Emb (n=10) 120 minutos após a indução da embolia pulmonar aguda. Os valores são a média ± E.P.M. * P<0,05 vs grupo Sham.

5.3. Resultado da atividade da mieloperoxidase (MPO)

O ensaio da atividade da mieloperoxidase (MPO) foi utilizado para quantificar o acúmulo de neutrófilos no coração (ventrículo direito). Os animais dos grupos Sham e Doxy não apresentaram mudanças significativas, no entanto a indução da embolia pulmonar aguda promoveu um aumento na atividade da MPO correspondente a um maior acúmulo de neutrófilos para o ventrículo direito dos animais do grupo embolia (* $P < 0,05$). O pré-tratamento com doxiciclina diminuiu a atividade da MPO no grupo Doxy+EMB (# $P < 0,05$), resultando numa menor quantidade de neutrófilos no coração dos animais pertencentes a esse grupo (Figura 22).

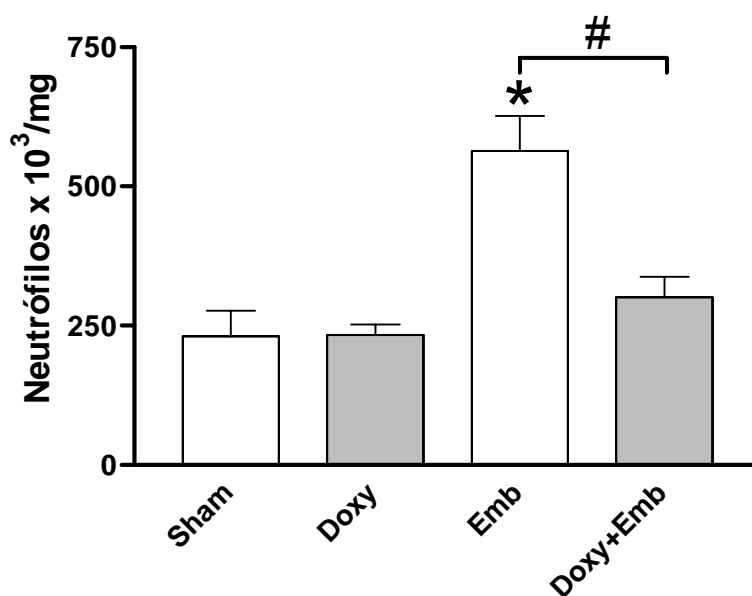


Figura 22: Avaliação da migração de neutrófilos pelo método da mieloperoxidase (MPO).

Atividade da MPO em amostras de ventrículo direito nos grupos Sham (N=5), Doxy (N=5), Emb (N=10) e Doxy+Emb (n=10) 120 minutos após a indução da embolia pulmonar aguda. Os valores são a média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ vs grupo Sham, # $P < 0,05$ vs grupo Emb.

5.4. Resultado da dosagem de troponina I

Com relação ao ensaio da troponina I, os animais dos grupos Sham e Doxy não apresentaram mudanças significativas. Entretanto a indução da embolia pulmonar aguda foi associada com aumento significativo da troponina I no soro no grupo Emb e o pré-tratamento com doxiciclina no grupo Doxy+Emb diminuiu a concentração de troponina I no soro de 61% para 43% respectivamente (conforme representado na figura 21).

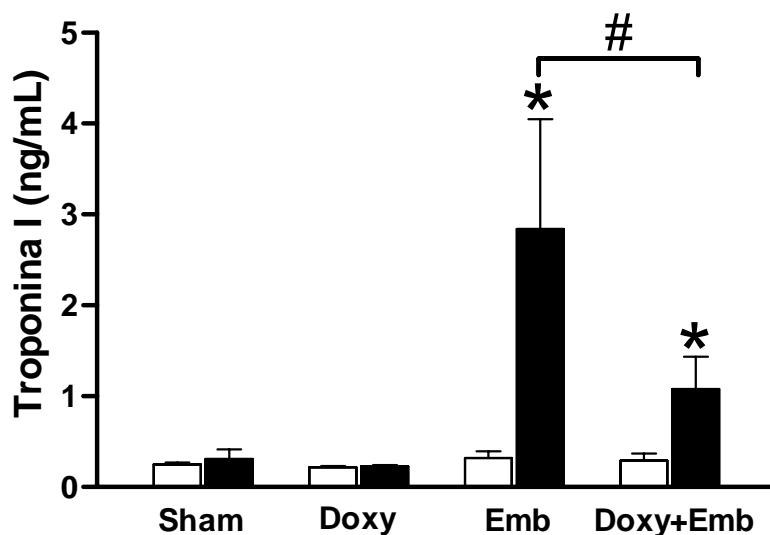


Figura 23: Avaliação da concentração de troponina I no soro pelo método de imunoensaio enzimático por quimiluminescência.

