

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

KARINA MAGALHÃES ALVES DA MATA

**Participação das Metaloproteinases 2 e 9 no
desenvolvimento de aneurismas da aorta abdominal em
ratos *Wistar***

Ribeirão Preto
2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

KARINA MAGALHÃES ALVES DA MATA

**Participação das Metaloproteinases 2 e 9 no
desenvolvimento de aneurismas na aorta abdominal em
ratos *Wistar***

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Patologia
Opção: Patologia Experimental
Orientador: Prof^ª. Dra. Simone G. Ramos

Ribeirão Preto
2008

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Mata, Karina Magalhães
Participação das metaloproteinases 2 e 9 no desenvolvimento de aneurisma da aorta abdominal em ratos *Wistar*. Ribeirão Preto, 2008.
96 p.: il. ; 30cm

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

Orientadora: Ramos, Simone Gusmão.

1. Aneurisma. 2. Metaloproteinases 2 e 9. 3. Estenose. 4. alterações hemodinâmicas. 5. Lesão vascular. 6. remodelamento.

FOLHA DE APROVAÇÃO

KARINA MAGALHÃES ALVES DA MATA

Participação das metaloproteinases 2 e 9 no desenvolvimento de aneurisma da aorta abdominal em ratos *Wistar*.

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

Área de concentração: Patologia Experimental.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP sob a orientação da Prof^a Dr^a Simone G. Ramos, com apoio financeiro da CAPES (bolsa de estudos) e FAPESP (auxílio à pesquisa; Proc. 2007/00342-8).

Dedicatórias

À Deus,

Que sempre trouxe e traz a serenidade necessária para minha vida...

À minha Mãe, Minha fortaleza,

Por SEMPRE fazer tudo se tornar possível em minha vida, por estar comigo a cada minuto, mesmo estando longe, por me ensinar o que é amor incondicional..... Tua força e teu amor me dirigiram pela vida e me deram as asas que eu precisava para voar...

Ao meu Pai,

Por estar sempre comigo e fazer parte de todas as minhas conquistas, mesmo que em outro plano espiritual...

Ao meu namorado Cleverson,

*Que acompanhou meus esforços e minhas dificuldades, alegrias e tristezas, sempre me apoiando, me fazendo enxergar o que realmente vale à pena. Obrigada por encontrar em você o amor que preciso para
minha vida.*

Agradecimento Especial

*À minha tia **Joana,***

Sem você nada seria possível, sem a sua ajuda não estaria aqui hoje. Obrigada por sempre poder contar com seu apoio, independente da situação, pelo lar, amor e carinho que me proporcionou.

*À minha irmã **Renata,***

*Por me mostrar qual o melhor caminho a seguir (mesmo não sendo fácil...), por ser meu exemplo. Aos meus irmãos caçulas **Júnior e Thaiz,** Pelo amor e carinho independente da distância e do tempo.*

.

*Aos meus Avós **Mariinha e Geraldo,***

Por serem meu porto seguro, me apoiando e estimulando a sempre seguir em frente, independente das dificuldades.

*Ao meu padrasto **João,***

Que fez parte da minha educação, do meu caráter, do que sou hoje. Obrigada por seu apoio em todos os momentos da minha vida!

Agradecimento Especial

À minha orientadora, Dra Simone G. Ramos,

Que não só me orientou, mas me guiou em direção à pesquisa, sendo sempre justa e humana, refletindo no meu amadurecimento e crescimento....A minha eterna gratidão.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marcos A. Rossi,

Por ter me acolhido em seu laboratório quando cheguei, abrindo as portas desta etapa da minha vida. Obrigada por aceitar fazer parte desta banca, e por participar do final desta etapa.

À Profa. Raquel F. Gerlach,

Pela recepção em seu laboratório, por suas valiosas sugestões, que foram colocadas em prática e pela participação neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Konradin Metze,

Por aceitar participar desta banca de mestrado, por ser tão receptivo, enriquecendo o trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia,

Por suas sábias soluções em difíceis situações.

À Elaine M. Floriano por estar sempre disposta a ajudar, me fazendo rir e tornando o trabalho mais divertido. Você foi e será sempre essencial.

Às secretárias do departamento Neide T. Gonçalves, Rosângela C. N. Paiva, Camila L Zambonini, por terem uma imensa paciência e me tratarem sempre com tanto carinho. À Edna "Pio", além de toda atenção que tinha comigo, agradeço pela sua amizade.

À Maria Helena Riul (Lena), Lígia G. V. Santoro e Mônica A. Abreu, obrigada por me acolherem no laboratório, e pela ajuda que me proporcionam.

À amiga Marcela, sempre companheira, conselheira e principalmente leal...obrigada por sua amizade e por estar ao meu lado. À Cristiane, agradeço por seus valiosos conselhos, sua

ajuda, e principalmente por me “defender”, mesmo sendo menor que eu!! À **Cristina**, por toda sua ajuda, que foi fundamental, por todas as coisas que aprendi com você, contribuindo muito para minha formação, e principalmente por sua amizade. Vocês são grandes pessoas e foram fundamentais para meu equilíbrio.

À minha grande amiga **TU**, que mesmo não gostando de “depoimentos”, sou muito grata por me ajudar a suportar os momentos difíceis, sendo essencial para eu seguir em frente. Obrigada AMIGAS! À **Célia (CC)**, por estar ao meu lado, independente de qualquer situação e pelo infinito apoio sempre, mesmo quando não precisei! À **Lui**, pelos momentos alegres e descontraídos.

Ao **Fábio**, que se tornou um grande amigo, por sua sincera amizade e por ser meu parceiro nesta pesquisa, contribuindo muito para nosso trabalho! À **Paula** por sua grande ajuda e bons conselhos! À **Anelise**, por estar sempre disposta a ajudar com muito bom humor. À **Luciana**, por me ajudar no início desta pesquisa, com sua tamanha sinceridade, sempre.

À **Cibele** que além de ser uma pessoa fantástica e competente, foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho. À **Érica** e a **Mara** por estarem sempre dispostas a ajudar e ensinar, seja qual for o assunto.

À **Élen** que foi fundamental neste trabalho, me ajudando e principalmente ensinando, mesmo nos fins de semana e principalmente por tornar-se minha amiga!

Ao pessoal do laboratório de Oncologia: **Rose** e **Patrícia**, por me receberem com tanto carinho quando cheguei! Muito obrigada, jamais esquecerei. Aos amigos da patologia, **Vinicius**, **Tassiana**, **Pacu** e **Ana** e **Valdecir** pelos momentos de descontração, e por me tratarem sempre com carinho. **Marcela Hassumi**, **Fabiana** e **Marcinha**, por todas as trocas de experiência, conversas e desabafos.

Ao Paulo Henrique (Paulinho) por estar sempre disposto a me ajudar, e pelas longas e divertidas conversas durante as cirurgias.

Ao Toninho, por sua fundamental ajuda, em trabalhos paralelos.

*Agradeço **À Maria Helena Riul** pelo apoio técnico prestado.*

*À **CAPE**, pela bolsa de estudos concedida, e a **FAPESP**, pelo auxílio á pesquisa (2007/00342-8).*

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende” (Leonardo da Vinci)

RESUMO

MATA, K.M. **Participação das Metaloproteinases 2 e 9 no desenvolvimento de Aneurismas da Aorta Abdominal em ratos *Wistar***, 2008. 100f. Dissertação (Mestrado). Departamento de Patologia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2008

A degradação da matriz extracelular e de proteínas da parede aórtica associada à inflamação é uma das principais características dos aneurismas da aorta abdominal (AAA). O objetivo deste trabalho foi investigar a participação das metaloproteinases 2 e 9 na formação de AAAs, através de um modelo experimental inédito de indução de AAA em ratos *Wistar*, desencadeado por duas potenciais causas de secreção e ativação de MMP-2 e 9: alteração do fluxo sanguíneo e lesão vascular externa na aorta. A formação de aneurismas foi observada em 60%-70% dos animais, apresentando diâmetro de 7 a 8 vezes maior que o diâmetro normal da aorta. Histologicamente observou-se remodelamento, intensa resposta inflamatória, destruição maciça de fibras elásticas e aumento da síntese de colágeno na parede aórtica. A expressão de ambas as formas de MMP-2 foram observadas tanto nos AAAs como nos grupos controles, neste com menor atividade, entretanto a expressão da pró e da MMP-9 ativa foram encontradas apenas nos AAAs. *Conclusão:* Nossos resultados sugerem que tanto as MMP-2 quanto as MMP-9 apresentam importante papel no desenvolvimento de AAA e este novo modelo de indução de AAA, pode ajudar a elucidar os mecanismos que desencadeiam a secreção e ativação das MMP-2 e MMP-9 na formação de aneurismas.

Palavras chaves: Aneurisma, lesão vascular, estenose, fluxo turbulento, MMP-2, MMP-9, remodelamento vascular.

ABSTRACT

MATA, K.M. ***Participation of Metalloproteinases 2 and 9 in Developed of Aortic Abdominal Aneurysms in Wistar Rats.*** 2008. 100f. Dissertation (Master Science Degree). Department of Pathology - School of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo, 2008

Degradation of extracellular matrix and proteins associated with inflammation of the aortic wall is the main characteristics of the abdominal aortic aneurysms (AAA). The aim of this study was investigate the participation of Metalloproteinase 2 and 9 in AAA formation in Wistar rats. A novel experimental model of AAA was developed, providing two potential causes of MMPs secretion and activation, turbulent flow (caused by surgically induced extrinsic stenosis) and outside vascular injury is detailed described. The days analyzed were the 3rd and the 7th post surgery. Aneurysms were observed to occur in 60-70% of the Group AAA, exhibiting a major transversal diameter to 7 from 8 times larger than controls and sham groups. Histologically, the aneurysms wall showed extensive structural remodeling, intense inflammatory response, massive elastic fibers destruction and abundant collagen deposition. Increased pro- and active MMP-2 was demonstrated in the AAA and controls groups, whereas pro- and active MMP-9 were found to be expressed only in the AAA group. *Conclusions:* MMP-2 and MMP-9 may have a pivotal role in the development of experimental AAA. This model can help to elucidate the mechanisms which trigger off MMP-2 and MMP-9 secretion and activation causing aneurysms.

Keywords: Aneurysm, injury, stenosis, turbulent flow, MMP-2, MMP-9, vascular remodeling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

- Figura 1.** Esquema demonstrativo da cirurgia de indução de aneurisma.
- Figura 2.** Avaliação do fluxo sanguíneo através do ultrassom com Doppler colorido.
- Figura 3.** Representação esquemática do estresse de cisalhamento induzido pela estenose.
- Figura 4.** Fotomicrografia representativa das aortas dos grupos controles e dos aneurismas em ambos os dias de pós-operatório (p.o.).
- Figura 5.** Fotomicrografia representativa da histopatologia da aorta abdominal dos grupos AAA, controles e *Sham*, em ambos os dias de p.o.
- Figura 6.** Fotomicrografia da auto-fluorescência da aorta abdominal dos grupos AAA, controles e *Sham*, em ambos os dias de p.o.
- Figura 7.** Gráfico representativo do espessamento da parede das aortas dos grupos AAA, controles e *Sham*, em ambos os dias de p.o.
- Figura 8.** Gráfico representativo do percentual de fibras elásticas nas aortas dos grupos AAA, controles e *Sham*, em ambos os dias de p.o.
- Figura 9.** Gráfico representativo do percentual de colágeno nas aortas dos grupos AAA, controles e *Sham*, em ambos os dias de p.o.
- Figura 10.** Correlação entre o diâmetro e o grau de inflamação da parede aórtica dos grupos AAA, controles e *Sham*, em ambos os dias de p.o.
- Figura 11.** Correlação entre o diâmetro e o espessamento das aortas dos grupos AAA, controles e *Sham*, em ambos os dias de p.o.
- Figura 12.** Análise densitométrica das bandas pró-MMP-9, pró-MMP-2 e MMP-2, no 3º dia p.o., dos grupos AAA, controles e *Sham*.

- Figura 13.** Análise densitométrica das bandas pró-MMP-9, MMP-9, pró- MMP-2 e MMP-2, no 7^o dia p.o., dos grupos AAA, controles e *Sham*.
- Figura 14.** Comparação entre as análises densitométrica das bandas pró-MMP-9, pró-MMP-2 e MMP-2 ativa entre o 3^o e o 7^o p.o., dos grupos AAA, controles e *Sham*.
- Figura 15.** Fotomicrografia representativa da zimografia *in situ*, dos grupos AAA, controles e *Sham*, em ambos os dias de p.o.
- Figura 16** Relação entre os diâmetros aórticos previstos com os diâmetros obtidos nos grupos AAA, Lesão, Estenose e *Sham* em ambos dias de p.o.
- Figura 17** Diâmetros obtidos nos grupos Lesão, Estenose, *Sham* e AAA em ambos dias de p.o. AAA: aneurisma de aorta abdominal em ambos os dias de p.o.
- Tabela 1** Média dos diâmetros aórtico dos animais dos grupos AAA, Lesão, Estenose e *Sham* em ambos os dias de pós-operatório.
- Tabela 2** Percentual de fibras elásticas, colágeno e mensuração do espessamento da camada média nos grupos AAA, Lesão, Estenose e *Sham*, em ambos os dias de pós-operatório.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 DEFINIÇÃO	21
1.2 PATOGENIA	23
1.3 METALOPROTEINASES 2 E 9 EM ANEURISMAS	25
1.4 ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS	27
1.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO DE ANEURISMAS	28
2. HIPÓTESE	30
3. OBJETIVOS	32
4. JUSTIFICATIVA	34
5. MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	37
5.2 CIRURGIA DE INDUÇÃO DE ANEURISMA	38
5.3 DOPPLER	40
5.4 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	40
5.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA AORTA	41
5.6 AVALIAÇÃO DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA	41
5.7 ZIMOGRAFIA CONVENCIONAL	42
5.7.1 PREPARO DE EXTRATO DE TECIDO DA AORTA	42
5.7.2 DOSAGEM DE PROTEÍNAS: MÉTODO LOWRY	43
5.7.3 ELETROFORESE DE GEL DE POLIACRILAMIDA 12%	44
5.7.4 ATIVIDADE DAS METALOPROTEINASES	45
5.8 ZIMOGRAFIA <i>IN SITU</i>	45
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
6. RESULTADOS	47
6.1 DOPPLER	48
6.2 ESTUDO MORFOLÓGICO	51
6.2.1 MACROSCOPIA	51
6.2.2 MICROSCOPIA	53
6.3 MORFOMETRIA	56
6.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA	59
6.4 ZIMOGRAFIA CONVENCIONAL	61
6.5 ZIMOGRAFIA <i>IN SITU</i>	66

7. DISCUSSÃO	69
8. CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	79
ANEXOS	93

1. INTRODUÇÃO

1.1. Definição

Aneurismas da aorta abdominal (AAA) representam um dilema terapêutico para aqueles que cuidam de pacientes com doenças vasculares. O seu desenvolvimento tem despertado grande interesse, porque os atuais programas de controle e vigilância têm sido insatisfatórios (CHENG *et al.*, 2006; GOLLEDGE *et al.*, 2006). AAAs são definidos como uma doença degenerativa crônica na parede da aorta, sendo caracterizado por predominante enfraquecimento e dilatação local superior a 50% da parede normal da aorta (THOMPSON, *et al.*, 1999).

São comuns e, muitas vezes, fatais principalmente em pacientes idosos. Estão associados principalmente a homens acima de 65 anos, tabagismo, aterosclerose, hipertensão e predisposição genética (DONG-CHUAN *et al.*, 2006). Existem várias causas de dilatação aneurismática, mas poucas são desenvolvidas por consequência direta de causas específicas, tais como trauma, infecção aguda (salmonela), infecção crônica (tuberculose), doenças inflamatórias (doença de Behçet e Takayasu), e desordens do tecido conectivo (Síndrome de Marfan, Ehlers-Danlos tipo IV) (ERENTUG *et al.*, 2003).

A aterosclerose é um componente ativo no processo de dilatação da aorta, e tanto o seu desenvolvimento quanto o dos AAAs, parece ser promovido pelos mesmos fatores de risco como, tabagismo, hipercolesterolemia, e elevação da pressão arterial. Entretanto, os estudos procuram a confirmação se a aterosclerose tem participação ativa na formação e progressão dos aneurismas ou se é uma consequência dessa doença (REED *et al.*, 1992).

Cerca de 75% dos pacientes que possuem aneurisma de aorta abdominal não apresentam sintoma algum e o diagnóstico é feito por exames físicos de rotina ou

por meio de ultra-som abdominal. À medida que se expandem, os aneurismas podem se tornar dolorosos. Ocasionalmente, pode romper, gerando dor abdominal aguda, dor lombar e hipotensão, caracterizando uma emergência médica. A ruptura aguda ocorre sem qualquer sintoma e é potencialmente fatal (GLIMAKER *et al.*, 1991). Alguns países realizam programas de rastreamento na população para detectar precocemente o problema e evitar a morte súbita (EARNSHAW *et al.*, 2004). Após a ruptura de um aneurisma, cerca de 50% dos pacientes morrem antes de receberem qualquer atendimento. Dos remanescentes, 24% morrem antes da cirurgia ser realizada (DONALDSON *et al.*, 1985).

Por ser uma doença potencialmente letal que provoca cerca de 15.000 mortes por ano nos E.U.A. (KADOGLOU *et al.*, 2004), estima-se que AAA seja a 10^a causa de mortalidade sendo responsáveis por 2% das mortes (THOMPSON *et al.*, 1999). Existem evidências de que os AAAs afetam 6-9% da população acima dos 65 anos (GRANGE *et al.*, 1997).

A reparação cirúrgica é atualmente o único método eficaz para tratamento de AAA, mas este tipo de intervenção é de alto custo e também se associa a alta morbidade e mortalidade. Isto realça a necessidade de mais investigações sobre as causas de AAA, para facilitar o desenvolvimento de terapias médicas (PARODI *et al.*, 1991).

Embora as pesquisas tenham conduzido uma melhor compreensão da fisiopatofisiologia dos aneurismas ao longo das últimas duas décadas, o conhecimento sobre seu processo de degeneração ainda é bastante limitado. Além disso, não há eficácia comprovada de intervenção farmacológica para aneurismas e a reparação cirúrgica é o modo predominante para tratamento de AAA (WASSEF, 2006).

1.2 Patogenia

Alterações estruturais da parede da aorta, inflamação crônica e degradação da matriz extracelular são os eventos mais comuns na fisiopatologia dos AAAs (MENASHI *et al.*, 1987). Numerosos estudos realizados durante a última década têm demonstrado que a degradação de matriz extracelular (MEC) e proteínas da parede aórtica são responsáveis pela expansão e progressão desses aneurismas (LONGO *et al.*, 2002). Em diversos estudos, foi observado que o aumento da atividade elastolítica na parede aórtica de pacientes com aneurisma pode ser o principal evento na alteração de propriedades mecânicas da aorta, como a degradação de elastina e colágeno (FREESTONE *et al.*, 1995; LONGO *et al.*, 1999).

A importância da elastina na manutenção da estrutura da parede da aorta é confirmada pela alta frequência de aneurismas em pacientes com Síndrome de Marfan, doença genética causada por mutações da fibrilina-1. Modelos experimentais obtidos por perfusão de elastase em artérias normais demonstraram que a degradação da elastina provoca o desenvolvimento de dilatação e tortuosidade desta artéria, enquanto que a degradação do colágeno resulta em ruptura sem dilatação antecedente (DOBRIN *et al.*, 1984; DOBRIN; MRKVICKA, 1994).

