

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

Juliana Alves Uzuelli

Efeitos de drogas cardiovasculares sobre os
aumentos das concentrações de DNA livre no
plasma em modelos experimentais de
tromboembolia pulmonar aguda

RIBEIRÃO PRETO - SP

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Juliana Alves Uzuelli

Efeitos de drogas cardiovasculares sobre os aumentos das
concentrações de DNA livre no plasma em modelos experimentais de
tromboembolia pulmonar aguda

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

RIBEIRÃO PRETO – SP

2010

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

Ficha Catalográfica

Uzuelli, Juliana Alves

Efeitos de drogas cardiovasculares sobre os aumentos das concentrações de DNA livre no plasma em modelos experimentais de tromboembolia pulmonar aguda/ Juliana Alves Uzuelli; orientador Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos. Ribeirão Preto, 2010.

85p. il. 30cm.

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

*1. tromboembolia pulmonar aguda, 2. DNA livre, 3. nitrito,
4. sildenafil, 5. atorvastatina.*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Alves Uzuelli

Efeitos de drogas cardiovasculares sobre os aumentos das concentrações de DNA livre no plasma em modelos experimentais de tromboembolia pulmonar aguda

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

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em: 18 de junho de 2010

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Instituição: FMRP-USP

Assinatura:

Prof. Dr. Luis Vicente Garcia

Instituição: FMRP-USP

Assinatura:

Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

Instituição: FMRP-USP

Assinatura:

Prof. Dr. Heitor Moreno Junior

Instituição: FCM-UNICAMP

Assinatura:

Prof. Dr. Juan Carlos Yugar Toledo

Instituição: FAMERP

Assinatura:

Dedico este trabalho aos meus pais, Santo e Juvercina, e ao meu marido Ricardo, pela compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo da execução deste trabalho. E ainda, aos meus amigos do laboratório que me ajudaram a não desanimar nos momentos difíceis.

Meus sinceros agradecimentos,

A Deus, pois me concedeu saúde, paciência e persistência para que eu pudesse finalizar esta importante etapa da minha vida.

A minha família por acreditar na minha dedicação aos estudos e sempre me ajudar no que fosse necessário para que este momento se realizasse. Sem a base sólida de meus pais, em especial o meu pai, eu não seria capaz de cumprir mais esta etapa na minha vida.

Ao meu marido Ricardo pela compreensão nos momentos difíceis, sempre pronto para me ajudar a resolver os mais diversos problemas. Sem a sua fé e amor incondicionais, talvez eu não tivesse vencido várias barreiras.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, pela orientação, amizade e paciência dedicada a estes anos de trabalho. Seus ensinamentos contribuíram para meu crescimento científico, intelectual e ético.

Aos professores membros da minha banca, Prof. Dr. Lourenço, Prof. Dr. Vicente, Prof. Dr. Heitor e Prof. Dr. Juan por aceitarem o convite para participar e contribuir para minha formação.

Ao CNPq pelo apoio financeiro durante o doutorado.

A todos meus amigos do laboratório, que conviveram comigo, seja na execução de um trabalho ou no gesto de um simples bom dia, muito obrigado pela amizade. Posso dizer, com certeza, que eles formam a minha segunda família. Com eles, é possível trabalhar com responsabilidade, sem perder o humor!

A amiga Vânia, pelos conselhos e força nos momentos difíceis da pós-graduação.

A amiga Caroline, pelas lições de empenho em realizar um objetivo, pela maturidade nos estudos e na vida e pela ajuda em vários trabalhos.

Aos amigos Carlos, Evandro, Stêfany e Tatiane, sem os quais não seria possível este acontecimento.

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

Aos secretários, Sônia, Ramon e Fátima, pela disponibilidade e ajuda na execução dos tramites administrativos e financeiros da Pós-graduação.

Aos funcionários do Biotério Central pelo cuidado e fornecimento dos nossos animais.

“Concedei-nos Senhor, **Serenidade** necessária, para aceitar as coisas que não podemos modificar, **Coragem** para modificar aquelas que podemos e **Sabedoria** para distinguirmos umas das outras.”