Concentração de troponina I no soro nos grupos Sham (N=5), Doxy (N=5), Emb (N=10) e Doxy+Emb (n=10) nos momentos Basal (branco) e E120 (preto) minutos após a indução da tromboembolia pulmonar aguda. Os valores são a média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ vs respectivo basal, # $P < 0,05$ vs grupo Emb.

6. DISCUSSÃO

A inibição das MMPs por doxiciclina (inibidor não seletivo) antes da indução da EPA mostrou ter efeitos hemodinâmicos benéficos nesse estudo. Os animais do grupo Emb que foram submetidos à EPA tiveram aumentos tanto da PAP quanto do IRVP, caracterizando a hipertensão pulmonar aguda induzida por EPA. Em contraste, os aumentos da PAP e do IRVP dos animais do grupo Doxy+Emb (pré-tratados com doxiciclina seguido de indução da EPA) foram menos intensos que do grupo Emb, observando-se uma queda ao longo do tempo, que foi significativa 120 minutos após a indução da embolia. Isto sugere que as MMPs, possivelmente as MMP-2 e -9 participam do processo de hipertensão pulmonar induzida por EPA, e que a inibição das MMPs possa ser utilizada para atenuar o distúrbio hemodinâmico causado pela EPA. Isso pode ser explicado pelo fato das MMPs modularem as ações de alguns peptídeos vasoativos liberados durante a EPA e que promovem hipertensão pulmonar. Como exemplo, a MMP-2 cliva a big-endotelina (vasoconstritor) à endotelina 1-32, que tem potente ação vasoconstritora similar àquela produzida pela endotelina-1 (Fernandez-Patron, Radomski *et al.*, 1999). A MMP- 2 também afeta as ações de peptídeos vasodilatadores incluindo a adrenomedulina gerando tanto produtos vasoconstritores como vasodilatadores, bem como suprime as ações vasodilatadoras do CGRP (Fernandez-Patron, Stewart *et al.*, 2000; Martinez, Oh *et al.*, 2004). Esses efeitos sobre alguns peptídeos vasoativos sugerem que as MMPs possam participar do controle do tônus vascular pulmonar, aumentando a liberação de mediadores vasoconstritores, bem como degradando mediadores vasodilatadores, agravando, dessa forma, a hipertensão pulmonar. Esta sugestão é apoiada por outros trabalhos que

sugerem que as MMPs participem da hipertensão pulmonar, e que a inibição destas poderia resultar em melhora hemodinâmica durante EPA (Palei, A. C., Zaneti, R. A. *et al.*, 2005; Fortuna, G.M., Figueiredo-Lopes, L. *et al.*, 2007).

A inibição das MMPs não influenciou a pressão arterial sistêmica nem o índice de resistência vascular sistêmico (IRVS). Isso sugere uma possível seletividade dos efeitos da inibição das MMPs pela doxiciclina para os vasos pulmonares em nosso modelo de embolia pulmonar aguda, onde não foi observada hipotensão sistêmica devida ao pré-tratamento com doxiciclina.

Em relação ao índice cardíaco (IC), a inibição das MMPs antes da indução da embolia pulmonar protegeu contra a queda do IC ao longo de todo o experimento. Isso sugere que, de alguma forma, as MMPs possam promover efeitos que prejudiquem a função cardíaca durante a EPA. Uma das variáveis que podem alterar o débito cardíaco é a frequência cardíaca (FC), que permaneceu inalterada entre os grupos durante todo o experimento.