A degradação da elastina da aorta desempenha um papel importante nos eventos precoces da formação e expansão de aneurismas, pois as fibras elásticas são um dos mais estáveis componentes estruturais da matriz extracelular (LEFEVRE; RUCKER, 1980; SHAPIRO *et al.*, 1991). O conceito de que proteinases poderiam desempenhar um papel importante no desenvolvimento de AAA, segundo

BUSUTTIL *et al.* (1982), tornou-se uma dos mais importantes estudos para compreender o AAA a nível celular e molecular.

Esta degradação é causada pelas metaloproteinases da matriz extracelular que são endopeptidases cálcio-dependente, contendo zinco, expressas em várias células e tecidos, incluindo células da musculatura vascular lisa, endotélio, fibroblastos e células inflamatórias (OHBAYASHI *et al.*, 2002). A família das MMPs apresenta mais de 23 enzimas as quais são responsáveis pela degradação de vários componentes da matriz extracelular, incluindo componentes da membrana basal, colágeno, fibronectina e proteoglicanas (OHBAYASHI *et al.*, 2002). Diferentes metaloproteinases são produzidas por diferentes tipos celulares (BRINCKERHOFF; MATRISIAN, 2002) e se diferem em relação à especificidade de substratos. São classificadas em: (1) Colagenases intersticiais (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), (2) Gelatinases (MMP-2 ou Gelatinase A e MMP-9 ou Gelatinase B), (3) Estromelinas (Estromelina 1 ou MMP-3 e Estromelina 2 ou MMP-10), (4) Matrilisinas (Matrilisina 1 ou MMP-7 e Matrilisina 2 ou MMP-26), (5) MMPs de membranas (MT1-MMP(MMP-14), MT2- MMP (MMP-15), MT3-MMP (MMP-16), MT4-MMP, MT5-MMP e MT6-MMP (MMP- 25)) e (6) outras MMPs (MMP-12, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27 e MMP-28) que não se enquadram nesses grupos principais (DONNELLY *et al.*, 2003; VISSE; NAGASE, 2003).

Estas endopeptidases são sintetizadas e secretadas como pró-forma latente (zimogênios ou pró-MMPs). Podem ser reguladas por mecanismos de transcrição ou mecanismos pós-tradução. A regulação na transcrição acontece por vários fatores incluindo fatores de crescimento, hormônios e citocinas (DONNELLY *et al.*, 2003; TSURUDA *et al.*, 2004). Com relação aos mecanismos de pós-tradução, a pró-forma da enzima, latente na matriz extracelular dos tecidos, pode ser ativada por fatores

como estresse de cisalhamento, tensão mecânica e estresse oxidativo; o propeptídeo também é removido resultando na ativação da MMP, por outras proteases da matriz, como por exemplo, a trombina e plasmina (DONNELLY *et al.*, 2003; NELSON; MELENDEZ, 2004). O controle da atividade das MMPs nos tecidos também pode ser mediado por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), dos quais TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 são descritos atualmente (DONNELLY *et al.*, 2003).

Uma vez em sua forma ativa, as MMPs participam do processo fisiológico de remodelamento da matriz extracelular (ECM) através da degradação de proteínas em suas ligações peptídicas específicas, sendo este, um de seus principais efeitos biológicos (VISSE; NAGASE, 2003).

Estudos têm mostrado que atividade excessiva ou desequilibrada de MMPs está associada à patogênese de várias doenças como doenças neoplásicas (FARIAS *et al.*, 2000), doenças inflamatórias crônicas (NAGASE; WOESSNER, 1999) e doenças cardiovasculares, como os aneurismas (GALIS; KHATRI, 2002; TAYEBJEE *et al.*, 2004).

1.3 Participação das MMPs em aneurismas da aorta abdominal:

As MMP-2 e MMP-9 possuem domínios “fibronectin-like” que são responsáveis por clivarem colágeno tipo I, IV, V, VII, e X, gelatina (colágeno desnaturado) e elastina (YASUMITSU *et al.*, 1992; CREEMERS *et al.*, 2001). Alterações na regulação da expressão e atividade destas MMPs podem estar envolvidas no processo de remodelamento vascular que acontece na fisiopatologia de várias doenças cardiovasculares, inclusive aneurismas (ZHANG *et al.*, 1999).

A Metaloproteinase-2 (gelatinase A), se caracteriza em sua forma latente por uma massa molecular de 72 kDa e é encontrada na musculatura vascular lisa, fibroblastos e endotélio (CAROME *et al.*,1994). Alguns estudos demonstram que a MMP-2 é expressa tanto em aorta normal como em tecido aneurismático, ou seja, é uma proteinase constitutiva (NEWMAN *et al.*,1994). Está envolvida no remodelamento vascular associado a doenças vasculares, por promover tanto a degradação de proteínas da matriz extracelular, como por acentuar a migração de células musculares lisas (CML) (LI *et al.*,1996; BENDECK *et al.*, 1994; JENKINS *et al.*, 1998). Essas CML desempenham um papel fundamental na MEC, pois sintetizam proteínas, tais como colágeno e proteoglicanas e limitam a proteólise durante a inflamação. Entretanto, durante a formação dos AAAs, entram em apoptose, promovendo a formação de aneurismas (CAMP *et al.*, 2003).

Já a metaloproteinase-9 (gelatinase B) apresenta uma massa molecular de 92 kDa em sua forma latente e 82 kDa em sua forma ativa (GALIS *et al.*,1994) e está presente principalmente em macrófagos e neutrófilos (VAN *et al.*, 2002). Ao contrário da MMP-2, não é produzida em aorta normal, sendo encontrada em placas ateroscleróticas, susceptíveis a ruptura (MCMILLAN *et al.*, 1995). São capazes de degradar colágeno, elastina e outros componentes da matriz extracelular causando destruição da lâmina elástica, resultando em expansão e progressão dos AAAs (YAMASHITA *et al.*, 2001).

Alguns trabalhos clínicos e experimentais mostraram o aumento da concentração e atividade dessas enzimas tanto em plasma como em vasos sanguíneos. Estes estudos sugerem que o estiramento e tensão mecânica que acontece nos vasos sanguíneos durante um processo de hipertensão aumentam a expressão e a atividade das MMP-2 e MMP-9 (ASANUMA *et al.*, 2003; MENG *et al.*,

1999; CHESLE *et al.*, 1999; MAGID; MURPHY; GALIS, 2003; O'CALLAGHAN; WILLIAMS, 2000), e que a expressão e a atividade destas enzimas também aumentam em resposta a uma injúria tecidual (JENKINS *et al.*, 1998; COURTMAN *et al.*, 2004).

1.4 Alterações hemodinâmicas

Alterações nas forças hemodinâmicas do fluxo sanguíneo têm sido descritas como fatores importantes no desenvolvimento dos aneurismas (SALSAC; SPARKS; LASHERAS, 2004). Sabe-se perfeitamente que o fluxo sanguíneo quando alterado pode promover alterações na estrutura e função das células endoteliais. Estas alterações podem culminar na liberação/inibição de fatores importantes que atuam na parede vascular (CHENG *et al.*, 2006).

Regiões arteriais com complexa geometria, como estenose, bifurcações, e ramificações, são áreas propensas a lesões, pois o fluxo torna-se turbulento com formação de estase, recirculação e fluxo reverso (NESBITT *et al.*, 2000). Esta transição do fluxo altera a conformação das células endoteliais resultando na ativação da resposta inflamatória liberando espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo este, um dos possíveis fatores de ativação das MMPs (KUNSCH; MEDFORD, 1999).

Prado *et al.* (2006) demonstraram que ratos *Wistar* submetidos à cirurgia de estenose extrínseca na aorta abdominal desenvolveram alterações intimaes nas regiões pré e pós-estenótica da aorta, principalmente na região pós-estenótica, possivelmente pelas alterações do fluxo como recirculação e fluxo reverso, podendo ativar os ROS e conseqüentemente, ativar as MMP-2 e 9.

Estudos relacionados ao fluxo sanguíneo em AAA sugerem a presença de alterações hemodinâmicas e aumento da tensão de cisalhamento na parede da aorta (MOORE *et al.*,1992). Modelos experimentais comprovam esta teoria demonstrando a presença e atividade das MMP-2 e 9 como consequência destas alterações mecânicas (AILAWADI; ELIASON; UPCHURCH, 2003).

1.5 Modelos experimentais de indução de aneurisma

Relatos de tentativas de desenvolvimento de aneurismas experimentais já foram citados na literatura no século passado, em 1839. McCune *et al.* (1953) comentaram a necessidade de criar novas metodologias na indução de aneurismas experimentais, já que os existentes à época não eram direcionados para esse fim (MCCUNE,1953). Eles desenvolveram, então, um método que se baseava na injeção de mostarda nitrogenada na parede da aorta de cães. Posteriormente, outros métodos de destruição parcial da parede arterial foram descritos. Entre eles, destacam-se: a injeção de solução salina hipertônica a 28% (WHITE *et al.* 1961), a incisão e anastomose microvascular (MAXWEL *et al.*, 1979), o enxerto venoso (GERMAN; BLACK, 1954; NISHIKAWA *et al.*, 1976; SANDASSIVAN *et al.*, 1990), a retirada de fragmento da lâmina elástica interna e de parte de túnica (VAN ALPHEN *et al.*, 1990), a destruição da camada elástica interna por estresse hemodinâmico (HASSLER, 1962; HANDA *et al.*, 1983; HASHIMOTO *et al.*, 2000; KOJIMA *et al.*, 1986; DAI *et al.*, 1985; ALVAREZ; RODA, 1986; HAZAMA *et al.*, 1986; KIM *et al.*, 1988; SUZUKI *et al.*, 1980) e lesões com raios laser (AMMIRATI *et al.*,1986, 1988; QUIGLEY *et al.*, 1986; FUTAMI *et al.*, 1995).

Alguns outros modelos de infusão de soluções para indução de aneurismas foram realizados, incluindo a infusão de cálcio e sódio clorídrico (FREESTONE *et al.*,

1997; BASALYGA *et al.*, 2004; CHEW *et al.*, 2004), infusão de cálcio clorídrico em animais *knockout* de MMP-9 (LONGO *et al.*, 2002), infusão de elastase (PETRINEC *et al.*, 1996; MOORE *et al.*, 1999; LAWRENCE *et al.*, 2004; KOBAYASHI *et al.*, 2004), infusão de tioglicolato associado a plasmina (KAITO, HIROSHI, URAYAMA *et al.*, 2003) e indução de aneurisma traumático, através da compressão da parede da aorta utilizando pinça hemostática (GUERREIRO *et al.*, 1996).

Entretanto, poucos modelos experimentais de aneurismas traumáticos são encontrados na literatura, pertinente a sua complexidade e difícil execução (VAN; GAO; KAMPHORST, 1990).

Desenvolvemos em nosso laboratório, um modelo inédito de indução de aneurisma na aorta abdominal de ratos *Wistar*, associando estenose extrínseca e lesão vascular externa na aorta abdominal. Estes dois fenômenos juntos contribuem para a formação e progressão de aneurismas num período de sete dias, havendo evidências da liberação de gelatinases desempenhando importante função no desenvolvimento desses aneurismas.

2. HIPÓTESE

2. Hipótese

A associação da lesão vascular externa com as alterações hemodinâmicas provocadas pela estenose extrínseca levaria ao desencadeamento de um estado pró-inflamatório agudo com secreção e ativação de elastases, principalmente as metaloproteinases 2 e 9. Essas gelatinases provocariam uma destruição importante das fibras elásticas da parede da aorta, propiciando o desenvolvimento de aneurismas. Neste modelo inédito de indução de aneurisma, enfocaremos a participação das Metaloproteinases 2 e 9 e avaliaremos sua interferência no desenvolvimento desses aneurismas.

3. OBJETIVOS

3. Objetivos

- Desenvolver um modelo experimental inédito de indução de aneurisma da aorta abdominal (AAA) em ratos *Wistar*, através da associação de duas potenciais causas de MMPs secreção e ativação: lesão vascular e alterações hemodinâmicas do fluxo sanguíneo;
- Estudar qualitativamente as alterações hemodinâmicas relacionadas ao desenvolvimento desses AAAs;
- Avaliar morfológicamente a parede do AAA;
- Avaliar morfometricamente o espessamento e o percentual de fibras elásticas e colágenas na parede dos AAAs;
- Correlacionar o grau de inflamação e o espessamento da parede com os diâmetros dos AAAs;
- Avaliar a participação das Metaloproteinases 2 e 9 no desenvolvimento dos aneurismas e,
- Avaliar a atividade gelatinolítica das MMPs na parede dos AAAs.

4. JUSTIFICATIVA

4. Justificativa

Aneurismas da aorta abdominal são potencialmente letais, sendo responsáveis por um grande número de óbitos todos os anos. Entretanto, muito pouco é conhecido com relação aos seus mecanismos de formação e progressão. Esse conhecimento escasso deve-se, em parte, à carência de modelos animais comparáveis a esta doença. Acreditamos que esse modelo possa ser utilizado no estudo dos mecanismos de formação e progressão de aneurismas, bem como para desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS:

5.1 Considerações gerais

Foram utilizados ratos *Wistar* (número total: 120), machos, pesando em média 150 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram alocados individualmente em gaiolas construídas com polipropileno e tampas de aço inoxidável perfurado, lavadas diariamente. Foram divididos em quatro grupos contendo 06 animais cada e o grupo experimental (AAA) continha 12 animais.

- **Grupo AAA:** Grupo Experimental (com estenose e lesão traumática da camada externa da aorta abdominal);
- **Grupo Lesão:** Grupo Controle da Lesão Vascular (sem estenose e com lesão traumática da camada externa da aorta abdominal);
- **Grupo Estenose:** Grupo Controle da Estenose da Aorta (com estenose e sem lesão traumática da camada externa da aorta abdominal).
- **Grupo Sham:** Grupo *sham-operado* (sem estenose e sem lesão).

Os animais eram alimentados com dieta padrões Purina® para ratos e água de torneira *ad libitum*. O presente projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Processo nº 06.1.939.53.3).

5.2 Cirurgia de indução de aneurisma

Recentemente neste laboratório, foi desenvolvido um modelo experimental de indução de aneurisma na aorta abdominal. Em ratos *Wistar*, duas potenciais causas de superexpressão de metaloproteinases foram associadas: alterações hemodinâmicas devido à estenose extrínseca e lesão vascular, gerando resposta inflamatória na parede aórtica.

Os animais foram anestesiados com xilazina-8mg/kg e cloridrato de cetamina-74mg/kg, via intra-peritoneal. Após isso, fazíamos tricotomia no flanco esquerdo, fixávamos os animais em decúbito dorsal em mesa cirúrgica adaptada e realizávamos anti-sepsia da pele com álcool iodado. Após uma incisão cirúrgica, aproximadamente 1 cm abaixo do rebordo costal esquerdo, os planos eram dissecados até a exposição da aorta, logo acima das artérias renais. No Grupo Experimental (Grupo AAA), utilizamos uma broca dental diamantada (*Microdont Stevile* número 3215) de 0,94mm de diâmetro, dobrada em L e adaptada a um cabo de aço inoxidável. Esse instrumento foi feito em uma oficina de precisão a fim de provocar uma lesão traumática na camada mais externa da aorta durante sua retirada (Figura 1). A broca diamantada era colocada paralela à aorta. Após isso, envolvíamos ambas com um nó duplo com fio de algodão 3-0 e retirávamos a broca imediatamente após à feitura do nó. O diâmetro da broca provoca uma estenose de 80% no lúmen arterial na aorta abdominal dos ratos *Wistar* (dados do nosso laboratório) (ROSSI *et al.*, 1992). No Grupo Lesão, realizávamos o mesmo procedimento, diferenciando-se apenas pela secção do nó seguido à retirada da broca diamantada. No Grupo Estenose, um instrumento semelhante foi utilizado, mas com ausência da broca diamantada, previamente seccionada, para não provocar lesão na parede vascular. No Grupo *Sham*, uma leve mobilização da aorta

em todos os planos e eixos era realizada, sempre respeitando os limites anatômicos e evitando-se tração excessiva, no intuito de não provocar lesões na camada adventícia. Após o término desses procedimentos, a parede abdominal era suturada com pontos separados de fio de algodão em dois planos, peritônio-músculos e pele. Logo após este procedimento, era administrado dipirona (25mg/kg) nos animais para fins de analgesia.

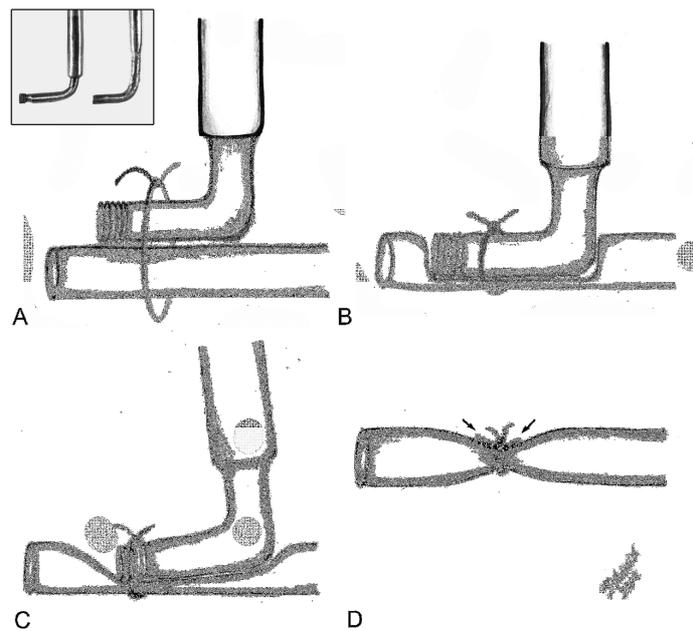


Figura 1. Esquema demonstrativo da cirurgia de indução de aneurisma. As setas (D) indicam a área de lesão vascular provocada pela retirada da broca diamantada. Detalhe: à esquerda a broca diamantada adaptada ao cabo de aço inoxidável (utilizada nos grupos AAA e Lesão) e à direita, a broca sem a presença da ponta diamantada, utilizada no grupo da Estenose.

5.3 Doppler

Animais de todos os grupos do 7º dia p.o. foram selecionados ao acaso, para observação do fluxo sanguíneo nas regiões pré-estenose e pós-estenose. Para esta análise qualitativa, um aparelho de ultra-sonografia Modelo GE Healthcare Ultrasound System, Model Logic e (Milwaukee, WI, USA) com Doppler colorido e transdutor eletrônico linear multifrequencial (6-12MHZ) foi utilizado. Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (74mg/kg) e xilazina (8mg/kg). Este exame foi realizado pelo Prof. Jorge Elias Júnior do Departamento de Clínica Médica (Radiologia/HCFMRP/USP).

5.4 Estudo Histopatológico

Ao final de 3 e 7 dias, foi realizada a eutanásia nos animais por desangramento após anestesia (cloridrato de cetamina-74mg/kg e xilazina-8mg/kg) seguida de coleta do material para análise histopatológica. Uma incisão abdominal mediana era realizada, com o coração ainda pulsando. As aorta eram rapidamente excisadas desde o cajado até o ponto imediatamente após a estenose e lavadas a uma pressão média de perfusão de 100 mmHg com solução salina a 0,9% gelada (4º C), com o auxílio de uma cânula (PE-10) de polipropileno inserida na extremidade proximal. Em seguida, as aortas eram perfundidas com formol a 10% tamponado. Após o período de fixação, o excesso de tecido em torno das aortas foi retirado sob lupa Zeiss Stemi 2000-C (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e as aortas eram seccionadas transversalmente.