Reihold Niebuhr

RESUMO

Efeitos de drogas cardiovasculares sobre os aumentos das concentrações de DNA livre no plasma em modelos experimentais de tromboembolia pulmonar aguda

A embolia pulmonar aguda (EPA) é uma síndrome grave de difícil diagnóstico. O sildenafil, um inibidor oral da fosfodiesterase-5, exerce efeitos vasodilatadores e melhora a hemodinâmica pulmonar em modelos animais e pacientes com EPA. A atorvastatina, um inibidor da HMG-CoA redutase, além de reduzir a concentração de colesterol no sangue, também apresenta efeitos pleiotrópicos. Estudos recentes mostram um aumento das concentrações do DNA livre no plasma como marcador de inúmeras doenças. Nenhum estudo examinou se há uma relação linear entre a concentração do DNA livre e a gravidade da EPA em cães, e quais os efeitos do pré-tratamento com atorvastatina sobre as concentrações do DNA livre em carneiros tratados agudamente com sildenafil.

No estudo com cães, a EPA foi induzida de duas formas: uma com coágulos de sangue autólogo (salina, 1,3 e 5 mL/Kg) injetados no átrio direito e, a outra com microesferas de *Sephadex* (300um) injetadas na veia cava inferior. As avaliações hemodinâmicas continuaram-se por mais 120 minutos pós EPA.

Em outro estudo com carneiros, foi realizado o pré-tratamento com atorvastatina (30 mg/Kg, s.c.) durante 7 dias. A EPA foi induzida com coágulos autólogo (0,5 g/Kg) injetados no átrio direito. As avaliações hemodinâmicas continuaram-se por mais 60 minutos pós EPA. Então sildenafil (0,7 mg/Kg, i.v.) ou salina foi injetada na veia femoral esquerda e as avaliações continuaram-se por mais 90 minutos.

O DNA foi extraído do plasma dos animais, de ambos os estudos, com o kit QIAmp DNA Blood Mini Kit e quantificado com o kit Quant-iT Pico Green ds DNA.

A EPA produziu um aumento dose dependente da concentração do DNA livre no plasma de cães, que se correlacionou positivamente com a resistência vascular e com a pressão média da artéria pulmonar. A embolização com microesferas não produziu mudanças na concentração do DNA.

O pré-tratamento com atorvastatina não atenuou significativamente o aumento da concentração do DNA livre, diferentemente do sildenafil que produziu esse efeito, sozinho ou em associação com a atorvastatina.

A concentração do DNA livre aumentou em proporção à gravidade da EPA, provavelmente como resultado do aumento de trombos obstruindo os vasos pulmonares. Tratamentos com algumas drogas, tais como o sildenafil parece atenuar o aumento da concentração do DNA livre circulante no plasma após a EPA, embora outras drogas não o façam. É sugestivo que o sildenafil possa interferir em mecanismos fisiopatológicos que levam ao aumento do DNA livre circulante no plasma.

Palavras chaves: embolia pulmonar aguda, trombos, marcadores, DNA livre circulante, sildenafil, atorvastatina, nitrito.

ABSTRACT

EFFECTS OF CARDIOVASCULAR DRUGS ON INCREASE OF THE CONCENTRATIONS OF FREE DNA IN PLASMA IN EXPERIMENTAL MODELS OF ACUTE PULMONARY THROMBOEMBOLISM

The diagnosis of acute pulmonary thromboembolism (APT) and its severity is challenging. Sildenafil, an orally active inhibitor of cGMP phosphodiesterase-type-5, exerts pulmonary vasodilator effects and improves pulmonary haemodynamics in both animal models and clinic patients with APT. Atorvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, besides has been shown to lower serum cholesterol levels and it also presents some pleiotropic effects. Recently, the free circulating DNA has appeared as a diseases marker. No previous study has examined whether there is a linear relation between plasma DNA concentrations and the severity of APT in dogs and the effects of the pre treatment with atorvastatin on haemodynamic disarrangements induced by APT in sheep treated with acute sildenafil.

APT was induced in mongrel dogs with autologous blood clots (saline, 1, 3, or 5 mL/kg) injected into the right atrium. Another group of dogs received 300µm microspheres into the inferior vena cava to produce similar pulmonary hypertension. Hemodynamic evaluations were carried out for 120 min.

Santa Ines sheep were subjected to pre treatment with atorvastatin (30mg/Kg, s.c.) during 7 days. APT was induced with autologous dry clots (0.5g/Kg), according to standard procedures, injected into the right atrium. Haemodynamic evaluations were carried out for one hour after APT. Then, sildenafil (0.7mg/Kg, i.v., over 30 minutes) or saline were injected into left femoral vein and the haemodynamic evaluations continued for more ninety minutes.