Para avaliar a função do ventrículo direito durante a EPA, foram medidas a dP/dt max e a dP/dt min como índices de função sistólica e diastólica do ventrículo direito, respectivamente. Observamos que, embora a indução da EPA não tenha aumentado significativamente a dP/dt max e a dP/dt min, observamos maiores dP/dt max e a dP/dt min nos animais embolizados em comparação com os não embolizados. Entretanto, não observamos quaisquer diferenças nestes parâmetros quando comparamos os animais embolizados tratados com doxiciclina com aqueles que recebem veículo (controles), o que nos indica que a inibição de MMPs pela doxiciclina não foi capaz de afetar significativamente o desempenho do ventrículo direito avaliado com estes

parâmetros. Talvez, se a avaliação da dP/dt max e dP/dt min após a indução da EPA fosse realizada muito mais tardiamente (6 ou 9 horas após EPA, por exemplo) conseguiríamos observar diferenças significativas e expressivas entre os grupos, possivelmente mostrando que, de alguma forma, a indução da EPA poderia induzir alterações de função cardíaca contra as quais a inibição de MMPs poderia ter efeito protetor. Esta sugestão tem por base nossos resultados de troponina I cardíaca medida no soro, conforme discutimos abaixo.

Recentes estudos tem implicado as MMPs na EPA (Palei, A. C. T., Zaneti, R. A. G. *et al.*, 2005; Souza-Costa, Zerbini, Palei *et al.*, 2005; Fortuna, G. M., Figueiredo-Lopes, L. *et al.*, 2007; Souza-Costa, Figueiredo-Lopes *et al.*, 2007), porém o exato mecanismo de como isso ocorre ainda não foi elucidado. Em nosso estudo, mostramos, por diferentes ensaios, que a atividade das MMPs está aumentada após a indução da EPA por infusão de coágulos autólogos (5mL/kg). Esse aumento da atividade das gelatinases foi encontrado tanto em amostras de plasma quanto em amostras de ventrículo direito. Isso sugere que, além de influenciar a hipertensão pulmonar induzida por EPA, as MMPs-2 e -9 também possam influenciar a função cardíaca, participando de alguma forma da disfunção do ventrículo direito em decorrência da EPA.

Durante a EPA é possível que as MMPs-2 e -9 estejam realizando parte de suas ações dentro dos cardiomiócitos, degradando proteínas contráteis como a troponina cardíaca I (TnIc) e a miosina de cadeia leve 1 (MCL-1) (Rouet-Benzineb, Buhler *et al.*, 1999; Chow, Cena *et al.*, 2007; Schulz, 2007). Nossos dados corroboram esta sugestão, pois observamos que, no grupo Emb,

houve um aumento na liberação de troponina I e no grupo Doxi+Emb o aumento das concentrações de troponina I no soro foram atenuados, possivelmente em função da inibição das MMPs. A degradação de proteínas contráteis do miocárdio pelas MMPs pode intensificar a disfunção ventricular direita, sugerindo, assim, que as MMPs possam participar da fisiopatologia da EPA. A ação das MMPs com propensão à degradação de proteínas contráteis dos cardiomiócitos pode explicar em parte a disfunção ventricular direita que ocorre em função da EPA. A diminuição da pós-carga do ventrículo direito em decorrência da atenuação da hipertensão pulmonar também poderia resultar em melhora da performance do ventrículo direito. De fato, é possível que estejam ocorrendo essas duas situações em nosso estudo, ou seja, é possível que a inibição das MMPs diminua tanto a degradação de troponina I cardíaca diretamente, como também possa atenuar a hipertensão pulmonar induzida por EPA, reduzindo assim a sobrecarga e a isquemia do VD.

Alguns estudos sugerem haver aumento da migração de neutrófilos para o ventrículo direito em função da EPA. Isso possivelmente ocorre devido a lesão isquêmica do ventrículo direito em consequência da EPA, promovendo a síntese de quimiocinas, quimiotaxia e infiltração de neutrófilos para o tecido cardíaco (Watts, Zagorski *et al.*, 2006). Nossos resultados de mieloperoxidase são consistentes com esta sugestão. Ainda, a MMP-9 é usualmente estocada em grânulos dentro dos neutrófilos maduros, sendo possível que estímulos por fatores quimiotáticos produzam liberação de MMP-9 por degranulação leucocitária rápida (menos de 1 hora) (Opdenakker, Van Den Steen *et al.*, 2001). Portanto, como os neutrófilos podem liberar grandes quantidades de