Depois de 24h, as aortas eram desidratadas em soluções crescentes de álcool (80%, 95%, 30 minutos cada e 100%; 4 trocas de 1 hora cada), diafanizadas com três banhos de xilol (30 minutos cada), banhadas por 2 vezes em parafina líquida (2

horas cada) e, posteriormente, inclusas em parafina. Cortes seriados eram corados com hematoxilina eosina (5µm de espessura), resorcina (5µm de espessura) e picrosirius vermelho (7µm de espessura).

5.5 Análise morfométrica da aorta

A análise morfométrica da aorta (n=6 animais por grupo) foi realizada utilizando o programa Leica Qwin (Leica Imaging Systems Ltd, Cambridge, Inglaterra) em conjunto com um microscópio Leica (Leica DMR, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemanha), videocâmara (Leica DC300F, Leica Microsystems AG, Heebrugg, Suíça) e um computador *on-line*. Foram utilizadas as aortas incluídas em parafina e coradas com hematoxilina-eosina, resorcina e picrosirius vermelho, para verificação da espessura da camada média (µm) e porcentagem de fibras elásticas e colágeno na parede da aorta, respectivamente, com aumento de 400× (área total 0.65 mm²). Foram coletadas 20 medidas da camada média da aorta, distribuídas por toda a circunferência do vaso, de cada animal para mensuração do espessamento da média. Para quantificação do colágeno e das fibras elásticas foram medidas 6 áreas por aorta (por animal), selecionadas aleatoriamente por toda a circunferência do vaso e determinada em porcentagem por área.

5.6 Avaliação da resposta inflamatória

A severidade da inflamação na parede o vaso foi determinada por microscopia óptica convencional nas aortas incluídas em parafina e coradas com hematoxilina-eosina (n=6 animais por grupo), sendo atribuídos os seguintes valores:

- 0 - nenhuma inflamação;
- 1 - inflamação leve;
- 2 - inflamação moderada e,
- 3 - inflamação severa.

Todas as lâminas foram analisadas pelo mesmo investigador. A escala foi escolhida para quantificar a inflamação celular geral e não por campos isolados, pois a reação inflamatória não era simétrica nessas amostras.

5.7 Zimografia convencional

As aortas depois de colhidas foram lavadas a uma pressão média de perfusão de 100 mmHg com solução salina a 0,9% gelada (4º C), com o auxílio de uma cânula de polipropileno inserida na extremidade proximal (n=6 animais por grupo). Após este procedimento, as aortas foram limpas e congeladas em nitrogênio líquido, armazenadas em *ependorf* e mantidos a uma temperatura de -70ºC. A atividade das MMP-2 e MMP-9 na aorta foram determinadas 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. Esta técnica foi realizada no Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia, Faculdade de Odontologia, Universidade de Medicina de Ribeirão Preto, SP – FORP/USP sob responsabilidade da Profª Drª Raquel F. Geralch.

5.7.1 Preparo de extrato de tecido de aorta

As amostras de aorta eram pesadas, colocadas em tubo *ependorf* e para cada 0,08g de tecido eram acrescentados 150µL do tampão de extração (CaCl₂ 10

mM, Tris 20 mM pH 7.4, Fenantrolina 1 mM, PMSF 1 mM, NEM 1 mM). As amostras eram trituradas com o uso do politron. Eram acrescentados mais 150 μ L do tampão de extração ao término da trituração e esta suspensão era colocada no vortex para homogeneizar. Estas amostras eram colocadas no gelo, dentro da geladeira por no mínimo 16 horas para ocorrer o processo de extração das proteínas do tecido.

Após este período, as amostras eram centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante retirado e armazenado em dois tubos *ependorf* devidamente rotulados no freezer a - 20 °C. Um destes tubos era utilizado para dosagem de proteínas pelo método de *Lowry* e o outro tubo era utilizado para determinar a atividade das metaloproteinases.

5.7.2 Dosagem de proteínas: método de Lowry

Foi necessária a determinação da quantidade de proteínas de todas as amostras, pois a quantidade de proteínas presente na aorta dos ratos varia entre um animal e outro, podendo interferir nos resultados. Assim sendo, a quantidade de cada amostra aplicada no gel foi referente a 40 μ g de proteína.

A dosagem de proteínas totais era feita baseada no método de Lowry et al., (1951). Assim sendo, antes da dosagem das proteínas as amostras eram diluídas em água MILI-Q para que as concentrações de proteínas presentes nas amostras ficassem dentro dos pontos da curva de calibração (intervalo de 0,125–4mg de proteínas). Para a construção da curva de calibração, era utilizada a soro albumina bovina (BSA) com concentração de proteína conhecida de 3 mg/mL (diluído em água MILI-Q e solução tampão de extração (1:2:1)) e um padrão BSA de 8 mg/mL (diluído em água MILI-Q e tampão de extração (1:0,5:0,5)).

Através do BSA de 8mg/mL as seguintes soluções eram feitas: 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 mg/mL, sendo estas soluções os pontos da curva de calibração. Em microplacas eram aplicadas: 20µL de solução NaOH 1 N/ Triton 0,02 %, 10µL das amostras e as soluções preparadas para a curva de calibração. Além disso, também eram aplicados 200 µL de solução de tartarato e 20 µL da solução de Folin. Estas soluções eram misturadas com auxílio de uma pipeta e após 30 minutos eram lidas em um espectrofotômetro a 750nm. Era construída uma curva de calibração através da obtenção dos valores fornecidos pelo aparelho, possibilitando a determinação da quantidade de proteínas presente nas amostras para aplicação de 40mg de proteínas em cada amostra no gel.

5.7.3 Eletroforese de gel de poliacrilamida a 12%:

As amostras preparadas eram separadas por eletroforese em um sistema descontínuo de tampões, conforme a técnica de SDS-PAGE (anexo C), em géis preparados em concentração de 12 % de poliacrilamida, contendo 1 % gelatina.

Após a corrida, os géis eram submetidos a dois banhos de Triton X-100 (a 2,5 % em água) para remover o SDS e, em seguida, permaneciam submersos durante 16 horas em solução de Tris-HCl a 50 mM (pH 7,4), contendo CaCl₂ a 10mM, à temperatura de 37°C. Em seguida, os géis eram fixados e corados com solução de Coomassie Blue (metanol 30 %, ácido acético 5%, Coomassie Blue G- 250 0,05%) por 4 horas, sendo em seguida, descorados até a visualização das bandas características da atividade de MMPs: bandas claras contra um fundo azul escuro (devido à coloração da gelatina incorporada ao gel preparado).

5.7.4 Determinação da atividade das metaloproteinases:

A determinação da atividade era feita através do perfil das bandas que podiam ser visualizadas após coloração com Cromassie Blue.

A atividade das enzimas era determinada por análise densitométrica usando um sistema de documentação (Kodak Eletrophoresis Documentation and Analysis System- EDAS 290; Kodak, Rochester, NY). As formas latente e ativa das MMP-2 e MMP-9 eram identificadas através de suas massas moleculares 72 KDa, 64 KDa, 92 KDa e 87 KDa, respectivamente (GERLACH et al., 2007). Após a quantificação das bandas através deste programa, o valor do padrão de cada gel foi dividido pelo valor das bandas do mesmo gel e os dados obtidos, foram então avaliados estatisticamente.

5.8 Zimografia *in situ*

Esta análise era realizada para verificar o total de atividade gelatinolítica nos tecidos de todos os grupos deste estudo. As aortas eram congeladas em Tissue Tek® O.C.T. Compound (Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA, EUA) e isopentano e colocadas em nitrogênio líquido. Cortes de 5µm de espessura em criostato Microm 505E (Microm International GmbH, Walldorf, Alemanha) eram obtidos e dispostos em lâminas tratadas com poli-L-Lisina (P8920, Sigma, St. Louis, MO, EUA). A zimografia *in situ* era realizada de acordo com o método proposto por Galis *et al.*, (1994) com algumas modificações. Primeiramente, as lâminas (Super Frost) com os cortes congelados eram cobertas por substrato DQ gelatina (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA) diluído 1:20 em Tris/HCL (50mmol/, pH 7,4) contendo 10 mmol/CaCl₂. Todos os passos eram realizados no escuro. As lâminas eram incubadas no interior de uma câmara úmida a temperatura ambiente por 1

hora. Após a incubação, as lâminas eram lavadas por 5 vezes com PBS, fixadas em paraformaldeído a 4% por 10 minutos, lavadas mais uma vez com PBS, sendo então montadas com lamínulas, para serem visualizadas e fotografadas. Para quantificação da atividade gelatinolítica das MMPs, era utilizado o programa Leica Qwin (Leica Imaging Systems Ltd, Cambridge, Inglaterra) em conjunto com um microscópio Leica (Leica DMR, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemanha), videocâmara (Leica DC300F, Leica Microsystems AG, Heebrugg, Suíça) e um computador *on-line*. A quantificação da fluorescência era feita em pixels por área.

5.9 Análise estatística

Para comparações dos dados da zimografia (convencional e *in situ*) e da morfometria, foi utilizada análise de variância (ANOVA) e pós-teste de *Newman-Keuls* para múltiplas comparações. O nível de significância escolhido foi de 5% e os dados apresentados como média \pm desvio padrão da média. Para análise dos resultados da inflamação, foi utilizada correlação não-linear *Spearman* com objetivo de correlacionar inflamação, diâmetro e espessamento da parede aórtica, com nível de significância de 5%. Os dados foram analisados utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 4 (Graph Pad Software In., San Diego, Califórnia, EUA). Foi utilizada regressão linear multivariada através do programa estatístico *winstat* 3.1 para análise de fatores que possivelmente influenciam na expansão do diâmetro aórtico, realizado pelo Prof. Dr. Konradin Metze, Departamento de anatomia patológica da Universidade Estadual de Campinas – São Paulo-UNICAMP.

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Doppler

A avaliação através do ultrassom com Doppler colorido demonstrou a presença de fluxo laminar nas aortas do grupo *Sham* e Lesão, representado pela coloração vermelho-alaranjada (Figura 2A), sendo o espectro deste fluxo caracterizado por uma janela sistólica “limpa”. Nos animais do grupo Estenose, o fluxo laminar estava preservado no segmento logo imediatamente adjacente à estenose e no segmento pós-estenótico, um turbilhonamento no fluxo sanguíneo foi registrado pelo Doppler colorido, representado por uma mistura de cores azul, verde, amarelo e laranja (Figura 2B). O espectro deste fluxo foi caracterizado pelo borramento da janela sistólica, que significa pouca resistência no segmento pré-estenótico, enquanto caracteriza fluxo turbulento no segmento pós-estenótico.

No grupo AAA, o Doppler demonstrou fluxo sanguíneo com velocidade aumentada no segmento pré-estenótico, acompanhada de turbilhonamento no lúmen do aneurisma, representado por uma mistura de cores. No segmento pós-estenótico, a velocidade do fluxo era menor quando comparada ao segmento pré-estenótico (Figura 2C e D).

A estenose extrínseca de 80% na aorta gera uma alteração na geometria do vaso provocando distúrbios hemodinâmicos. Dados da literatura (CHENG et al., 2006; PRADO et al., 2006; NESBITT et al., 2000) mostram que essas alterações provocam aumento na tensão de cisalhamento resultando em diminuição do fluxo sanguíneo com conseqüente turbulência e oscilação do fluxo (Figura 3).

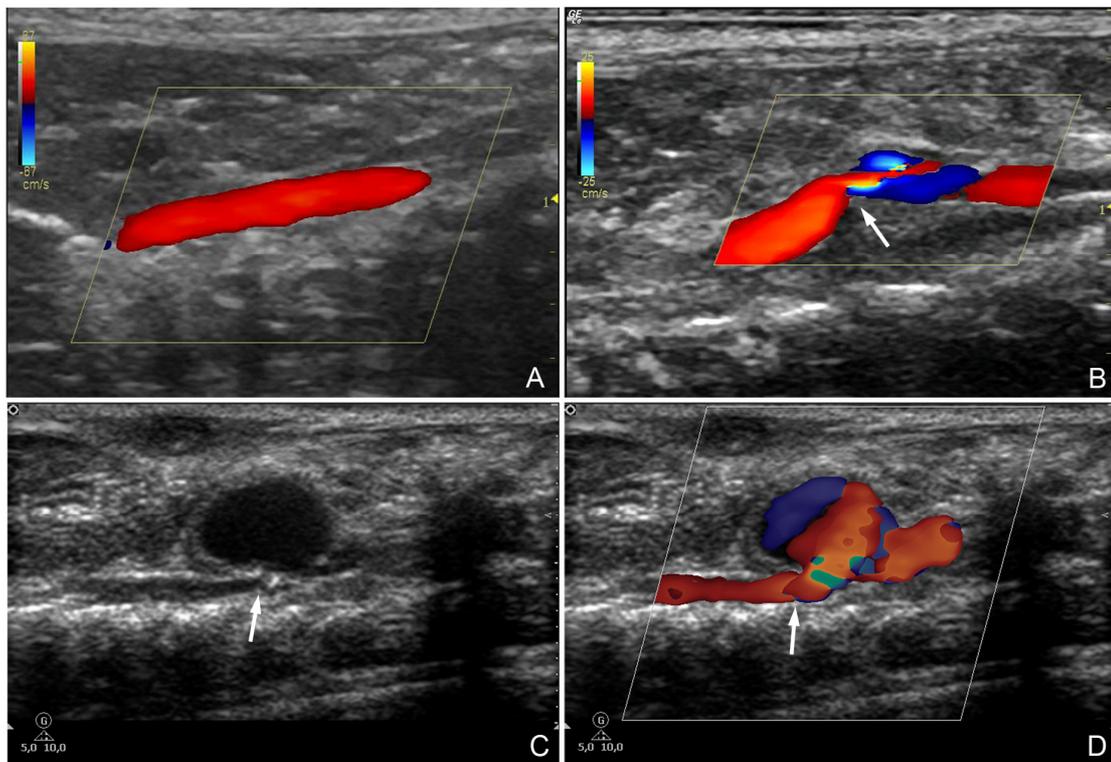


Figura 2. Avaliação do fluxo sanguíneo através do ultrassom com Doppler colorido. As aortas dos animais do grupo Lesão e Sham não demonstraram alterações no fluxo laminar (coloração vermelho-alaranjada, **A**). Nos animais estenosados, além do local da estenose (seta), ficou bem demonstrado o turbilhonamento no segmento pós-estenótico (mistura de cores azul, verde e vermelho-alaranjado, **B**) e a permanência do fluxo laminar no segmento pré-estenótico. No grupo AAA, logo após o ponto estenosado (seta), há formação de aneurismas verdadeiros, gerando turbilhonamento do fluxo em seu interior (mistura de cores verde, azul e vermelho-alaranjado, **C** e **D**).

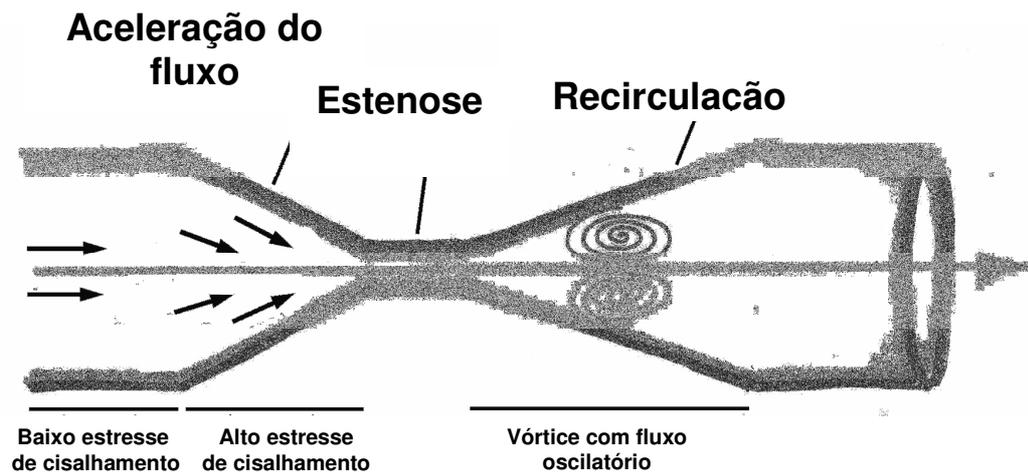


Figura 3. Representação esquemática do estresse de cisalhamento induzido pela estenose. Notar a formação de fluxo turbulento no segmento pós-estenótico, condição associada a liberação de mediadores inflamatórios (modificado de CHENG et al., 2006).

6.2 Estudo morfológico

6.2.1 Macroscopia

A formação de aneurismas foi detectada em 60 a 70% dos animais do grupo experimental (grupo AAA). Os aneurismas eram saculares, tendo sua formação limitada à área previamente lesada e estenosada pelo procedimento. O maior diâmetro transversal dos aneurismas variou entre 6 e 11mm (média $8 \pm 1,6$ mm; $P < 0,001$) no 3º pós operatório e entre 6 e 13mm (média $8,6 \pm 2,2$ mm; $P < 0,001$) no 7º dia pós operatório, sendo aproximadamente 7 a 8 vezes maior que o diâmetro normal da aorta (Tabela 1; Figura 4). Quando seccionados, os aneurismas continham aumento da espessura da parede, muitas vezes contendo trombos recentes na luz arterial, contrastando com o aspecto normal das zonas contíguas à dilatação. Essas alterações não foram observadas nos demais grupos.

Tabela 1: Diâmetro aórtico dos animais dos grupos AAA, Lesão, Estenose e Sham em ambos os dias de pós-operatório

	DIÂMETRO (mm)			
	AAA	Lesão	Estenose	Sham
3 Dias	$8 \pm 1,6$	$1,7 \pm 0,2^{***}$	$1,6 \pm 0,2^{***}$	$1,6 \pm 0,1^{***}$
7 Dias	$8,6 \pm 2,4$	$1,9 \pm 0,2^{***}$	$2,0 \pm 0,2^{***}$	$2,0 \pm 0,1^{***}$

Os dados são a média \pm desvio padrão. *** $P < 0,001$ para o grupo AAA versus demais grupos.