In both studies, DNA was extracted from plasma samples using QIAamp DNA Blood Mini Kit and quantified using Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA detection kit.

APT produced dose-dependent increases in plasma DNA concentrations, which correlated positively with pulmonary vascular resistance ($P=0.002$, $r=0.897$) and with mean pulmonary arterial pressure ($P=0.006$, $r=0.856$). Conversely, lung embolization with microspheres produced no significant changes in plasma DNA concentrations.

In the sheep group APT, the pre treatment with atorvastatin did not significantly attenuate free circulating DNA, differently of the sildenafil that produced this effect, alone or in combination with atorvastatin.

Cell-free DNA concentrations increase in proportion to the severity of APT, probably as a result of increasing amounts of thrombi obstructing the pulmonary vessels. Treatment with some drugs such as sildenafil appears to attenuate the concentration increased of free circulating DNA in plasma following the EPA, while other drugs do not. It is suggestive that sildenafil may interfere with the pathophysiological mechanisms that lead to increased free circulating DNA in plasma.

Keywords: acute pulmonary embolism; thrombi; markers; free circulating DNA; sildenafil; atorvastatin; nitrite.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

FIGURAS

Figura 1: Índice de resistência vascular pulmonar (IRVP).....	40
Figura 2: Pressão média da artéria pulmonar (PMAP).....	41
Figura 3: Pressão arterial do oxigênio (PaO ₂)	43
Figura 4: Saturação arterial do oxigênio (SaO ₂).....	44
Figura 5: Curva padrão de DNA livre em plasma de cães.....	46
Figura 6: Concentração do DNA livre em plasma de cães	47
Figura 7: Correlação entre as concentrações de DNA livre e o IRVP e a PMAP	48
Figura 8: Curva padrão de DNA livre em sobrenadante com coágulos de sangue	50
Figura 9: Concentração do DNA livre em sobrenadante com coágulos de sangue	51
Figura 10: Índice de resistência vascular pulmonar (IRVP).....	53
Figura 11: Pressão média da artéria pulmonar (PMAP).....	54
Figura 12: Índice de resistência vascular sistêmico (IRVS).....	56
Figura 13: Pressão média arterial (PMA)	57
Figura 14: Frequência cardíaca (FC)	59
Figura 15: Índice cardíaco (IC)	60
Figura 16: Curva padrão de DNA livre em plasma de carneiros	62
Figura 17: Concentração do DNA livre em plasma de carneiros.....	63
Figura 18: Curva padrão de DNA livre em plasma de ratos	65
Figura 19: Concentração do DNA livre em plasma de ratos.....	66

TABELAS

Tabela 1: Índice de resistência vascular pulmonar (IRVP).....	40
Tabela 2: Pressão média da artéria pulmonar (PMAP).....	41
Tabela 3: Pressão arterial do oxigênio (Pa_2).....	43
Tabela 4: Saturação areterial do oxigênio (SaO_2).....	44
Tabela 5: Concentração do DNA livre em plasma de cães.....	47
Tabela 6: Concentração do DNA livre em sobrenadante com coágulos de sangue.....	51
Tabela 7: Índice de resistência vascular pulmonar (IRVP).....	53
Tabela 8: Pressão média da artéria pulmonar (PMAP).....	54
Tabela 9: Índice de resistência vascular sistêmico (IRVS).....	56
Tabela 10: Pressão média arterial (PMA)	57
Tabela 11: Frequência cardíaca (FC)	59
Tabela 12: Índice cardíaco (IC).....	60
Tabela 13: Concentração do DNA livre em plasma de carneiros....	63
Tabela 14: Concentração do DNA livre em plasma de ratos	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância de uma via