MMP-9 (Fernandez-Patron, Zouki *et al.*, 2001; Van Den Steen, Dubois *et al.*, 2002), é possível que isto tenha ocorrido no ventrículo direito após EPA, criando um ambiente favorável à degradação de proteínas cardíacas contráteis como a Tnlc e a MCL-1. Nossos resultados apóiam esta hipótese, sendo portanto possível que os aumentos de MMP-9 sejam oriundos da degranulação de neutrófilos ativados, explicando em parte os aumentos da atividade da MMP-9 circulante e no tecido cardíaco direito. Nosso estudo mostra aumentos na atividade da mieloperoxidase (MPO) no VD após EPA, o que pode refletir migração neutrofílica no grupo Emb. Em contraste, a inibição das MMPs por doxiciclina pode ter atenuado a migração dos neutrófilos para o tecido cardíaco, possivelmente diminuindo tanto a liberação de MMP-9 como as ações da MMP-9 eventualmente liberada na intimidade do miocárdio. Neste sentido, um estudo prévio sugeriu que a gelatinase B (MMP-9) de origem neutrofílica potencializasse as ações da interleucina 8 (IL-8), aumentando a quimiotaxia dos neutrófilos, conferindo assim um efeito pró-inflamatório para a MMP-9. Dessa forma a MMP-9 não seria apenas um efetor, mas também um regulador da função leucocitária (Opdenakker, Van Den Steen *et al.*, 2001). Assim, estes fatos podem explicar, ao menos em parte, como a inibição das MMPs pode ter diminuído a migração neutrofílica para o VD, conforme sugerem os resultados de MPO. Estratégias farmacológicas que visassem à inibição da MMP-9 poderiam atenuar os distúrbios hemodinâmicos induzidos pela EPA.

O aumento do estresse oxidativo é um importante estimulador do recrutamento de neutrófilos para o coração durante infarto do miocárdio (Ren,

Dewald *et al.*, 2003). Alguns estudos demonstraram que ocorre um aumento do estresse oxidativo em decorrência da EPA (Dias-Junior, Souza-Costa *et al.*, 2005; Souza-Costa, Zerbini, Metzger *et al.*, 2005; Cau, Dias-Junior *et al.*, 2008). Desta forma, o aumento do estresse oxidativo poderia promover a ativação de neutrófilos que, além de liberarem grandes quantidades de MMP-9, também poderiam liberar ânions superóxido e outras espécies reativas de oxigênio (Dikshit, Srivastava *et al.*, 1989). Este efeito poderia gerar um ciclo vicioso, havendo mais estimulação da migração neutrofílica para o ventrículo direito e ativação das MMP-2 e -9 dentro dos cardiomiócitos. Isso poderia gerar uma intensa degradação de proteínas contráteis do miocárdio, causando disfunção ventricular direita associada à EPA.

Nosso estudo tem algumas limitações que devem ser levadas em consideração. Em primeiro lugar podemos citar o uso de um inibidor não seletivo das MMPs (doxiciclina), o qual inibe várias MMPs e não só as MMPs-2 e -9 que parecem ser importantes na EPA. Como já é descrito, algumas MMPs regulam a atividade de outras (Chow, Cena *et al.*, 2007; Schulz, 2007) e a inibição não seletiva poderia de alguma forma influenciar essa regulação. Segundo, a avaliação hemodinâmica durante o experimento deveria ser realizada por um tempo mais longo, pois talvez diferentes resultados fossem encontrados em relação à avaliação da função cardíaca pela dP/dt max e min, e sobre a atividade da MMP-2 por exemplo. Nesse contexto, talvez encontrássemos alguma diferença significativa entre os grupos EMB e Doxy+EMB em relação à dP/dt máx e dP/dt min em avaliações mais tardias, pois supostamente o desempenho cardíaco do grupo Doxy+Emb poderia estar

melhor do que a do grupo Emb no decorrer do tempo. A atividade da MMP-2 também poderia aumentar se fosse feita uma análise algumas horas mais tarde. Demonstrou-se em células endoteliais cardíacas que hipóxia de curta duração (6 horas) inibe a síntese de mRNA da MMP-2. Porém, hipóxia de longa duração (24 horas) aumentou o mRNA da MMP-2 (Alfonso-Jaume, Bergman *et al.*, 2006; Chow, Cena *et al.*, 2007).