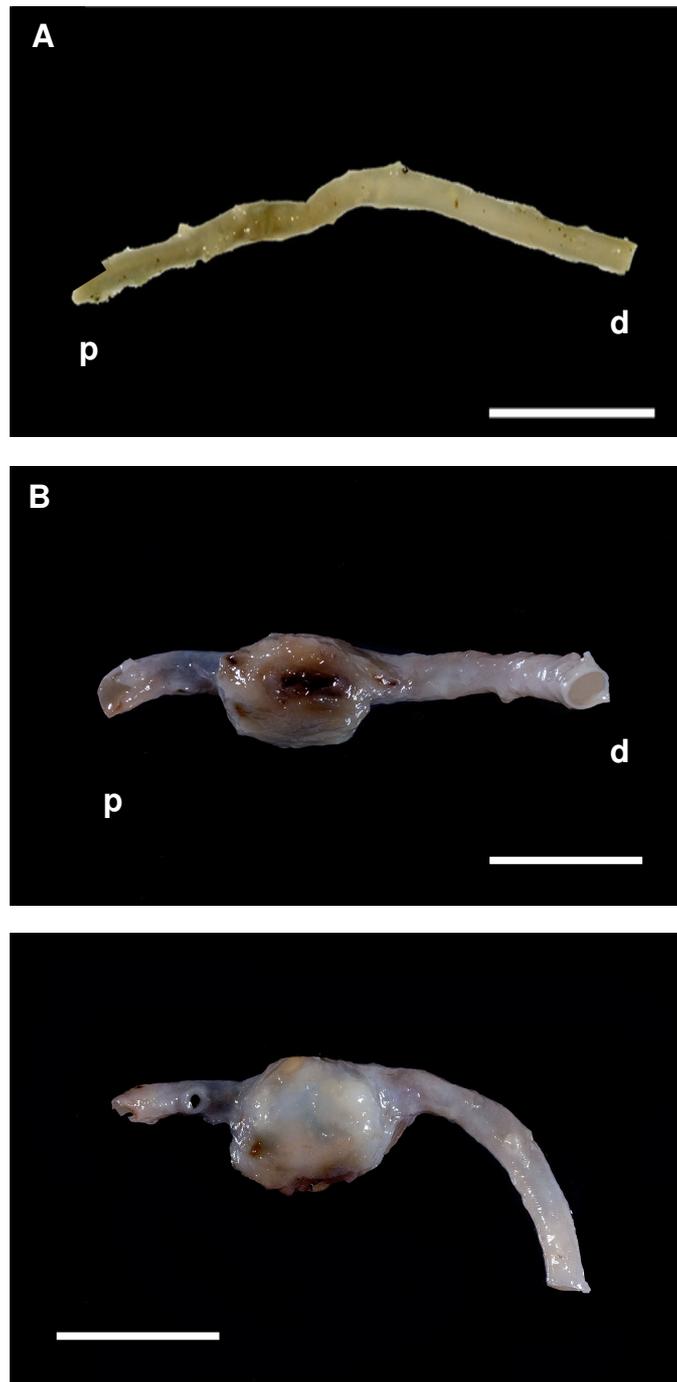


Figura 4. Estudo macroscópico e morfológico das aortas dos animais dos grupos AAA, Lesão, Estenose e Sham. Figuras representativas das aortas dos grupos Lesão, Estenose, Lesão e Sham (**A**); Aneurismas saculares no 3^o (**B**) e 7^o (**C**) dias de p.o. Onde, AAA: Aneurisma da Aorta Abdominal; p: proximal, d: distal; Barra = 1cm.

6.2.2 Microscopia

Microscopicamente, os aneurismas apresentaram alterações estruturais na parede, quando comparados com os grupos controles (Lesão e Estenose) e *Sham* (Figura 5A, B e C). No 3º dia de pós-operatório, a parede dos aneurismas apresentou extensa remodelagem, caracterizada por degeneração da matriz extracelular e substituição da parede aórtica normal por tecido de granulação com neovascularização e deposição de colágeno (Figura 5D, E e F). Havia destruição maciça das fibras elásticas, observada em toda circunferência do aneurisma. Essas alterações foram associadas a uma intensa resposta inflamatória composta por neutrófilos, macrófagos, linfócitos e, ocasionalmente, focos de microcalcificações. Fibrina e/ou trombos foram observados no interior do vaso. No 7º dia de pós-operatório, as alterações foram semelhantes às encontradas no 3º dia, porém com maior espessamento da parede aórtica e colágeno mais evidente (Figuras 5 G, H e I). Os grupos controles e *Sham* apresentaram preservação morfológica das fibras elásticas, sem alteração da arquitetura da parede aórtica em ambos os dias pós-operatórios estudados. A destruição da parede aórtica dos grupos AAAs em ambos os dias de p.o., podem ser visualizadas na figura 6.

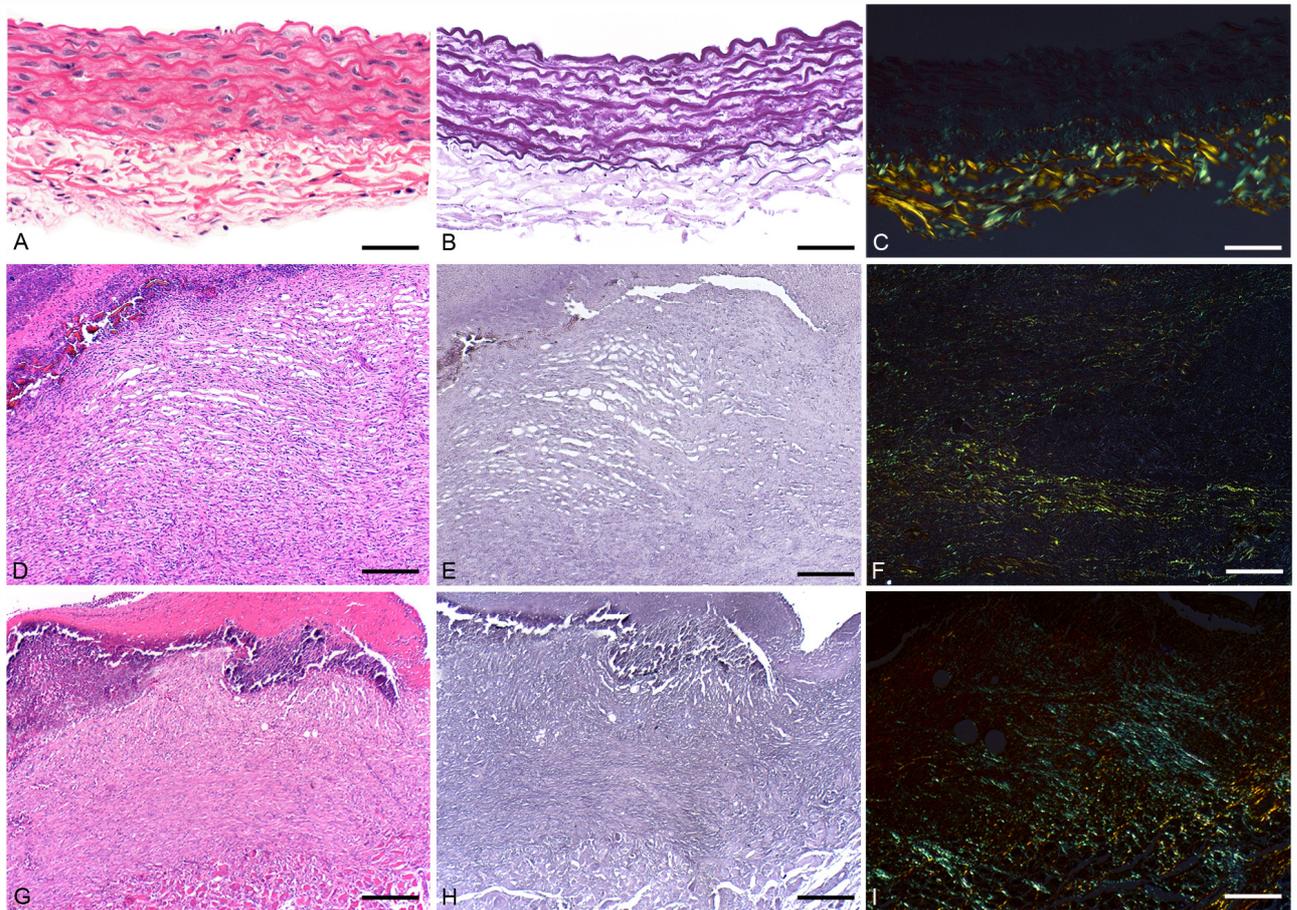


Figura 5. Fotomicrografia representativa da histopatologia da aorta abdominal dos animais dos grupos Lesão, Estenose e Sham (**A**, **B** e **C**), sem a presença de dilatações na parede aórtica; Barra=45 μ m. Imagens representativas dos aneurismas do grupo AAA no 3^o p.o. Notar o extenso remodelamento na parede vascular acompanhado de infiltrado inflamatório (**D**), destruição maciça de fibras elásticas (**E**) e deposição de colágeno (**F**); Barra = 110 μ m. Imagens representativas dos aneurismas do grupo AAA no 7^o dia p.o. Os aneurismas observados no 7^o p.o apresentaram alterações semelhantes às encontradas no 3^o p.o. (**G**, **H**), diferenciando apenas por maior espessamento e maior deposição de colágeno na parede do aneurisma (**I**); Barra = 135 μ m.

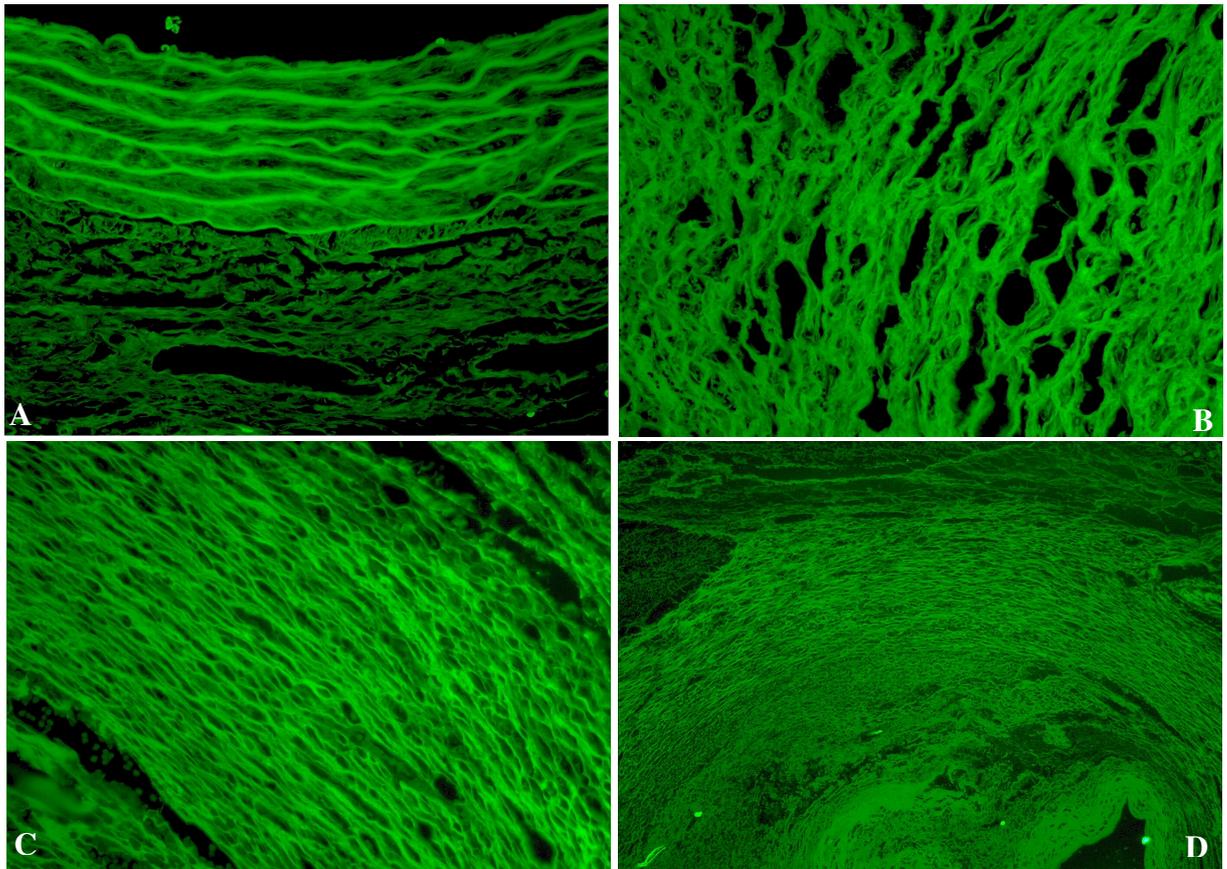


Figura 6. Fotomicrografia da auto-fluorescência das aortas dos grupos AAA, Lesão, Estenose e Sham, visualizadas em microscópio óptico nas lâminas coradas com HE. A parede aórtica nos grupos Lesão, Estenose e Sham (A) apresentou-se inalterada, em ambos os dias de p.o. Entretanto, observa-se degradação associada a uma desorganização da parede aórtica dos animais com aneurismas no 3º (B) e 7º (C e D) p.o., porém, essa degradação está mais acentuada no 3º p.o. enquanto que no 7º observa-se extenso remodelamento da camada média. Aumentos originais: 400× (A, B e C) e 100× (D). AAA: Aneurisma da Aorta Abdominal; p.o.: pós-operatório.

6.3 Análise morfométrica

Os valores médios obtidos na análise morfométrica, estão presentes na tabela 2. Na análise da camada média das aortas, observou-se espessamento da parede em ambos os dias estudados no grupo AAA, quando comparada aos grupos Lesão, Estenose e *Sham* ($P < 0,001$ para grupo AAA versus demais grupos). Por outro lado, não havia presença de espessamento da camada média nas aortas dos grupos controles e *Sham* (Figuras 7A e B).

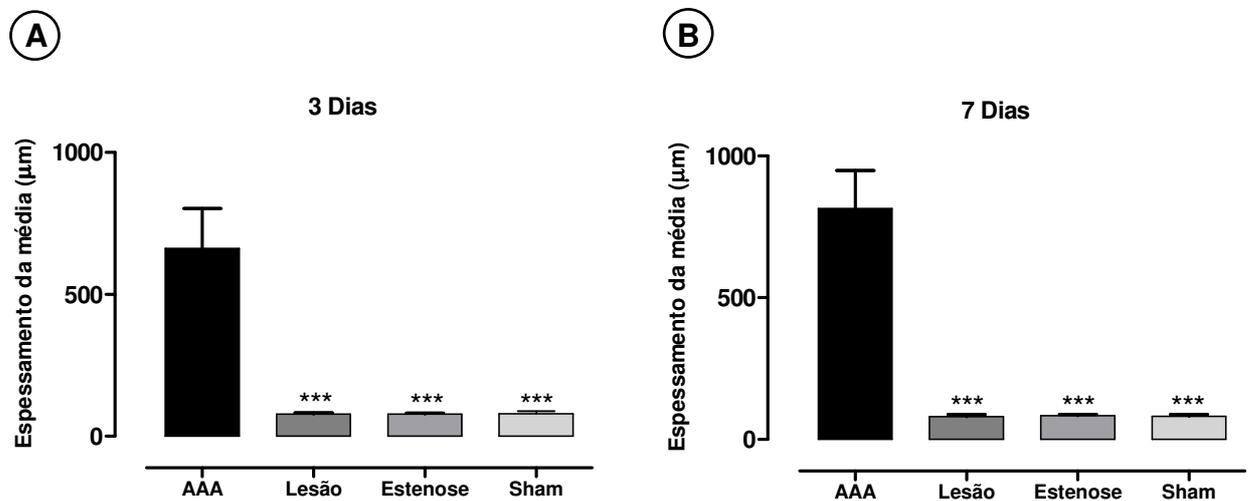


Figura 7. Gráfico representativo do espessamento da parede aórtica nos grupos AAA, Lesão, Estenose e Sham. Observa-se o espessamento significativo da parede no grupo AAA, comparado com os grupos Lesão, Estenose e Sham ($***P < 0,001$ para o grupo AAA versus os demais grupos), em ambos os dias de p.o. (A e B). Os dados são a média \pm desvio padrão. AAA: Aneurisma de aorta abdominal; p.o.: pós-operatório.

Tabela 1: Percentual de fibras elásticas (%), colágeno(%) e mensuração do espessamento da camada média (μm) nos grupos AAA, Lesão, Estenose e Sham-operados, em ambos os dias de pós-operatório

	3 Dias			7 Dias		
	Fibras elásticas	Colágeno	Espessamento da média	Fibras elásticas	Colágeno	Espessamento da média
AAA	1,2 \pm 0,8	15 \pm 4	579 \pm 140	1,2 \pm 0,8	14 \pm 4,0	814 \pm 133
Lesão	7,6 \pm 0,5	9 \pm 1,2	78 \pm 5	7 \pm 1,0	9 \pm 2,1	81 \pm 7
Estenose	7,2 \pm 0,4	8 \pm 1,3	78 \pm 4	8 \pm 1,4	10 \pm 1	83 \pm 5,1
Sham	8,2 \pm 0,7	8 \pm 0,77	79 \pm 9,5	7,1 \pm 0,6	10 \pm 2,3	82 \pm 6,4

Os dados são a média \pm desvio padrão. $***P < 0,001$ (grupo AAA versus demais grupos)

Em relação ao percentual de fibras elásticas, todos os animais do grupo AAA continham menor quantidade de fibras elásticas, com redução acentuada quando comparadas aos outros grupos em ambos os dias analisados. Esta diferença foi estatisticamente significativa com $P < 0,001$ (Figuras 8A e B). Em contraste, houve um aumento no percentual de colágeno no grupo AAA quando comparados aos grupos controles (Lesão e Estenose) e *Sham*, em ambos os dias de p.o. Embora, proporcionalmente maior no 3º dia p.o., o colágeno apresentava-se mais espesso e definido no 7º dia p.o. (Figuras 9A e B).

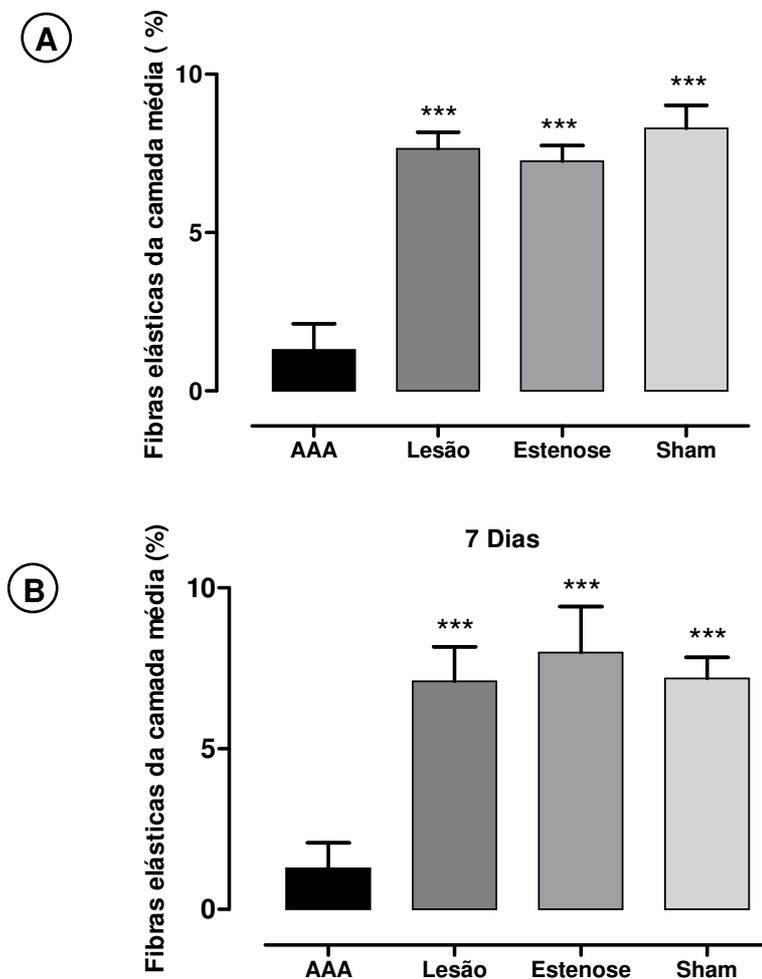


Figura 8. Gráfico representativo do percentual de fibras elásticas nas aortas dos grupos AAA, Lesão, Estenose e Sham, em ambos dias de p.o. Notar a diminuição significativa no percentual de fibras elásticas no grupo AAA (A e B), comparado com os grupos controles e Sham ($***P < 0,001$ grupo AAA versus os demais grupos). Os dados são a média \pm desvio padrão. AAA: Aneurisma de aorta abdominal; p.o.: pós-operatório.

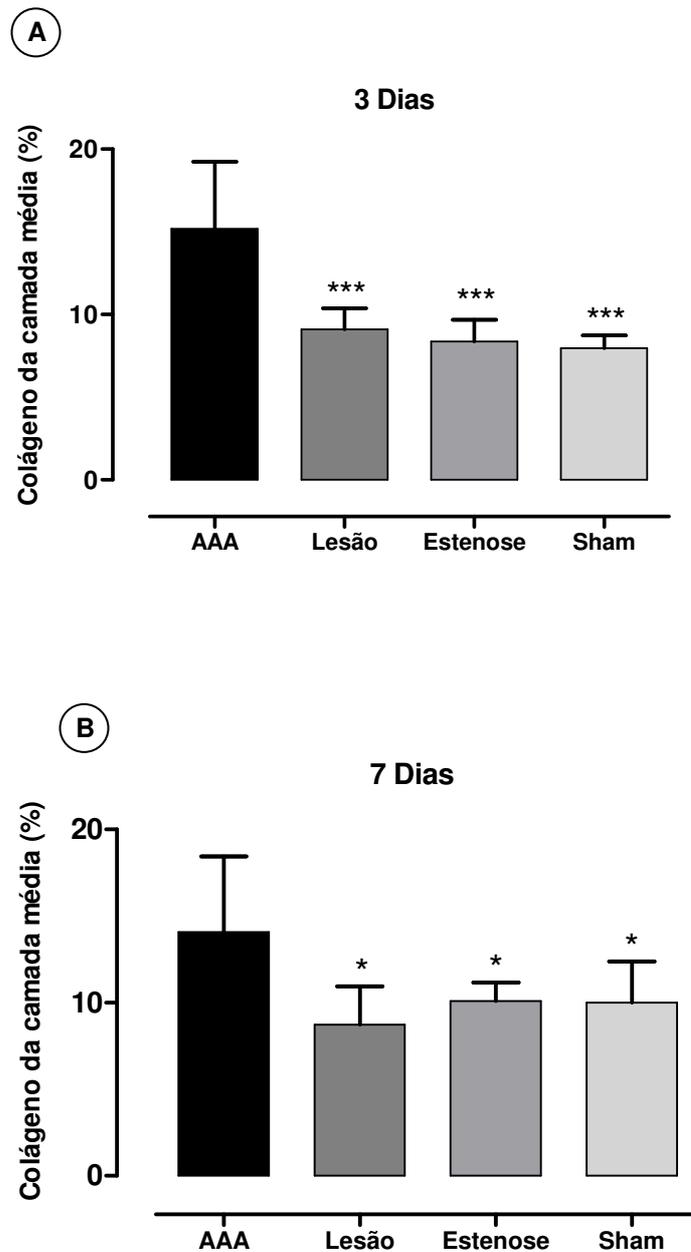


Figura 9. Gráfico representativo do percentual de colágeno nas aortas dos grupos AAA, Lesão, Estenose e Sham. Observa-se um aumento significativo no percentual de colágeno no grupo AAA no 3^o e 7^o p.o, com *** $P < 0,001$ e * $P < 0,05$ (grupo AAA versus demais grupos), respectivamente. Os dados são a média \pm desvio padrão. AAA: Aneurisma de aorta abdominal; p.o.: pós-operatório.

6.4 Avaliação da resposta inflamatória

Para determinar a severidade da inflamação na parede aórtica, foram utilizados dois parâmetros diferentes em todos os grupos deste estudo. A correlação entre os diâmetros e o grau de inflamação da parede aórtica foi claramente positiva em ambos os dias de p.o., confirmada através da realização da correlação não-linear *Spearman* ($r = 0,81$ no 3° e $r = 0,91$ no 7° dia p.o., $P < 0,0001$) (Figura 10A e B).

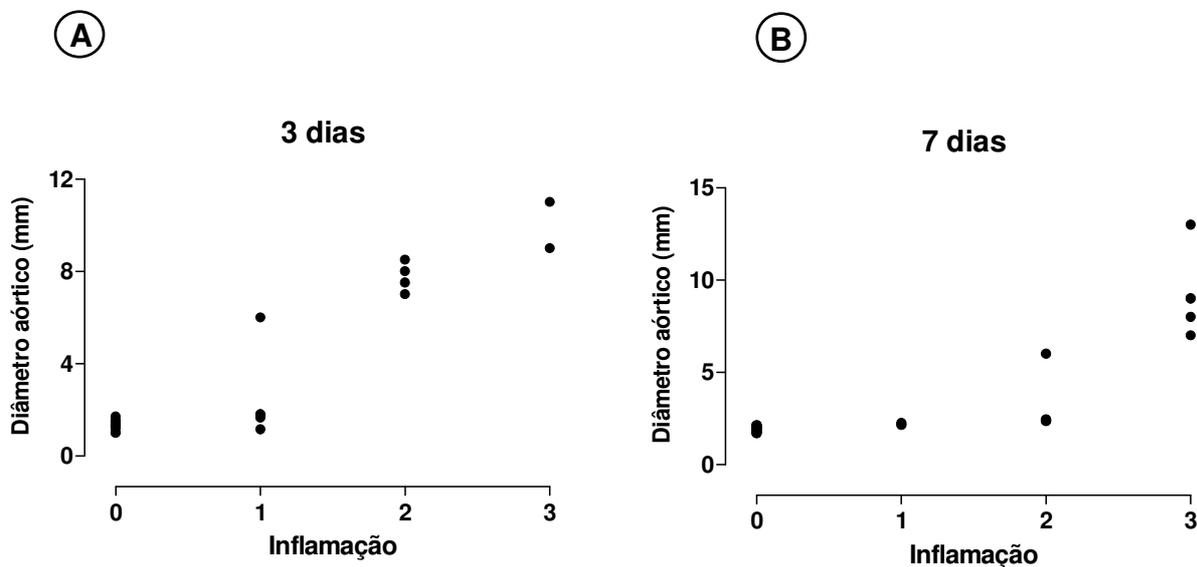


Figura 10. Gráfico representativo da correlação entre os diâmetros e o grau do processo inflamatório nas aortas dos grupos AAA, Lesão, Estenose e Sham. Os pontos representam os dados do diâmetro da aorta correlacionados com a inflamação em cada animal individualmente. A escala utilizada para analisar o grau de inflamação foi de 0 (sem inflamação) e 3 (inflamação severa). Notar a correlação positiva entre a dilatação das aortas e a severidade do processo inflamatório, em ambos os dias de p.o. ($P < 0,001$ grupo AAA versus demais grupos). AAA: aneurisma da aorta abdominal; p.o.: pós-operatório.

A correlação entre o diâmetro e o espessamento da parede aórtica foi positiva, apresentando uma medida indireta em relação à inflamação, em ambos os dias de p.o. ($r = 0,97$ e $r = 0,93$ no 3º e 7º dias p.o.; $P < 0,0001$) (Figuras 11A e B).

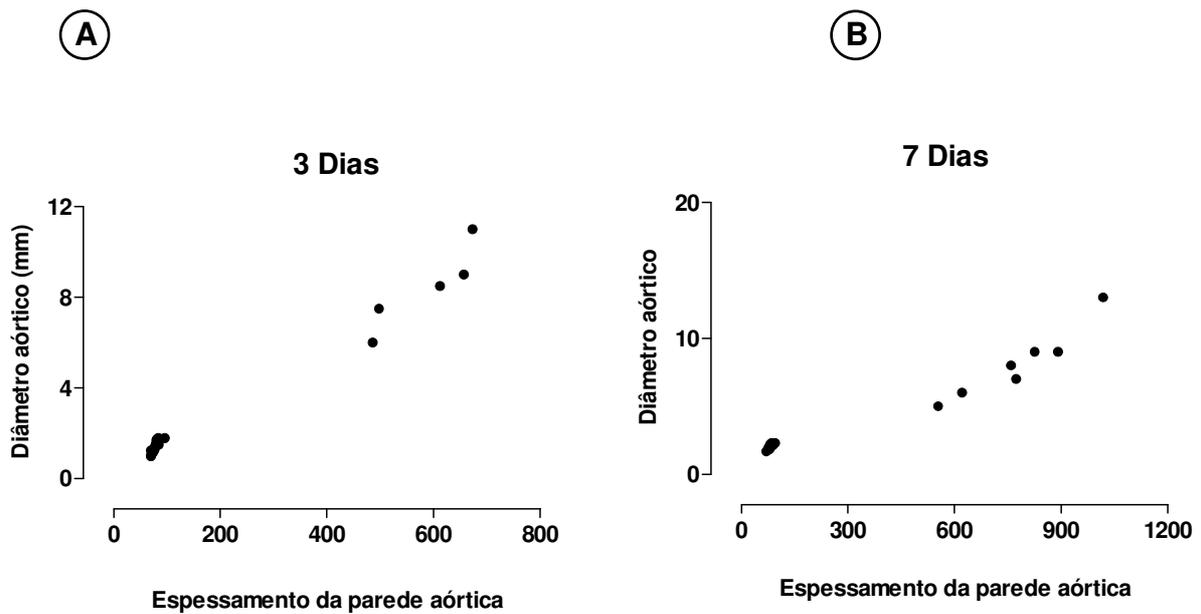


Figura 11. Gráfico representativo da correlação entre o diâmetro e o espessamento da parede aórtica nos grupos AAA, Lesão, Estenose e Sham. Os pontos representam os dados do diâmetro da aorta correlacionados com o espessamento da parede em cada animal individualmente. Notar a correlação positiva entre a dilatação e o espessamento da parede aórtica, em ambos os dias de p.o ($P < 0,001$ para o grupo AAA versus demais grupos). AAA: aneurisma de aorta abdominal; p.o.: pós-operatório.

6.5 Zimografia convencional

A zimografia foi utilizada para avaliar a atividade das MMPs na aorta dos grupos AAA, controles (Lesão e Estenose) e *Sham*. Quatro bandas com pesos moleculares de 92 kDa, 88 kDa, e 72 kDa e 64 kDa foram observados nos extratos das aortas. Os níveis da atividade da pró-MMP-9, MMP-9, pró-MMP-2 e MMP-2 foram comparadas entre os grupos AAA, controles e *Sham*.

As figuras 12A e 13A consistem em um zimograma representativo do extrato de aortas de ratos, mostrando as bandas relativas à pró-MMP-9, pró-MMP-2 e MMP-2 ativa. No 3º dia de p.o., observamos a banda da pró-MMP-9 no zimograma, apenas no grupo AAA. Os seus níveis neste grupo foram significativamente maiores quando comparados aos grupos controles e *sham* ($P < 0,001$ para todos os grupos versus grupo AAA; Figura 12B). Embora a expressão de ambas as formas de MMP-2 estejam presentes tanto no grupo AAA como nos grupos Lesão, Estenose e *Sham*, no grupo AAA os níveis foram significativamente maiores ($P < 0,001$ para todos os grupos versus grupo AAA). Similarmente a pró-MMP-2, mostrou maior expressão no grupo AAA quando comparado com os grupos Lesão ($P < 0,01$) e *Sham* ($P < 0,001$; Figura 12 C), entretanto esta diferença não foi observada entre o grupo Estenose e AAA (Figura 12D).

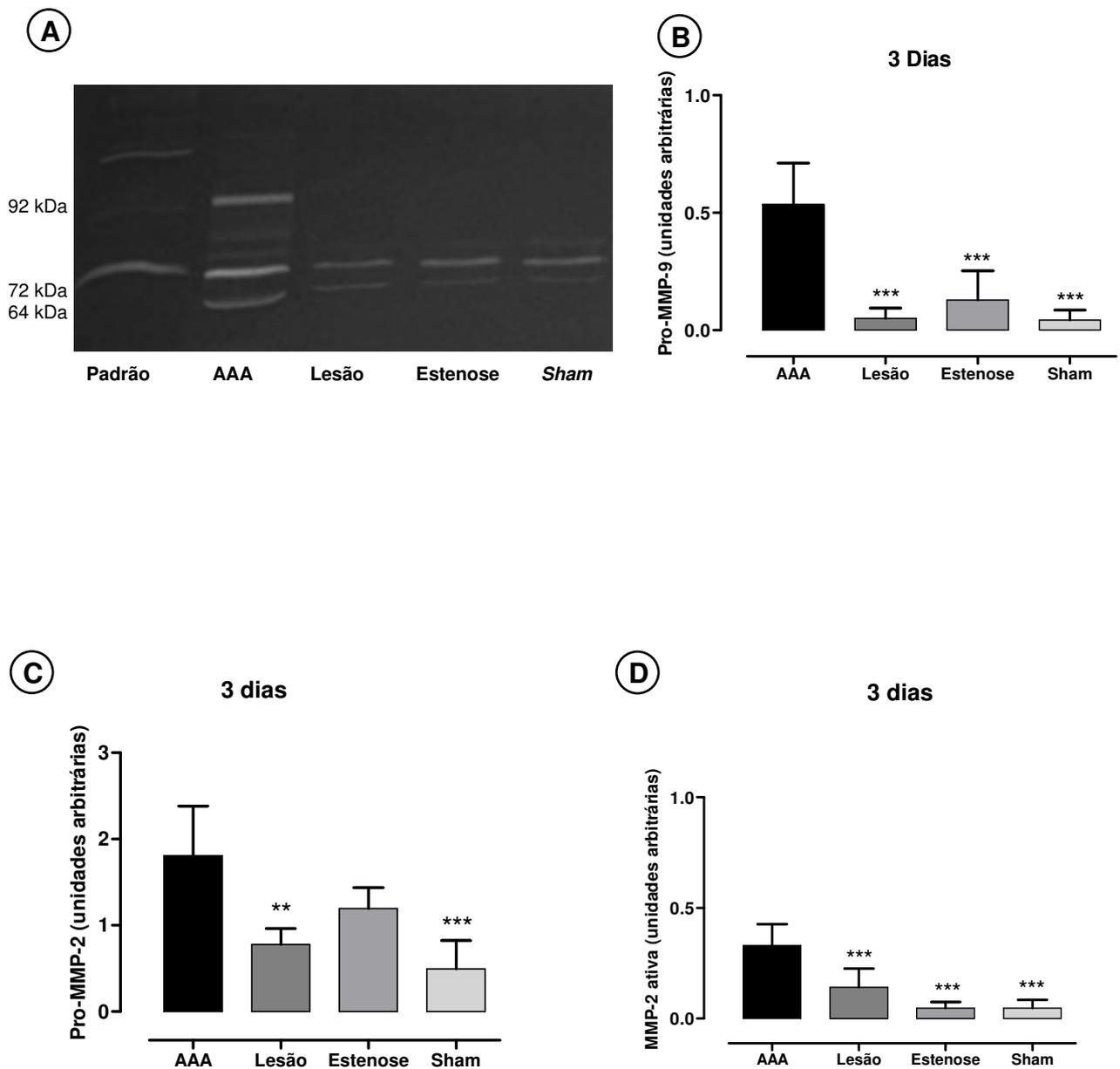


Figura 12. (A) Zimograma representativo da pró-MMP-9 (92kDa), pró-MMP-2 (72kDa) e MMP-2 (64kDa), no 3º dia p.o. Observa-se a expressão de ambas as formas de MMP-2 em todos os grupos, porém com aumento significativo no grupo AAA. Em relação à pró-MMP-9, sua expressão está presente apenas no grupo AAA. Gráfico demonstrativo da análise densitométrica das respectivas bandas (B, C e D), demonstrando um significativo aumento na expressão da pró-MMP-9, e em ambas as formas de MMP-2 no grupo AAA (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; para o grupo AAA versus demais grupos). Não foi observada diferença estatística entre o grupo Estenose e AAA em relação à pró-MMP-2. Os dados são a média \pm desvio padrão. AAA:aneurisma da aorta abdominal; p.o.: pós-operatório.

No 7º dia p.o., encontramos a MMP-9 ativa apenas no grupo AAA contrastando com a total falta de expressão nos demais grupos (Figura 13A), porém esta banda não foi quantificada. A banda da pró-MMP-9 foi observada no zimograma apenas no grupo AAA. Os seus níveis neste grupo foram significativamente maiores quando comparadas aos grupos controles (Lesão e Estenose) e *Sham*, com $P < 0,001$ para todos os grupos (Figura 13B). Ambas as formas da MMP-2 apresentaram expressão tanto nos grupos controles, quanto no grupo AAA sendo significativa apenas neste último grupo ($P < 0,001$ e $P < 0,05$ para todos os grupos em relação ao grupo AAA; pró-MMP-2 e MMP-2 ativa, respectivamente; Figura 13C e D).

Comparando-se as análises densitométricas do 3º e 7º p.o., observa-se um aumento progressivo na expressão da pró-MMP-9 e em ambas as formas de MMP-2 no grupo AAA do 3º e 7º p.o. No grupo Estenose foi observada uma diminuição significativa na expressão da pró-MMP-2 do 3º ao 7º p.o. ($P < 0,05$; Fig. 14). Nos demais grupos não houve diferença estatística.

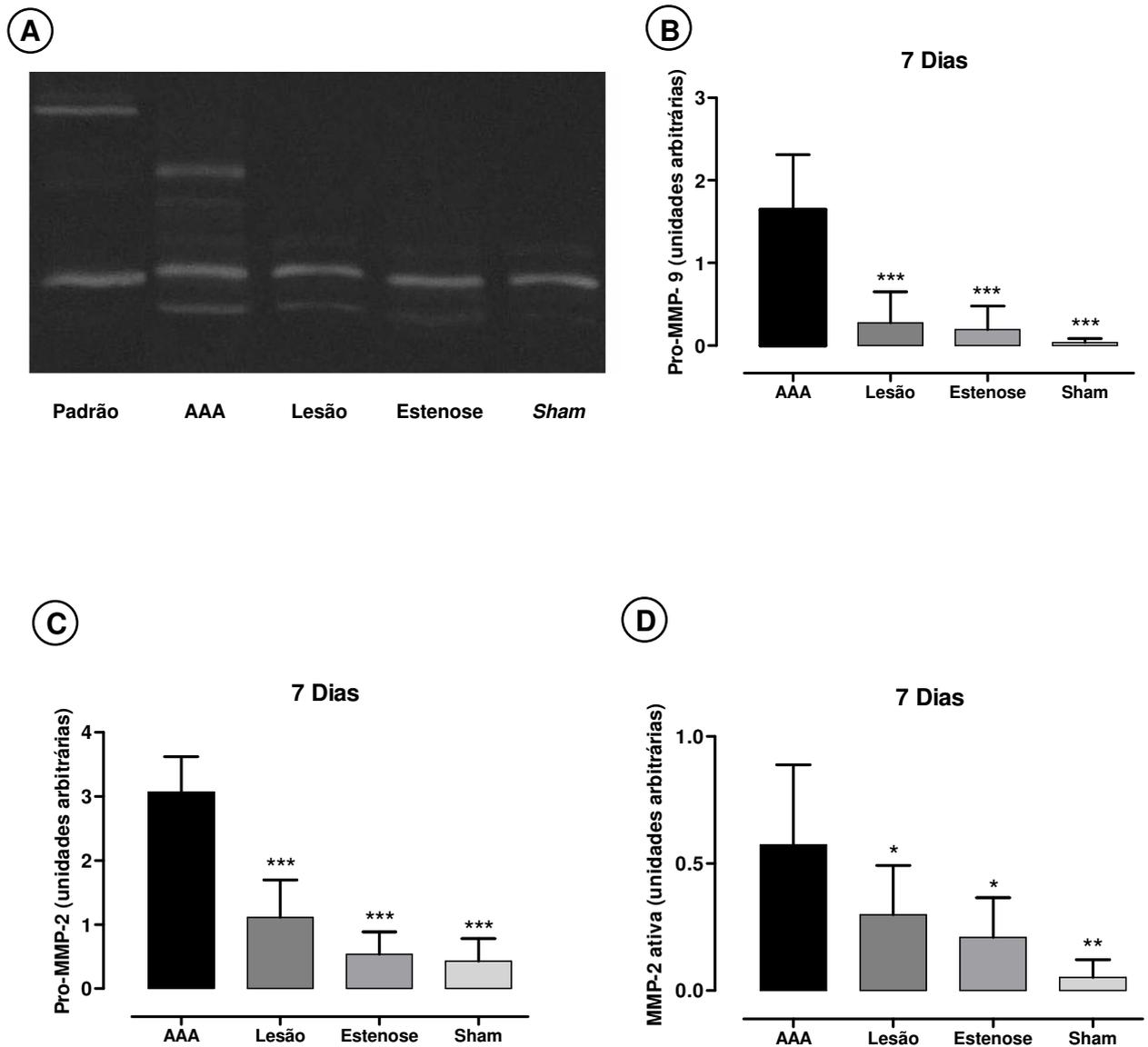


Figura 13. (A) Zimografia representativa da pró-MMP-9 (92kDa), MMP-9 (88kDa), pró-MMP-2 (72kDa) e MMP-2 (64kDa), no 7º dia p.o. Observa-se a expressão de ambas as formas de MMP-2 em todos os grupos, mas houve dos aumento apenas no grupo AAA. Entretanto a expressão de ambas as formas da MMP-9 é observada apenas no grupo AAA. Gráfico demonstrativo da análise densitométrica nas respectivas bandas (B, C e D), demonstrando um significativo aumento no grupo AAA em ambas as formas de MMP-2 e pró MMP-9 (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; para o grupo AAA versus demais grupos). Os dados são a média \pm desvio padrão. AAA: aneurisma de aorta abdominal; p.o: pós-operatório.