Concluindo, a inibição das MMPs previamente a indução da EPA parece ter efeitos importantes na proteção contra a disfunção do ventrículo direito. De fato isso pode ter ocorrido porque a inibição das MMPs diminuiu a hipertensão pulmonar aguda induzida por EPA, a migração dos neutrófilos para o ventrículo direito, a liberação de troponina I cardíaca no soro, bem como a atividade das MMPs-2 e -9 no ventrículo direito. Provavelmente isso atenuou as ações das MMPs na intimidade dos cardiomiócitos, com conseqüente diminuição da degradação de proteínas contráteis cardíacas e tendência a melhora do desempenho cardíaco. Esses efeitos podem proteger o ventrículo direito contra lesões em conseqüência da EPA, possivelmente resultando em efeitos hemodinâmicos benéficos a curto e longo prazo.

7. CONCLUSÕES

7.1. A inibição das MMPs previamente à indução da EPA atenuou a hipertensão pulmonar aguda, promovendo melhora do quadro hemodinâmico dos animais submetidos a embolia pulmonar aguda (EPA).

7.2. Durante a EPA constatou-se aumento da atividade da MMP- 9 no plasma, bem como da atividade das gelatinases no ventrículo direito.

7.3. A inibição de MMPs por doxiciclina atenuou os aumentos das concentrações circulantes de troponina I associados à EPA. Este efeito foi associado a menores atividades de mieloperoxidase no ventrículo direito.

Conjuntamente, estas conclusões parciais nos levam à conclusão final de que a inibição de MMPs pode atenuar a lesão miocárdica do ventrículo direito associada à EPA, possivelmente levando a melhor desempenho cardíaco durante EPA. Isto pode ser explicado por inibição da migração de leucócitos para a intimidade do miocárdio, com liberação de menores quantidades de MMPs e/ou inibição de MMPs liberadas por leucócitos, proporcionando um efeito protetor contra a degradação de miofilamentos contráteis durante EPA.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfonso-Jaume, M. A., M. R. Bergman, *et al.* Cardiac ischemia-reperfusion injury induces matrix metalloproteinase-2 expression through the AP-1 components FosB and JunB. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.291, n.4, p.H1838-46. 2006.

Almahameed, A. e T. L. Carman. Outpatient management of stable acute pulmonary embolism: proposed accelerated pathway for risk stratification. Am J Med, v.120, n.10 Suppl 2, p.S18-25. 2007.

Barnes, P. J. e S. F. Liu. Regulation of pulmonary vascular tone. Pharmacol Rev, v.47, n.1, p.87-131. 1995.

Birkedal-Hansen, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. Curr Opin Cell Biol, v.7, n.5, p.728-35. 1995.

Brooks, H., E. S. Kirk, *et al.* Performance of the right ventricle under stress: relation to right coronary flow. J Clin Invest, v.50, n.10, p.2176-83. 1971.

Bryckaert, M. C., F. Rendu, *et al.* PDGF modifies phosphoinositide metabolism and inhibits aggregation and release in human platelets. Biochem Biophys Res Commun, v.135, n.1, p.52-7. 1986.

Cao, J., H. Sato, *et al.* The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for pro-gelatinase A activation. J Biol Chem, v.270, n.2, p.801-5. 1995.

Carson, J. L., M. A. Kelley, *et al.* The clinical course of pulmonary embolism. N Engl J Med, v.326, n.19, p.1240-5. 1992.

Cau, S. B., C. A. Dias-Junior, *et al.* Dose-dependent beneficial hemodynamic effects of BAY 41-2272 in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. Eur J Pharmacol, v.581, n.1-2, p.132-7. 2008.

Chow, A. K., J. Cena, *et al.* Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. Br J Pharmacol, v.152, n.2, p.189-205. 2007.

Coker, M. L., M. A. Doscher, *et al.* Matrix metalloproteinase synthesis and expression in isolated LV myocyte preparations. Am J Physiol, v.277, n.2 Pt 2, p.H777-87. 1999.

Comroe, J. H., Jr., B. Van Lingen, *et al.* Reflex and direct cardiopulmonary effects of 5-OH-tryptamine (serotonin); their possible role in pulmonary embolism and coronary thrombosis. Am J Physiol, v.173, n.3, p.379-86. 1953.

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

Dantzker, D. R., P. D. Wagner, *et al.* Gas exchange after pulmonary thromboembolization in dogs. Circ Res, v.42, n.1, p.92-103. 1978.