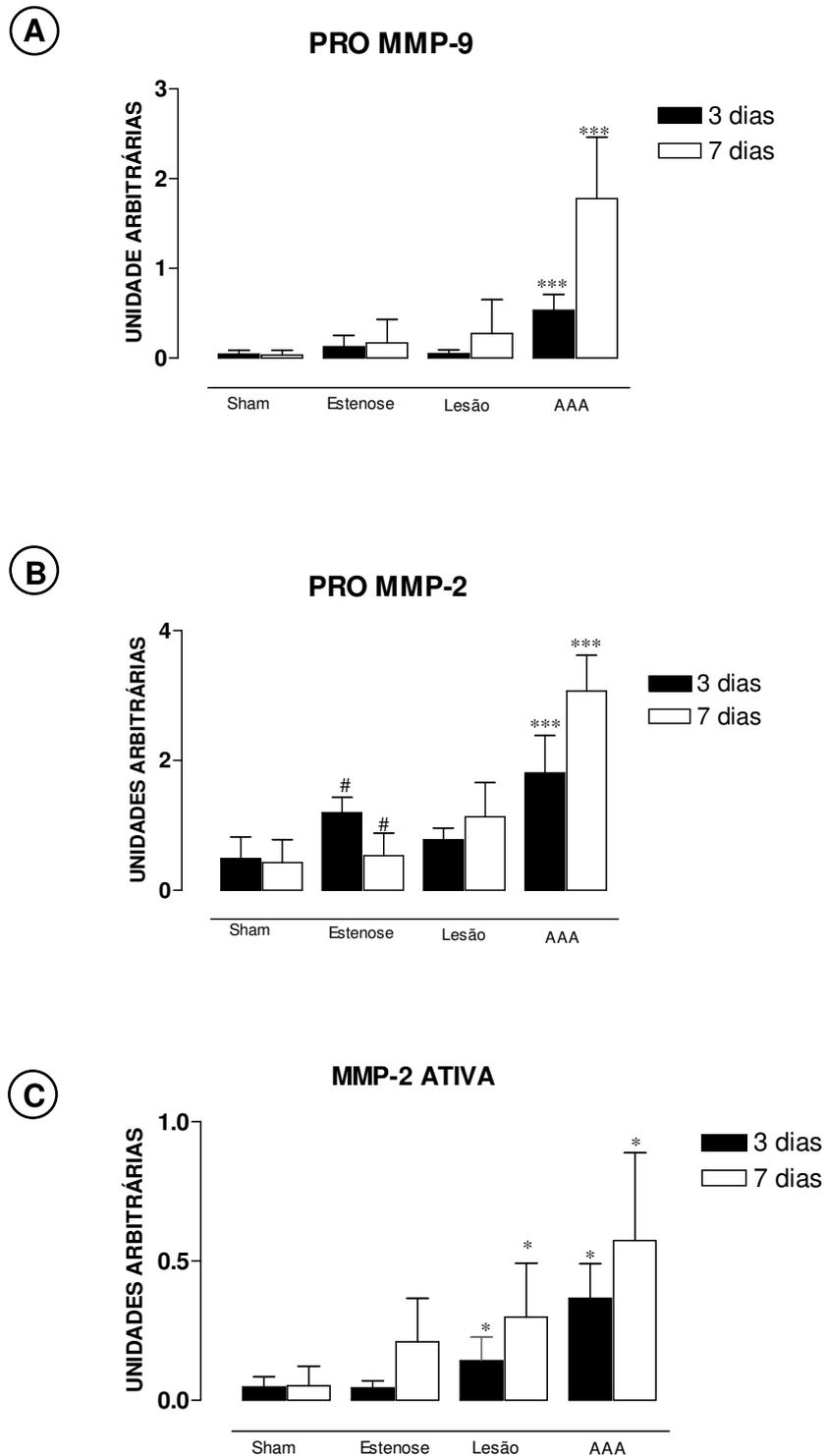


Figura 14. Análise densitométrica das bandas pró-MMP-9, pró-MMP-2 e MMP-2 ativa. Notar o aumento progressivo das bandas, do 3º ao 7º p.o. nos grupos AAAs. *** Representa diferença significativa entre o grupo AAA no 3º e 7º p.o. (**A**, **B** e **C**). No grupo da Estenose, houve diminuição na expressão da pró-MMP-2 do 3º ao 7º p.o. # Representa diferença significativa entre o grupo Estenose no 3º e 7º p.o. (**B**) ($P < 0,05$). Não houve diferença estatística entre os demais grupos. Os dados são a média \pm desvio padrão. AAA: aneurisma de aorta abdominal; p.o: pós-operatório.

6.6 Zimografia *in situ*

A zimografia *in situ* revela a atividade gelatinolítica nas aortas dos animais de todos os grupos, particularmente na camada média (Figuras 15A, B e C). Através da quantificação da fluorescência, apenas o grupo AAA (em ambos os dias de pós-operatório) apresentou aumento da atividade gelatinolítica ($P < 0,001$; Figuras 15D e E), com degradação da parede aórtica, em ambos os dias de pós-operatório.

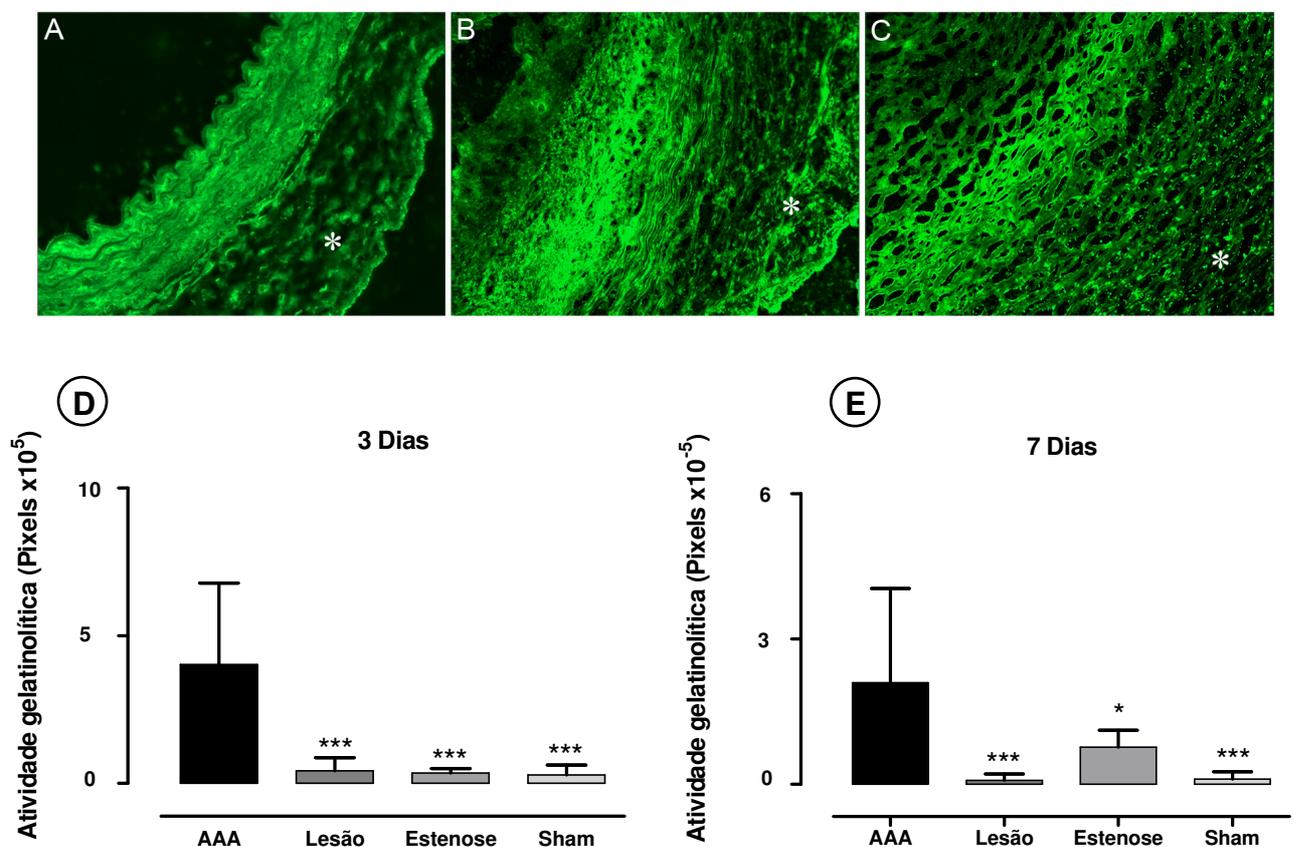


Figura 15. Fotomicrografia representativa da zimografia *in situ*, nos grupos AAA, Lesão, Estenose e Sham. A atividade gelatinolítica é caracterizada pela quantidade de fluorescência (pixels) na aorta, ou seja, quanto maior a fluorescência, maior a quantidade de gelatinase na parede aórtica. No grupo AAA, foi observada a degradação da parede do aneurisma (* **B** e **C**; áreas negras), em ambos os dias de p.o., respectivamente. Entretanto, nos demais grupos (**A**), a parede aórtica, permanece inalterada. Gráfico representativo da quantificação da fluorescência, sendo detectada maior quantidade de gelatinase na parede aórtica dos animais do grupo AAA (**D** e **E**) quando comparados aos demais grupos em ambos os dias de pós-operatório (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; grupo AAA versus demais grupos). Os dados são a média \pm desvio padrão. AAA: aneurisma da aorta abdominal; p.o.: pós-operatório.

Baseando-se nos valores da atividade enzimática (obtidos através da análise densitométrica: pró-MMP-9, pró MMP-2 e MMP-2 ativa), nos dias de pós-operatório, e tipo de cirurgia, foi utilizada uma regressão linear multivariada (desvio padrão: $0,05 \pm 0,10$) para analisar qual desses fatores tem maior influência na formação do aneurisma, obtendo a seguinte fórmula (Figuras 16 e 17):

Diâmetro aórtico = tipo de cirurgia + atividade relativa pró MMP-2 x 0,398 + atividade relativa da MMP-2 ativa x 3,45849 + 0,65937;

Tipo de cirurgia: = 5,20 para cirurgia do grupo AAA e 0,55 para a cirurgia do grupo sham; para os outros tipos de cirurgia = 0, com um coeficiente de determinação (corrigido) 0,944.

Após aplicação da fórmula, observou-se que a associação de ambas as formas da MMP-2 com o tipo de cirurgia, foram as principais responsáveis pela expansão dos aneurismas. A pró-MMP-9 está excluída nesta equação. Porém a regressão multivariada não exclui totalmente sua participação no desenvolvimento do AAA, mas ambas as formas de MMP-2 são influentes quando utilizamos este método estatístico. Outro forte argumento para essa interpretação é que no 3º p.o., os aneurismas já se formaram, enquanto há um aumento considerável entre o 3º e 7º p.o. na expressão da pró-MMP-9 (Figura 14).

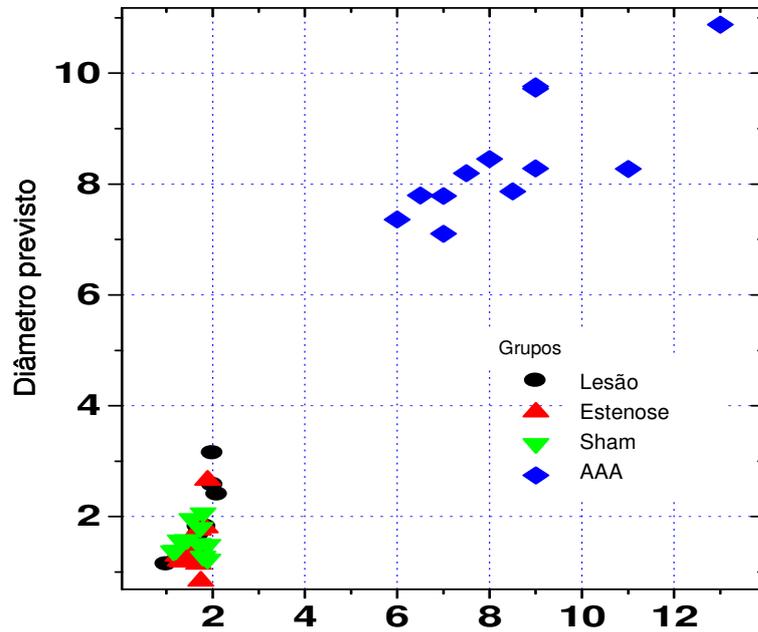


Figura 16. Relação entre os diâmetros aórticos previstos através da fórmula, com os diâmetros obtidos nos grupos AAA, Lesão, Estenose e Sham. AAA: aneurisma de aorta abdominal.

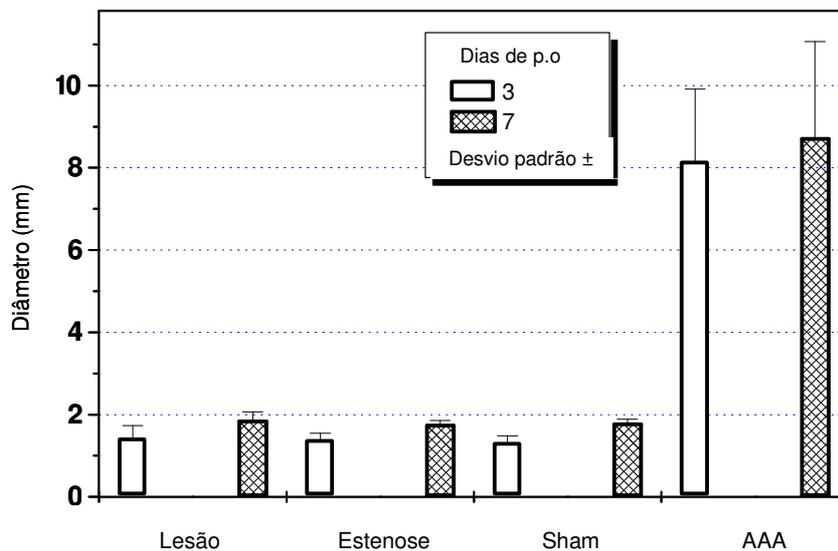


Figura 17. Diâmetros obtidos nos grupos Lesão, Estenose, Sham e AAA em ambos dias de p.o. AAA: aneurisma de aorta abdominal; p.o.: pós operatório

7. DISCUSSÃO

7. Discussão

O desenvolvimento de aneurismas na aorta abdominal é um processo complexo, envolvendo proteinases com importante atividade elastolítica, que interferem na síntese e degradação da matriz extracelular (MEC) da parede arterial. Nesse estudo, analisamos a participação de duas dessas proteinases, as metaloproteinases 2 e 9, utilizando um modelo experimental inédito de indução de aneurisma abdominal desenvolvido em nosso laboratório. Esse modelo, que propicia a formação de aneurismas saculares bem definidos e individualizados cerca de 8 vezes o diâmetro normal da aorta, é baseado na associação de duas causas potenciais de expressão e ativação de MMPs: lesão vascular e alteração do fluxo sanguíneo. Nossos resultados mostraram aumento da expressão de ambas as MMP-2 e MMP-9, no grupo AAA. A MMP-2, tanto na sua forma precursora quanto ativa, foi evidenciada tanto nos grupos controles e *Sham*, enquanto que a pró-MMP-9, apenas no grupo que desenvolveu aneurismas, sugerindo que as MMP-2 e 9 devem ser fundamentais para o desenvolvimento e progressão destes aneurismas.

As MMPs são endopeptidases cálcio-dependente, contendo zinco. Pelo menos 23 tipos têm sido identificados como uma família com capacidade de degradar todos os componentes da MEC, além de alguns substratos fora da MEC (ERNST, 1993; WHATLING; MCPHEAT; HURT-CAMEJO, 2004). Existem vários tipos de MMPs que são controladas em vários níveis distintos, incluindo a transcrição, ativação de zimógenos e a interação com inibidores teciduais específicos (TIMPs). Com relação ao remodelamento vascular, as MMPs 2 e 9 tem recebido atenção especial devido à sua expressão em células musculares lisas e leucócitos e à sua capacidade de degradar componentes da membrana basal e do colágeno. *In vitro*, essas enzimas possuem perfis muito semelhantes quanto ao seu

substrato, entretanto, a sua expressão na parede vascular é controlada diferentemente. A MMP-2 tem expressão basal na camada média da parede vascular, enquanto a expressão da MMP-9 somente tem sido observada quando há lesão ou inflamação na parede do vaso (WHATLING; MCPHEAT; HURT-CAMEJO, 2004).

A MMP-2 é uma MMP constitutiva, secretadas por células musculares lisas, fibroblastos, endotélio vascular, macrófagos e linfócitos T (THOMPSON; PARKS, 1996). Entretanto, estudos realizados em humanos e animais mostraram aumento na quantidade de RNA mensageiro de MMP-2 em ambas as formas (precursora e ativada) em tecidos aneurismáticos, quando comparados a aortas normais e com aterosclerose (DAVIS *et al.*, 1998; CROWTHER *et al.*, 2000). Mais ainda, camundongos nocautes de MMP-2 não desenvolveram aneurismas num modelo de lesão aórtica, sugerindo que essa gelatinase deva contribuir para a formação de AAAs (LONGO *et al.*, 2002). Nossos achados dão suporte a estes resultados. Observamos a expressão da MMP-2 tanto nos grupos controles, quanto nos grupos AAAs, sugerindo que a MMP-2 parece contribuir para o desenvolvimento de AAA neste modelo.

Por outro lado, as MMP-9 não são produzidas em aorta normal, sendo armazenadas em neutrófilos, macrófagos e outras células inflamatórias (HOBEIKA *et al.*, 2007). A presença da MMP-9 na aorta tem sido associada à inflamação crônica e infiltração de macrófagos, aspectos habitualmente relacionados à formação de aneurismas (THOMPSON *et al.*, 1995). De fato, diversas investigações tem evidenciado níveis elevados de MMP-9 em aneurismas, tanto em humanos quanto em modelos experimentais (YAMASHITA *et al.*, 2001). Camundongos nocautes de MMP-9 são resistentes à formação de aneurismas em resposta à injúria na aorta,

entretanto, perdem essa resistência, quando transplantados com medula óssea de camundongos selvagens, capazes novamente de produzir macrófagos competentes na secreção de MMP-9 (PYO *et al.*, 2000). A quantidade de RNA mensageiro, proteínas e atividade enzimática das MMP-9 estão aumentadas em tecido aneurismático e esse aumento tem sido relacionado, através de imunistoquímica e hibridização *in situ*, à presença de macrófagos na camada média degenerada da aorta dilatada (THOMPSON *et al.*, 1995). Embora, formas ativas da MMP-2 e MMP-9 tenham sido identificadas em várias doenças da aorta, a secreção de MMP-9 em tecidos aneurismáticos é 12 vezes superior àquela observada nas doenças arteriais oclusivas (THOMPSON *et al.*, 1995). Portanto, a MMP-9 pode ser considerada como a gelatinase predominante em casos de aneurismas de aortas. Kasashima *et al.*, (1999) sugeriram que MMP-9 secretadas principalmente por macrófagos desempenham um importante papel nas fases iniciais da formação dos aneurismas, degradando elastina e outros componentes da MEC, resultando na sua expansão progressiva. Nossos experimentos apóiam essa hipótese. Aneurismas só foram visualizados no grupo AAA onde detectamos expressão da pró-MMP-9. Esses resultados também foram semelhantes aos encontrados por Sakalihan *et al.* (1996) que após quantificar a atividade das MMPs, verificaram que a MMP-2 estava presente na parede das aortas normais, enquanto que a MMP-9 estava presente apenas nos aneurismas.

A importância do processo inflamatório na geração dos aneurismas já está bem demonstrada. Estudos em aneurismas de aortas de humanos identificaram a presença de um extenso infiltrado inflamatório nas camadas média e adventícia, com predominância de macrófagos e linfócitos T (PEARCE; KOCH, 1996). Em adição, modelos experimentais de AAA com infusão de elastase, modelo bastante utilizado

na literatura pertinente, mostraram intensa resposta inflamatória no período que antecede a dilatação aórtica (ANIDJAR *et al.*, 1990; GERTZ; KURGAN; EISENBERG, 1988). No nosso estudo, observamos uma nítida correlação positiva entre ao grau de inflamação e os diâmetros aórticos. Mais ainda, assumindo que o espessamento da parede das aortas deva refletir o comprometimento inflamatório dessas paredes, observamos uma correlação positiva entre esse parâmetro e o diâmetro das aortas, ou seja, quanto mais extensa a inflamação, maior foi o espessamento da parede da aorta e maior foi o diâmetro atingido pela dilatação da mesma. Esses resultados foram semelhantes ao encontrados por Carsten *et al.* (2001) num modelo diferente do nosso. Segundo alguns autores, a diminuição da resposta inflamatória parece inibir a dilatação aórtica em modelos animais, sendo o contrário verdadeiro quanto à frequência e o tamanho dos aneurismas (RICCI *et al.*, 1996; FREESTONE *et al.*, 1995).

A análise morfométrica apresentou um espessamento da camada média, aumento do colágeno e diminuição de fibras elásticas sugerindo atuação das MMP-2 e 9 na parede aórtica. No grupo AAA, onde os níveis de ambas as formas de MMP-2 e MMP-9 foram elevados, houve degradação maciça de fibras elásticas, associada ao aumento na quantidade de colágeno. De acordo com Baxter *et al.*, (1994) na fase inicial do desenvolvimento de aneurismas, a quantidade de colágeno é desproporcionalmente maior comparada a quantidade de fibras elásticas. Essa destruição de fibras elásticas pelas MMPs levaria a um aumento compensatório da síntese de colágeno, resultando no aumento da circunferência da aorta. Conseqüentemente, as fibras elásticas deficitárias não suportariam a sobrecarga hemodinâmica, facilitando a dilatação do vaso com alteração do fluxo sanguíneo. Baseando-se nestes relatos, podemos sugerir que neste modelo, as MMP-2 e MMP-

9 atuam tanto no remodelamento vascular (BOYLE *et al.*, 1998; SAKALIHASAN *et al.*, 1996) como na degradação contínua de fibras elásticas e, conseqüente, expansão do vaso (THOMPSON *et al.*, 1995; MCMILLAN *et al.*, 1995).

Aneurismas de aorta abdominal são caracterizados, em parte, por uma resposta inflamatória importante na parede vascular que leva ao remodelamento de todas as suas camadas, inclusive da adventícia (PATEL *et al.*, 1996; FREESTONE *et al.*, 1995). Entretanto, a importância dessa camada nas doenças vasculares tem sido pouco explorada e, só recentemente, a adventícia tem sido descrita como um regulador homeostático na patogênese de doenças cardiovasculares, como reestenose pós angioplastia coronariana (LONGO *et al.*, 2002; SALSAC; SPARKS; LASHERAS, 2004) e aneurismas da aorta abdominal (LONGO *et al.*, 2005). Com efeito, vários estudos tem mostrado que em diferentes formas de doença cardiovascular, a adventícia quando lesada, não somente encontra-se infiltrada por macrófagos e células T (LONGO *et al.*, 2005; PATEL *et al.*, 1996; NEWMAN *et al.*, 1994), mas também mostra um aumento na replicação e diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (THOMPSON *et al.*, 1995). Fibroblastos adventiciais ativados geram sinais quimiotáticos que recrutam uma série de mediadores inflamatórios para o tecido perivascular (MAIELLARO; TAYLOR, 2007). Esses aspectos dão suporte à "outside in hypothesis", no qual a inflamação vascular iniciada na adventícia pode progredir em direção às camadas mais internas, acometendo toda a parede vascular (MAIELLARO; TAYLOR, 2007). Por outro lado, apesar de algumas condições do fluxo sanguíneo influenciarem na inflamação vascular intramural, os mecanismos em relação a estas influências permanecem obscuros. Sabe-se que o fluxo laminar unidirecional modula a expressão de genes antiinflamatórios, antitrombóticos e antiadesivos em cultura de células endoteliais

(SHO *et al.*, 2004). Em contraste, a redução e as oscilações nas forças de cisalhamento promovem a expressão de agentes pró-inflamatórios em cultura de células endoteliais (CHENG *et al.*, 2006; HSIAI *et al.*, 2001). A estenose da aorta, em nosso modelo, altera potencialmente o fluxo laminar gerando zonas de aceleração, desaceleração e fluxo turbulento como descrito por modelos semelhantes de estenose de artérias, encontrados na literatura pertinente (NESBITT *et al.*, 2000; CHENG *et al.*, 2006; PRADO *et al.*, 2006). Neste modelo, através do Doppler, confirmamos a geração de fluxo turbulento no segmento pós-estenótico, proporcionando ambiente pró-inflamatório com contribuição fundamental para o desenvolvimento dos aneurismas. A associação destas alterações à lesão vascular na camada mais externa da aorta levaria ao aumento da expressão de fatores pró-inflamatórios, especialmente células inflamatórias, promovendo secreção e ativação das MMP-2 e MMP-9. Vários mecanismos podem estar envolvidos nesse processo e um deles, a provável produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), está atualmente sob investigação em nosso laboratório. Embora não tenhamos analisado a formação de ROS neste estudo, outros trabalhos têm sugerido que alterações hemodinâmicas promovem o recrutamento de células inflamatórias (GIMBRONE *et al.*, 1999) responsáveis pela formação de ROS implicadas no desenvolvimento de AAAs (KUNSCH; MEDFORD, 1999). O aumento de ROS pode promover um aumento da expressão e da atividade das MMPs 2 e 9 (GALIS; KHATRI, 2002; VAN, 2002). Assim, é possível que o aumento do estresse oxidativo em aortas com alterações hemodinâmicas, pode ser o responsável pelo aumento na atividade das MMPs (PARKS, 2002).

Por fim, as MMPs continuam a representar um foco importante de pesquisa para a ciência e investigação clínica de aneurismas. Muitas teorias tradicionais da

fisiopatologia dos aneurismas já foram abolidas através da elucidação de alguns mecanismos de ativação das MMPs. No entanto, o processo desencadeante que ativa a contínua degradação da elastina, permitindo a dilatação e a formação dos aneurismas ainda não foi completamente identificado. A capacidade de desenvolvimento de novas terapias para prevenção de doenças vasculares depende, em parte, da compreensão dos eventos críticos envolvidos na cascata inflamatória associadas ao remodelamento vascular, especialmente no AAAs, e este novo modelo pode ajudar a elucidar estes mecanismos.

8. CONCLUSÃO

8. Conclusão

Nossos resultados sugerem que tanto a lesão vascular externa quanto as alterações hemodinâmicas ativam as MMP-2 e 9, as quais são importantes no desenvolvimento de AAAs. Este novo modelo poderá ajudar a compreender os mecanismos que desencadeiam a secreção e ativação dessas enzimas. Entretanto, novos estudos deverão ser direcionados no sentido de elucidar o papel de cada MMP no desenvolvimento do aneurisma.

REFERÊNCIAS

Referências

Ailawadi G, Eliason JL, Upchurch GR Jr. Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2003 Sep;38(3):584-8.

Alvarez F, Roda JM, Experimental model for induction of cerebral aneurysms. *J neurosurg* 1986;65:398-400.

Ammirati M, Cozzens J, Eller T, Ciric I, Tarkington J, Rabin E, Technique of experimental aneurysms formation in the rat common carotid artery using the milliwatt carbon dioxide laser and adventitia patch model. *Neurosurg* 1986;19(5):732-734.

Anidjar S et al. Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation* 1990; 82:973–981.

Armstrong PJ, Johanning JM, Calton WC, Jr., Delatore JR, Franklin DP, Han DC, et al. Differential gene expression in human abdominal aorta: aneurysmal versus occlusive disease. *J Vasc Surg* 2002;35:346-355.

Asanuma K, Magid R, Johnson C, Nerem RM, Galis ZS. Uniaxial strain upregulates matrix-degrading enzymes produced by human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:1778-1784.

Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong W, Baxter BT, Starcher BC, Vyavahare NR. Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases. *Circulation* 2004;110(22):3480-7.

Baxter BT, Davis VA, Minion DJ, Wang Y, Lynch TG, McManus BC. Abdominal aortic aneurysms are associated with altered matrix proteins of the nonaneurysmal aortic segments. *J Vasc Surg* 1994;19:797-803.

Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, Galardy RE, Reidy MA. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res* 1994;75 (3):539-45.

Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2003;170 (2):191-203.

Boyle JR, McDermott E, Crowther M, Wills AD, Bell PR, Thompson MM. Doxycycline inhibits elastin degradation and reduces metalloproteinase activity in a model of aneurismal disease. *J Vasc Surg* 1998;27:354–61.

Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3 (3):207-14.

Busuttil R, Rinderbriecht H, Flecher A, Carnack C. Elastase activity: the role of elastase in aortic aneurysm formation. *J Surg Res* 1982;32:214-217.

Camp TM, Smiley LM, Hayden MR, Tyagi SC. Mechanism of matrix accumulation and glomerulosclerosis in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2003;21 (9):1719-27.

Carome MA, Striker LJ, Peten EP, Elliot SJ, Yang CW, Stetler-Stevenson WG, Reponen P, Tryggvason K, Striker GE. Assessment of 72-kilodalton gelatinase and TIMP-1 gene expression in normal and sclerotic murine glomeruli. *J AM Soc Nephrol* 1994;5 (6):1391-9.

Carsten CG, Calton WC, Johanning JM, Armstrong PJ, Franklin DP, Carey, DJ, Elmore JR. Elastase is not sufficient to induce experimental abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2001;33:1255-62.

Cheng C, Tempel D, Haperen VR, et al. Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress. *Circulation* 2006; 113:2744-2753.

Chesler NC, Ku DN, Galis ZS. Transmural pressure induces matrix-degrading activity in porcine arteries ex vivo. *Am J Physiol* 1999;277:2002-2009.

Chew DK, Conte MS, Khalil RA. Matrix metalloproteinase-specific inhibition of Ca²⁺ entry mechanisms of vascular contraction. *J Vasc Surg* 2004;40(5):1001-10.

Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury, I: Smooth muscle cell growth in the absence of endothelium. *Lab Invest* 1983;49:327-333.

Cohen JR, Parikh S, Sarfati 1, Dana D. Neutrophil elastase mRNA transcripts in abdominal aortic aneurysm patients. *Surgical Fórum* 1991; 42:358-359.

Courtman DW, Franco CD, Meng Q, Bendeck MP. Inward remodeling of the rabbit aorta is blocked by the matrix metalloproteinase inhibitor doxycycline. *J Vasc Res* 2004;41:157-165.

Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 2001;89:201-210.

Crowther M, Goodall S, Jones JL, Bell PR, Thompson MM. Increased matrix metalloproteinase 2 expression in vascular smooth muscle cells cultured from abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2000;32:575-83.

Curci JA, Mao D, Bohner DG, Allen BT, Rubin BG, Reilly JM, et al. Preoperative treatment with doxycycline reduces aortic wall expression and activation of matrix metalloproteinases in patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2000;31:325-342.

Dai Z, Yao-Dong B, Zi-Wei D, Takeda F, Kanno T. Experimental cerebral aneurysms in rats. *Chinese Med J* 1985;98(6);421-426.

Davis V, Persidskaia R, Baca-Regen L, Itoh Y, Nagase H, Persidsky Y, et al. Matrix metalloproteinase-2 production and its binding to the matrix are increased in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1625-33.

Dobrin PB, Baker WH, Gley WC. Elastolytic and collagenolytic studies of arteries: implications for the mechanical properties of aneurysms. *Arch Surg* 1984; 119:405- 409.

Dobrin PB, Mrkvicka R. Failure of elastin or collagen as possible critical connective tissue alterations underlying aneurysmal dilatation. *Cardiovasc Surg* 1994; 2:484-488.

Donaldson MC, Rosenberg JM, Bucknam CA. Factors affecting survival after ruptured abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 1985;2(4):564-70.

Dong-Chuan Guo, Christina I. Papke, Rumin He, Dianna M. Milewicz. Pathogenesis of thoracic and abdominal aortic aneurysms. *Ann N.y. Acad Sci* 2006; 1085: 339–352.

Donnelly R, Collinson DJ, Manning G. Hypertension, matrix metalloproteinases and target organ damage. *J Hypertens* 2003;21 (9):1627-30.

Earnshaw J.J, Shaw E., Heather B.P. Screening for abdominal aortic aneurysm in men. *BMJ, London*, v328, n.7448, p1122-1124, May 2004.

Erentug V, Bozbuga N, Omeroglu SN, et al. Rupture of abdominal aortic aneurysms in Behçet's disease. *Ann Vasc Surg* 2003; 17:682–85.

Ernst CB. Abdominal aortic aneurysm. *N Engl J Med* 1993; 328:1167–1172.

Farias E, Ranuncolo S, Cresta C, Specterman S, Armanasco E, Varela M, Lastiri J, Pallotta MG, Bal de Kier Joffe E, Puricelli L. Plasma metalloproteinase activity is enhanced in the euglobulin fraction of breast and lung cancer patients. *Int J Cancer* 2000;89 (4):389-94.

Freestone T, Turner RJ, Coady A, Higman DJ, Greenhalgh RM, Powell JT. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15: 1145–1151.

Freestone T, Turner RJ, Higman DJ, Lever MJ, Powell JT. Influence of hypercholesterolemia and adventitial inflammation on the development of aortic aneurysm in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(1):10-7.

Futami K, Yamashita J, Tachibana O, Kidas S, Higashi S, Ikeda K, Yamashita T. Basic fibroblast growth factor may repair experimental cerebral aneurysms in rats. *Stroke* 1995;26(9):1649-1654.

Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002;90 (3):251-62.

Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;94 (6):2493-503.

Gerlach RF, Demacq C, Jung K, Tanus-Santos JE. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clin Biochem* 2007;40:119–23.

German WJ, Black SPW. Experimental production of carotid aneurysms. *New Engl JMed* 1954;250:104-106.

Gertz SD, Kurgan S, Eisenberg D. Aneurysm of the rabbit common carotid artery induced by periarterial application of calcium chloride in vivo. *J Clin Invest* 1988; 81:649–656.

Gimbrone MA, Anderson JRKR, Topper JN, et al. Special communication: the critical role of mechanical forces in blood vessel development, physiology and pathology. *J Vasc Surg* 1999;29: 1104–1151.

Glimåker H, Holmberg L, Elvin A, Nybacka O, Almgren B, Björck CG, Eriksson I. Natural history of patients with abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Surg* 1991;5(2):125-30.

Golledge J, Muller J, Daugherty A, Norman P. Abdominal aortic aneurysm: pathogenesis and implications for management. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:2605-2613.

Grange JJ, Davis V, Baxter BT. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysm: update and look toward the future. *Cardiovasc Surg* 1997;5:256-65.

Guerreiro NE, Colli BO, Carlotti CG Jr, Chimelli L. Experimental microaneurysms in rats: I. Model for induction. *Surg Neurol* 2004;62(5):406-12.

Handa H, Hashimoto N, Nagata I, Hazama F. Saccular cerebral aneurysms in rats: a newly developed animal of the disease. *Stroke* 1983;14(6):857-866.

Hashimoto H, Ida JI, Hironaka Y, Okada M, Sakaki T. Use of computerized tomography angiography in patients with subarachnoid hemorrhage in whom subtraction angiography did not reveal cerebral aneurysms. *J Neurosurg* 2000;92:278-283.

Hassler O. The windows of the internal elastic lamella of the cerebral arteries. *Virchows Arch Path Anat Physiol* 1962;35:127-132.

Hazama F, Katoa H Yameda E, Kayembe K, Hashimoto N, Kojima M, Kim C. Early changes of experimentally induced cerebral aneurysms in rats. *Am J Pathol* 1986;124(3):399-404.

Hobeika MJ, Thompson RW, Muhs BE, Brooks PC, Gagne PJ. Matrix Metalloproteinases in peripheral vascular disease. *J Vasc Surg* 2007;45(4):849-57.

Hsiai TK, Cho SK, Reddy S, Hama S, Navab M, Demer LL, Honda HM, Ho CM. Pulsatile flow regulates monocyte adhesion to oxidized lipid-induced endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 200;21(11):1770-6.

Jenkins GM, Crow MT, Bilato C, Gluzband Y, Ryu WS, Li Z, Stetler-Stevenson W, Nater C, Froehlich JP, Lakatta EG, Cheng L. Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase and preferential localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation* 1998;97:82-90.

Kadoglou NP, Liapis CD. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis, surveillance and treatment of abdominal aortic aneurysms. *Current Medical Research And Opinion* 2004;20(4); 419–432.

Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, et al. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:368-372.

Kaito K, Urayama H, Watanabe G. Doxycycline treatment in a model of early abdominal aortic aneurysm. *Surg Today* 2003;33(6):426-33.