Del Basso, P. e L. Argiolas. Cardiopulmonary effects of endothelin-1 in the guinea pig: role of thromboxane A2. J Cardiovasc Pharmacol, v.26 Suppl 3, p.S120-2. 1995.

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

Deuel, T. F. e J. S. Huang. Platelet-derived growth factor. Structure, function, and roles in normal and transformed cells. J Clin Invest, v.74, n.3, p.669-76. 1984.

Dias-Junior, C. A., D. C. Souza-Costa, *et al.* Effect of sildenafil on pulmonary embolism-induced oxidative stress and pulmonary hypertension. Anesth Analg, v.101, p.115-120. 2005.

Dias-Junior, C. A., T. F. Vieira, *et al.* Sildenafil Selectively Inhibits Acute Pulmonary Embolism-Induced Pulmonary Hypertension. Pulm Pharmacol Ther, v.18, n.3, p.181-186. 2005.

Dikshit, M., R. Srivastava, *et al.* Role of free radicals in pulmonary thromboembolism in mice. Thromb Res, v.55, n.5, p.549-57. 1989.

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

Douketis, J. D., M. A. Crowther, *et al.* Elevated cardiac troponin levels in patients with submassive pulmonary embolism. Arch Intern Med, v.162, n.1, p.79-81. 2002.

Dschietzig, T., M. Laule, *et al.* Coronary constriction and consequent cardiodepression in pulmonary embolism are mediated by pulmonary big endothelin and enhanced in early endothelial dysfunction. Crit Care Med, v.26, n.3, p.510-7. 1998.

Edlow, J. A. Emergency department management of pulmonary embolism. Emerg Med Clin North Am, v.19, n.4, p.995-1011. 2001.

Elliot, C. G. Pulmonary physiology during pulmonary embolism. Chest, v.101, p.163S-171S. 1992.

Fatar, M., M. Stroick, *et al.* Matrix metalloproteinases in cerebrovascular diseases. Cerebrovasc Dis, v.20, n.3, p.141-51. 2005.

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

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

Fernandez-Patron, C., C. Zouki, *et al.* Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1[1-32]. Faseb J, v.15, n.12, p.2230-40. 2001.

Fortuna, G. M., L. Figueiredo-Lopes, *et al.* A role for matrix metalloproteinase-9 in the hemodynamic changes following acute pulmonary embolism. Int J Cardiol, v.114, n.1, p.22-7. 2007.

Goldhaber, S. Z. Cardiac biomarkers in pulmonary embolism. Chest, v.123, n.6, p.1782-4. 2003.

Goldhaber, S. Z. e C. G. Elliott. Acute pulmonary embolism: part I: epidemiology, pathophysiology, and diagnosis. Circulation, v.108, n.22, p.2726-9. 2003.

Golub, L. M., H. M. Lee, *et al.* Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. Adv Dent Res, v.12, n.2, p.12-26. 1998.

Gross, P. L. e J. I. Weitz. New anticoagulants for treatment of venous thromboembolism. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.28, n.3, p.380-6. 2008.

Heymans, S., A. Lutun, *et al.* Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. Nat Med, v.5, n.10, p.1135-42. 1999.

Iwadate, K., M. Doi, *et al.* Right ventricular damage due to pulmonary embolism: examination of the number of infiltrating macrophages. Forensic Sci Int, v.134, n.2-3, p.147-53. 2003.

Jahn, U. R., R. Waurick, *et al.* Thoracic, but not lumbar, epidural anesthesia improves cardiopulmonary function in ovine pulmonary embolism. Anesth Analg, v.93, n.6, p.1460-5, table of contents. 2001.

Jardin, F., O. Dubourg, *et al.* Quantitative two-dimensional echocardiography in massive pulmonary embolism: emphasis on ventricular interdependence and leftward septal displacement. J Am Coll Cardiol, v.10, n.6, p.1201-6. 1987.

Jones, A. E., J. A. Watts, *et al.* Inhibition of prostaglandin synthesis during polystyrene microsphere-induced pulmonary embolism in the rat. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.284, n.6, p.L1072-81. 2003.

Konstantinides, S., A. Geibel, *et al.* Importance of cardiac troponins I and T in risk stratification of patients with acute pulmonary embolism. Circulation, v.106, n.10, p.1263-8. 2002.