Kasashima F, Urayama H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in atherosclerotic aortic aneurysm (in Japanese with English abstract). *Kanazawadaigaku Juzenigakukaizasshi (J Juzen Med Soc)* 1995;104:216–29.

Kim C, Kikuchi H, Hashimoto N, Kojima M, Kang Y, Hazama F. Involvement of internal elastic lamina in development of induced cerebral aneurysms in rats. *Stroke* 1988;19(4):507-511.

Kobayashi H, Matsushita M, Oda K, Nishikimi N, Sakurai T, Komori K. Effects of atherosclerotic plaque on the enlargement of an experimental model of abdominal aortic aneurysm in rabbits. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004;28(1):71-8.

Kojima M, Handa H, Hashimoto N, Kim C, Hazama F. Early changes of experimentally induced cerebral aneurysms in rats: Scanning electron microscopic study. *Stroke* 1986;17(5):835-841.

Kunsch C, Medford R.M. Oxidative stress as a regulator of gene expression. *Circ. Res.* 1999; 82: 753–766.

Lawrence DM, Singh RS, Franklin DP, Carey DJ, Elmore JR. Rapamycin suppresses experimental aortic aneurysm growth. *J Vasc Surg* 2004;40(2):334-8.

Lefevre M, Rucker RB. Aorta elastin turnover in normal and hypercholesterolemic Japanese quail. *Biochim BiophysActa* 1980; 630:519-529.

Li Z, Li L, Zielke Hr, Cheng L, Xiao R, Crow Mt, Stetler-Stevenson Wg, Froehlich J, Lakatta Eg. Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1996;148(1):121-8.

Longo GM, Buda SJ, Fiotta N, Xiong W, Griener T, Shapiro S, Baxter BT. MMP-12 has a role in abdominal aortic aneurysms in mice. *Surgery* 2005;137(4):457-62.

Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2002 ;110(5):625-32.

Longo, GM, Pehm, JP, Mayhan, WG, and Baxter, BT. Calciumchloride-induced experimental aneurysms in mice. *Surg Forum* 1999:450–451.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193 (1):265-75.

Magid R, Murphy TJ, Galis ZS. Expression of matrix metalloproteinase-9 in endothelial cells is differentially regulated by shear stress. Role of c-Myc. *J Biol Chem* 2003;278:32994-32999.

Maiellaro K, Taylor WR. The role of the adventitia in vascular inflammation. *Cardiovasc Res* 2007;75(4):640-8.

Maxwell GP, Szabo Z, Buncke HJ. Aneurysms after microvascular anastomoses. *Plastic & Reconstr Sur* 1979;63(6):824-829.

McCune W.S, Samadi A, Blades B. Experimental aneurysms. *Ann Surg* 1953;138:216-218.

McMillan WD, Patterson BK, Keen RR, Shively VP, Cipollone M, Pearce WH. In situ localization and quantification of mRNA for 92-kD type IV collagenase and its inhibitor in aneurysmal, occlusive, and normal aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1139-1144.

Menashi S, Campa JS, Greenhalgh RM, Powell JT. Collagen in abdominal aortic aneurysm: typing, content, and degradation. *J Vasc Surg* 1987;6:578-82.

Meng X, Mavromatis K, Galis ZS. Mechanical stretching of human saphenous vein grafts induces expression and activation of matrix-degrading enzymes associated with vascular tissue injury and repair. *Exp Mol Pathol* 1999;66:227-237.

Moore JE Jr, Ku DN, Zarins CK, Glagov S. Pulsatile flow visualization in the abdominal aorta under differing conditions: implications for increased susceptibility to atherosclerosis. *J Biomech Eng* 1992;114: 391-7.

Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274(31):21491-4.

Nelson KK, Melendez JA. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic Biol Med* 2004;37 (6):768-84.

Nesbitt WS, Mangin P, Salem HH, Jackson SP. The impact of blood rheology on the molecular and cellular events underlying arterial thrombosis. *J Mol Med* 2000; 84:989-995.

Newman KM, Jean-Claude J, Li H, Scholes JV, Ogata Y, Nagase H, Tilson MD. Cellular localization of matrix metalloproteinases in the abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg* 1994;20:814–820.

Newman KM, Malon AM, Shin RD, Scholes JV, Ramey WG, Tilson MD. Matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysm: characterization, purification, and their possible sources. *Connect Tissue Res* 1994;30:265-276.

Nishikawa M, Yokenawa Y, Matsuda I. Experimental aneurysms. *Surg Neurol* 1976;5:15-18.

O'Callaghan CJ, Williams B. Mechanical strain-induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cells: role of TGF-beta(1). *Hypertension* 2000;36:319-324.

Ohbayashi H. Matrix metalloproteinases in lung diseases. *Curr Protein Pept Sci* 2002;3 (4):409-21.

Palombo D, Maione M, Cifiello BI, Udini M, Maggio D, Lupo M. Matrix metalloproteinases. Their role in degenerative chronic diseases of abdominal aorta. *J Cardiovasc Surg* 1999;40:257-260.

Parks WC. A confederacy of proteinases. *J Clin Invest* 2002 110: 613–614.

Parodi JC, Palmaz JC, Barone HD. Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 1991;5(6):491-9.

Patel MI, Melrose J, Ghosh P, Appleberg M. Increased synthesis of matrix metalloproteinases by aortic smooth muscle cells is implicated in the etiopathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1996 ;24(1):82-92.

Pearce WH, Koch AE. Cellular components and features of immune response in abdominal aortic aneurysms. *Ann NY Acad Sci* 1996; 800:175–185.

Petersen E, Gineitis A, Wagberg F, Angquist KA. Activity of matrix metalloproteinases-2 and -9 in abdominal aortic aneurysms. Relation to size and rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;20:457-61.

Petersen E, Wagberg F, Angquist KA. Proteolysis of the abdominal aortic aneurysm wall and the association with rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002;23:153-57.

Petrinec D, Liao S, Holmes DR, Reilly JM, Parks WC, Thompson RW. Doxycycline inhibition of aneurysmal degeneration in an elastase-induced rat model of abdominal aortic aneurysm: preservation of aortic elastin associated with suppressed production of 92 kD gelatinase. *J Vasc Surg* 1996;23(2):336-46.

Prado CM, Ramos SG, Alves-Filho JC, Elias J Jr, Cunha FQ, Rossi MA. Turbulent flow/low wall shear stress and stretch differentially affect aorta remodeling in rats. *J Hypertens* 2006; 24:503-515.

Pyo R, Lee JK, Shipley JM, Curci JA, Mao D, Ziporin SJ, et al. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2000;105:1641-9.

Quigley MR, Bailes JR, Kwaan HC, Crullo LJ, Brown JT. Aneurysm formation after low power carbon dioxide laser-assisted vascular anastomosis. *Neurosurg* 1986;18(3):292-299.

Reed D, Reed C, Stemmermann G, Hayashi T. Are aortic aneurysms caused by atherosclerosis? *Circulation* 1992; 85: 205–11.

Ricci MA, et al. Anti-CD 18 monoclonal antibody slows experimental aortic aneurysm expansion. *J Vas. Surg* 1996; 23:301–307.

Rossi MA, Peres LC. Effect of captopril on the prevention and regression of myocardial cell hypertrophy and interstitial fibrosis in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am Heart J* 1992;124:700-709.

Sakalihasan N, Delvenne P, Nussgens BV, Limet R, Lapiere CM. Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1996;24:127–33.

Salsac AV, Sparks SR, Lasheras JC. Hemodynamic changes occurring during the progressive enlargement of abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 2004; 18:14-21.

Sandasivan B, Swanhoo M, Dujovny M, Ho KL, Ausman JI. Use of experimental aneurysms to evaluate wrapping materials. *Surg Neurol* 1990;34:3-7.

Shapiro SD, Endocott SK, Province MA, Pearce JA, Campbell EJ. Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of Daspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *J Clin Invest* 1991;87:1828-1834.

Sho E, Sho M, Hoshina K, Kimura H, Nakahashi TK, Dalman RL. Hemodynamic forces regulate mural macrophage infiltration in experimental aortic aneurysms. *Exp Mol Pathol* 2004;76(2):108-16.

Suzuki S, Robertson JT, White RP, Stadlan EM, Popoff N. Experimental intracranial aneurysms in rats. *J Neurosurg* 1980;52:494-500.

Tayebjee MH, Nadar S, Blann AD, Gareth Beevers D, MacFadyen RJ, Lip GY. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hypertension and their relationship to cardiovascular risk and treatment: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *Am J Hypertens* 2004;17 (9):764-9.

Thompson RW, Baxter BT. MMP inhibition in abdominal aortic aneurysms. Rationale for a prospective randomized clinical trial. *Ann NY Acad Sci* 1999;878:159-78.

Thompson RW, Holmes DR, Mertens RA, Liao S, Botney MD, Mecham RP, Welgus HG, Parks WC. Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms: an elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages. *J Clin Invest* 1995;96:318 –326.

Thompson RW, Liao S, Petrincec D, Holmes DR, Reilly JM, Welgus HG, et al. Sequential expression of metalloproteinases during elastase-induced aneurysmal degeneration of the rat aorta: correlations with aortic dilatation and the destruction of medial elastin (abstract). *FASEB J* 1995;9 A967.

Thompson RW, Parks WC. Role of matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci* 1996;800:157-74.

Thompson RW. Suppression of experimental abdominal aortic aneurysms by systemic treatment with a hydroxamate-based matrix metalloproteinase inhibitor. *J Vasc Surg* 1999;29(3):522-32.

Tsuruda T, Costello-Boerrigter LC, Burnett JC. Matrix metalloproteinases: pathways of induction by bioactive molecules. *Heart Fail Rev* 2004;9 (1):53-61.

Van Alphen HA, Gao YZ, Kamphorst ST. An acute experimental model of saccular aneurysms in the rat. *Neurol Res* 1990;4:256-259.

Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002;37 (6):375-536.

Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92(8):827-39.

Wassef M. Views in research on abdominal aortic aneurysms. *Ann N.Y Acad Sci* 2006;1085: xv–xvii. Doi: 10.1196/annals.1383.020.

Whatling C, McPheat W, Hurt-Camejo E. Matrix management: assigning different roles for MMP-2 and MMP-9 in vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(1):10-1.

White JC, Sayre GP, Whisnant JP. Experimental destruction of the media for the production of intracranial arterial aneurysms. *J Neurosurg* 1961;18:741-745.

Yamashita A, Noma T, Nakazawa A, Saito S, Fujioka K, Zempo N, Esato K. Enhanced expression of matrix metalloproteinase-9 in abdominal aortic aneurysms. *World J Surg* 2001;25(3):259–265.

Yasumitsu H, Miyazaki K, Umenishi F, Koshikawa N, Umeda M. Comparison of extracellular matrix-degrading activities between 64-kDa and 90-kDa gelatinases purified in inhibitor-free forms from human schwannoma cells. *J Biochem (Tokyo)* 1992;111:74-80.

Yong PH, Fisher VW, Guity A, Fiki ME. Mural repair following obliteration of aneurysms: II pathomorphology of treated aneurysms. *Microsurgery* 1988;9:194-203, 1988.

Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1999;99:1788-1794.

ANEXOS A – FIXADORES E COLORAÇÕES

- **Formol a 3,7% em PBS**

Foram misturados 10 mL de formol a 3,7% e 90 mL de PBS para um volume final de 100 mL.

- **Hematoxilina e eosina**

As lâminas foram desparafinizadas em série decrescente de alcoóis e lavadas em água corrente. Em seguida, coradas pela hematoxilina de Harris por 3-5 minutos. Lavadas em água corrente e diferenciadas em solução álcool-ácido a 1% e lavadas por 15 minutos. Após foram coradas com solução de eosina-floxina por 10 a 30 segundos e passadas em álcool 95% para retirada do excesso de corante. As lâminas foram desidratadas, diafinizadas e montadas.

- **Resorcina**

Para realização desta coloração, foi seguido o KIT para Resorcina-Fuscina de Weigert (Erviagas; EP-12-20010). Inicialmente as lâminas foram desparafinizadas em xilol por 5 minutos, hidratadas em álcool 99%, 95% e 70% e lavadas em água corrente. Foram colocadas 30 ml de Persufato deixando por 50 minutos, e lavadas em água corrente por 5 minutos. Em seguida as lâminas foram imersas em alcoóis 70% e 95% por duas vezes sendo secadas. Após, 30 ml de Resorcina foram colocados sobre as lâminas agindo por 50 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos, diferenciadas, e limpas com álcool 70%. Em seguida foram lavadas em água corrente e colocadas 30 ml de diferenciador álcool-ácido por 10 segundos, sendo lavadas novamente em água corrente por 3 minutos. Após as lâminas foram desidratadas em série de álcool até o xilol e montadas com VERMOUNT (EP-MOUNT/500 e 100 ml).

- **Picrosirius Vermelho**

As lâminas foram desparafinizadas e hidratadas em série decrescente de alcoóis e lavadas em água corrente. Foram deixadas em solução de ácido fosfomolibdico a 2% por 2 minutos e lavadas em água. Em seguida deixadas em solução vermelho da Síria a 0,1% por 90 minutos e lavadas em água corrente. As lâminas foram passadas pelo HCL 0,01N por 2 minutos e lavadas em água corrente. Por último, foram desidratadas, diafinizadas e montadas.

ANEXO B – REAGENTES E SOLUÇÕES

- **Solução salina a 0,9%**

Foram dissolvidos 9 g de NaCl em 1 litro de água destilada.

- **PBS**

Foram dissolvidos 8,17 g de NaCl, 0,36 g de fosfato de sódio monobásico, 1,05 g de fosfato de sódio dibásico e completado para um volume final de 1 litro com água destilada. O PH foi ajustado para 7,4 com NaOH 2M.

- **Hematoxilina de Harris**

Em um balão volumétrico foram misturados 1000 mL de água destilada quente e 5 g de cristais de hematoxilina dissolvidos em 50 mL de álcool absoluto. Deixamos ferver por 1 minuto. O balão foi removido do fogo e acrescentado 2,5 g de óxido vermelho de mercúrio. Em seguida, o balão foi novamente levado ao fogo até a solução tornar-se cor púrpura escura. Foi retirado do fogo, resfriado rapidamente e a solução filtrada.

- **Solução Álcool-Ácido 1%**

Foram misturados 99 mL de álcool 70% e 1 mL de ácido clorídrico concentrado.

- **Eosina-Floxina**

Foram misturados 62,5 mL de solução estoque de eosina a 1% 6,25 mL de solução estoque de floxina a 1% e 487,5 mL de ácido acético glacial.

- **Ácido Fosfomolibdico**

Foram dissolvido 2g de ácido fosfomolibdico em 100 mL de água destilada.

- **HCL 0,01N**

Foi diluído 1 mL de HCL 1N em 100 mL de água destilada.

- **HCL 1N**

Foram dissolvidos 41,25 mL de ácido clorídrico concentrado em 458,75 mL de água destilada.

- **Vermelho da Síria (*Sirus Red*)**

Foi misturado 0,1 g de vermelho da Síria em 100 mL de solução de ácido pícrico.

ANEXO C – SOLUÇÕES E MATERIAS UTILIZADOS PARA REALIZAÇÃO DA ZIMOGRRAFIA

- **Zimografia e eletroforese para MMPs pelo sistema SDS-PAGE**

- ✓ Solução de Acrilamida 30% e Bisacrilamida 0,8%: Acrilamida (30 g), bisacrilamida: (0,8 g) e água destilada q.s.p 100 mL. (6% no gel de largada e 12% no gel de corrida).
- ✓ Tampão do Gel de Separação 4 x Tris HCl/ SDS - pH 8,8: Tris Base: 91 g em 300 ml de água destilada, HCl 1 N para ajustar pH para 8,8, água destilada q.s.p 500 mL e SDS: 2 g.
- ✓ Tampão do Gel de Largada 4 x Tris HCl/SDS – pH 6,8: Tris Base: 6,05 g em 40 mL de água destilada, HCl 1 N para ajustar o pH 6,8, água destilada q.s.p 100 mL e SDS : 0,66 g.
- ✓ Persulfato de Amônio (APS) 10%: APS: 1,0 g e Água destilada q.s.p 10 mL.
- ✓ Gelatina 40 mg/ml (w/v): Gelatina: 1,0 g e água destilada: 20 mL.
- ✓ Tampão de Corrida 5x : Tris Base: 15,1 g, Glicina: 72,0 g, SDS: 5,0 g, água destilada q.s.p 1000 mL (Diluído 1x quando usado).
- ✓ Solução Renaturante Triton X-100 a 2 % (v/v): Triton X-100 10 mL em água quente e água destilada q.s.p. 500 mL.
- ✓ Tris.HCl 1 M – pH 7,4: Trizma Base (Tris): 121 g, HCl 1 N para pH para 7,4.
- ✓ Tampão Tris a 50 mM com CaCl₂ a 10 mM – pH 7,4: Tris.HCl 1 M pH 7,4: 50 mL em água destilada q.s.p 1000 mL e CaCl₂. 6 H₂O: 2,2g.
- ✓ Corante Coomassie Blue: Metanol 30 %, Ácido acético 5%, Coomassie Blue G-250 0,05%.
- ✓ Descorante: Metanol 30 %, Ácido acético 10 %.
- ✓ Tampão de Amostra Não Redutor 2 X: Tris HCl/SDS (4x) - pH 6,8: 25,0 mL

- ✓ Glicerol: 20,0 mL, SDS: 4 g, azul de bromofenol: 1,0 mg dentro do dessecador e água destilada q.sp. 100 mL.
- ✓ Solução de encolhimento: Metanol 50%, Glicerol 5 %.
- ✓ Tampão de extração: CaCl₂ 10 mM, Tris 20 mM pH 7.4, Fenantrolina 1 mM, PMSF 1 mM, NEM 1 mM.

- **Zimografia *in situ***

1. Preparo de câmara úmida (uma para cada substrato);

Preparo da Solução de Dq Gelatin (A):

- ✓ 2µl de Dq gelatin – 18µL de Tris CaCl₂;
- ✓ Deixar no gelo.

(Aplicado 20 µL em cada corte).

2. Preparo da Solução de Dq Gelatin com inibidores (B e C):

- ✓ 2µl de Dq gelatin – 18µL de Tris CaCl₂;
- ✓ Deixar no gelo.

(Aplicado 20µL em cada corte).

3. Aplicação:

- ✓ Disposição das lâminas na câmara úmida;
- ✓ Aplicação de 20µL de cada solução em seus respectivos cortes; esperar 1 hora, no escuro;
- ✓ Lavadas 5 vezes com PBS; na última lavada, esperou-se 5 minutos;
- ✓ Aplicação de 20 µL de PFA 4% em cada corte; espera de 10 minutos;
- ✓ Lavada 1 vez com PBS;
- ✓ Colocação de lamínulas previamente limpas;
- ✓ Fotografia das imagens (40x).

- Observação: Quando os cortes apresentavam-se muito fluorescentes, o excesso foi lavado com PBS; as lâminas foram fotografadas no mesmo dia.

- **Equipamentos utilizados nos experimentos**

- ✓ Centrífuga (CELM - 3 plus);
- ✓ Banho Maria (Nova Ética);
- ✓ Estufa (Soc. FABBE Ltda);
- ✓ Fonte de eletroforese (Eletroforesis Power Supply-EPS 301);
- ✓ Sistema de fotodocumentação (Kodak EDAS 200);
- ✓ Balança de precisão (Shimadzu AY220);
- ✓ pHmetro (incibrás);

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](#)