Kucher, N. e S. Z. Goldhaber. Cardiac biomarkers for risk stratification of patients with acute pulmonary embolism. Circulation, v.108, n.18, p.2191-4. 2003.

Layish, D. T. e V. F. Tapson. Pharmacologic hemodynamic support in massive pulmonary embolism. Chest, v.111, n.1, p.218-24. 1997.

Lualdi, J. C. e S. Z. Goldhaber. Right ventricular dysfunction after acute pulmonary embolism: pathophysiologic factors, detection, and therapeutic implications. Am Heart J, v.130, n.6, p.1276-82. 1995.

Maclean, M. R. Endothelin-1 and serotonin: mediators of primary and secondary pulmonary hypertension? J Lab Clin Med, v.134, n.2, p.105-14. 1999.

Martinez, A., H. R. Oh, *et al.* Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. Biochem J, v.383, n.Pt. 3, p.413-8. 2004.

Matthay, R. A., A. C. Arroliga, *et al.* Right ventricular function at rest and during exercise in chronic obstructive pulmonary disease. Chest, v.101, n.5 Suppl, p.255S-262S. 1992.

Mebazaa, A., P. Karpati, *et al.* Acute right ventricular failure--from pathophysiology to new treatments. Intensive Care Med, v.30, n.2, p.185-96. 2004.

Meyer, T., L. Binder, *et al.* Cardiac troponin I elevation in acute pulmonary embolism is associated with right ventricular dysfunction. J Am Coll Cardiol, v.36, n.5, p.1632-6. 2000.

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

Morgenthaler, T. I. e J. H. Ryu. Clinical characteristics of fatal pulmonary embolism in a referral hospital. Mayo Clin Proc, v.70, n.5, p.417-24. 1995.

O'connor, C. M. e M. X. Fitzgerald. Matrix metalloproteases and lung disease. Thorax, v.49, n.6, p.602-9. 1994.

Oates, J. A., G. A. Fitzgerald, *et al.* Clinical implications of prostaglandin and thromboxane A2 formation (1). N Engl J Med, v.319, n.11, p.689-98. 1988.

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

Opdenakker, G., P. E. Van Den Steen, *et al.* Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. J Leukoc Biol, v.69, n.6, p.851-9. 2001.

Owens, M. W., S. A. Milligan, *et al.* Effects of reactive metabolites of oxygen and nitrogen on gelatinase A activity. Am J Physiol, v.273, n.2 Pt 1, p.L445-50. 1997.

Palei, A. C. T., R. A. G. Zaneti, *et al.* Hemodynamic benefits of matrix metalloproteinase-9 inhibition by doxycycline during experimental acute pulmonary embolism. Angiology, v.5, p.611-617. 2005.

Peterson, J. T. The importance of estimating the therapeutic index in the development of matrix metalloproteinase inhibitors. Cardiovasc Res, v.69, n.3, p.677-87. 2006.

Rajagopalan, S., X. P. Meng, *et al.* 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, v.98, n.11, p.2572-9. 1996.

Reeves, J. T. e L. J. Rubin. The pulmonary circulation: snapshots of progress. Am J Respir Crit Care Med, v.157, n.4, p.101-8. 1998.

Reeves, W. C., L. M. Demers, *et al.* The release of thromboxane A2 and prostacyclin following experimental acute pulmonary embolism. Prostaglandins Leukot Med, v.11, n.1, p.1-10. 1983.

Ren, G., O. Dewald, *et al.* Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, v.2, n.3, p.242-56. 2003.

Riedel, M. Acute pulmonary embolism 1: pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis. Heart, v.85, n.2, p.229-40. 2001.

Rouet-Benzineb, P., J. M. Buhler, *et al.* Altered balance between matrix gelatinases (MMP-2 and MMP-9) and their tissue inhibitors in human dilated cardiomyopathy: potential role of MMP-9 in myosin-heavy chain degradation. Eur J Heart Fail, v.1, n.4, p.337-52. 1999.

Roy, R., B. Zhang, *et al.* Making the cut: protease-mediated regulation of angiogenesis. Exp Cell Res, v.312, n.5, p.608-22. 2006.

Sadosty, A. T., E. T. Boie, *et al.* Pulmonary embolism. Emerg Med Clin North Am, v.21, n.2, p.363-84. 2003.

Schmeck, J., T. Koch, *et al.* The role of endothelin-1 as a mediator of the pressure response after air embolism in blood perfused lungs. Intensive Care Med, v.24, n.6, p.605-11. 1998.

Schulman, D. S. e R. A. Matthay. The right ventricle in pulmonary disease. Cardiol Clin, v.10, n.1, p.111-35. 1992.

Schulz, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.47, p.211-42. 2007.

Smith, G. e A. N. Smith. The role of serotonin in experimental pulmonary embolism. Surg Gynecol Obstet, v.101, n.6, p.691-700. 1955.

Smulders, Y. M. Pathophysiology and treatment of haemodynamic instability in acute pulmonary embolism: the pivotal role of pulmonary vasoconstriction. Cardiovasc Res, v.48, n.1, p.23-33. 2000.

Smulders, Y. M. Contribution of pulmonary vasoconstriction to haemodynamic instability after acute pulmonary embolism. Implications for treatment? Neth J Med, v.58, n.6, p.241-7. 2001.

Souza-Costa, D. C., L. Figueiredo-Lopes, *et al.* Protective effects of atorvastatin in rat models of acute pulmonary embolism: involvement of matrix metalloproteinase-9. Crit Care Med, v.35, n.1, p.239-245. 2007.

Souza-Costa, D. C., T. Zerbini, *et al.* L-Arginine attenuates acute pulmonary embolism-induced oxidative stress and pulmonary hypertension. Nitric Oxide, v.12, n.1, p.9-14. 2005.

Spinale, F. G. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. Circ Res, v.90, n.5, p.520-30. 2002.

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

Stratmann, G. e G. A. Gregory. Neurogenic and humoral vasoconstriction in acute pulmonary thromboembolism. Anesth Analg, v.97, n.2, p.341-54. 2003.

Tanus-Santos, J. E. e H. Moreno, Jr. Is there a place for inhaled nitric oxide in the therapy of massive pulmonary embolism? Anesthesiology, v.94, n.2, p.354. 2001.

Tanus-Santos, J. E. e M. J. Theodorakis. Is there a place for inhaled nitric oxide in the therapy of acute pulmonary embolism ? Am J Respir Med, v.1, p.167-176. 2002.

Thomas, D. P. e J. R. Vane. 5-hydroxytryptamine in the circulation of the dog. Nature, v.216, n.5113, p.335-8. 1967.

Thompson, M. e G. Cockerill. Matrix metalloproteinase-2: the forgotten enzyme in aneurysm pathogenesis. Ann N Y Acad Sci, v.1085, p.170-4. 2006.

Tyagi, S. C., L. Matsubara, *et al.* Direct extraction and estimation of collagenase(s) activity by zymography in microquantities of rat myocardium and uterus. Clin Biochem, v.26, n.3, p.191-8. 1993.

Utsonomiya, T., M. M. Krausz, *et al.* Thromboxane mediation of cardiopulmonary effects of embolism. J Clin Invest, v.70, n.2, p.361-8. 1982.

Uzuelli, J. A., C. A. Dias-Junior, *et al.* Severity dependent increases in circulating cardiac troponin I and MMP-9 concentrations after experimental acute pulmonary thromboembolism. Clin Chim Acta, v.388, n.1-2, p.184-8. 2008.

Van Den Steen, P. E., B. Dubois, *et al.* Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). Crit Rev Biochem Mol Biol, v.37, n.6, p.375-536. 2002.

Vassbotn, F. S., O. K. Havnen, *et al.* Negative feedback regulation of human platelets via autocrine activation of the platelet-derived growth factor alpha-receptor. J Biol Chem, v.269, n.19, p.13874-9. 1994.

Vinten-Johansen, J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. Cardiovasc Res, v.61, n.3, p.481-97. 2004.

Voelkel, N. F. e R. M. Tuder. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease? J Clin Invest, v.106, n.6, p.733-8. 2000.

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

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

Watts, J. A., J. Zagorski, *et al.* Cardiac inflammation contributes to right ventricular dysfunction following experimental pulmonary embolism in rats. J Mol Cell Cardiol, v.41, n.2, p.296-307. 2006.

West, J. B. Fisiologia Respiratória Moderna. San Diego: Editora Manole LTDA. 1977. 175 p.

Wood, K. E. Major pulmonary embolism: review of a pathophysiologic approach to the golden hour of hemodynamically significant pulmonary embolism. Chest, v.121, n.3, p.877-905. 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)