ATORV: atorvastatina

ASC: área de superfície corpórea

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

CV: coeficiente de variação

DC: débito cardíaco

DNA: ácido desoxirribonuclêico

ECG: eletrocardiograma

EDTA: ácido etilenodiamino tetracético

EMB: embolia

eNOs: sintase endotelial do óxido nítrico

EPA: embolia pulmonar aguda

EPM: erro padrão da média

ET: endotelina

ET-1: endotelina 1

FC: frequência cardíaca

GMPC: guanosina monofosfato cíclico

HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A

5-HT: 5-hidroxitriptamina

IC: índice cardíaco

IRVP: índice de resistência vascular pulmonar

NO: óxido nítrico

PAF: fator ativador de plaquetas

PAM: pressão arterial média

PBS: tampão salina fosfato

PaO₂: pressão arterial do oxigênio

PG: prostaglandina

PGI₂: prostaciclina

PMAP: pressão média artéria pulmonar

Poap: pressão de oclusão da artéria pulmonar

RVP: resistência vascular pulmonar

SILD: sildenafil

T1: grupo experimental trombo 1 mL de coágulo/Kg

T3: grupo experimental trombo 3 mL de coágulo/Kg

T5: grupo experimental trombo 5 mL de coágulo/Kg

TGF: fator de crescimento transformador

TNF: fator de necrose tumoral

TXA₂: tromboxano A₂

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Importância clínica da embolia pulmonar aguda.....	18
1.2. Fisiologia da circulação pulmonar.....	19
1.3. Fisiopatologia da hipertensão pulmonar durante EPA.....	20
1.3.1. Obstrução mecânica	20
1.3.2. Vasoconstrição pulmonar mediada por fatores humorais	20
1.4. DNA livre circulante: possível marcador em EPA	22
1.5. Possibilidades da origem do DNA livre circulante.....	23
1.6. O <i>clearance</i> do DNA livre circulante	25
1.7. Possíveis intervenções farmacológicas na EPA	26
1.7.1. O nitrito.....	26
1.7.2. O sildenafil	27
1.7.3. As estatinas.....	27
2.HIPÓTESE	29
3.OBJETIVOS.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1. Preparo e monitorização dos animais do estudo 1	31
4.2. Estudo experimental 1	33
4.3. Preparo e monitorização dos animais do estudo 2	34
4.4. Estudo experimental 2	34
4.5. Cálculo do índice de Resistência Vascular Pulmonar (IRVP)	35
4.6. Extração e quantificação do DNA livre no plasma	36
4.7. Estudo com coágulos <i>in vitro</i>	37
4.8. Estudo com ratos não embolizados pré tratados com atorvastatina.....	37
4.9. Análise Estatística	38
5. RESULTADOS.....	39
5.1. Resultados hemodinâmicos e respiratórios do estudo 1.....	39
5.2. Dosagem plasmática do DNA livre do estudo 1 e dos coágulos <i>in vitro</i>	45
5.3. Resultados hemodinâmicos do estudo 2	52
5.4. Dosagem plasmática do DNA livre do estudo 2.....	61

5.5. Dosagem plasmática do DNA livre dos ratos pré-tratados com atorvastatina	64
6. DISCUSSÃO	67
6.1. Resultados do estudo 1 em cães.....	67
6.2. Resultados do estudo 2 em carneiros.....	71
7. CONCLUSÕES	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
APÊNDICE.....	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância clínica da embolia pulmonar aguda

A embolia pulmonar aguda (EPA) é uma emergência médica comum, de diagnóstico complicado, pois apresenta sintomas não específicos, que resultam da obstrução vascular pulmonar após a migração de êmbolos. Apesar de existirem outras fontes, a principal origem de êmbolos para os pulmões são os trombos oriundos das veias profundas dos membros inferiores (tromboembolia) [1-4].

Aproximadamente, 33% de todos os pacientes que apresentam sintomatologia de trombose das veias profundas manifestam a EPA. É estimado que ocorra nos EUA, a cada ano, 237.000 casos não fatais e 294.000 casos fatais de EPA [5]. Embora não tenhamos estatísticas, podemos imaginar um número pouco menor para o Brasil.

A EPA pode ser fatal nas primeiras horas após sua instalação, tendo sido relatada uma taxa de mortalidade de até 30% em casos de EPA acompanhada de hipotensão arterial. Aproximadamente, 2/3 dos pacientes pertencentes aos casos fatais acabam morrendo na primeira hora de EPA [6]

A EPA pode ser classificada em maciça e não maciça. Os pacientes com manifestações de EPA maciça têm um prognóstico pobre, associado com instabilidade hemodinâmica acentuada e risco de morte precoce. Já os pacientes com EPA não maciça têm um prognóstico melhor, não associado com instabilidade hemodinâmica, podendo serem assintomáticos com risco de morte < 5% [1, 7].

Dessa forma, a EPA representa uma síndrome clínica grave, que necessita de diagnóstico rápido e eficaz.

1.2. Fisiologia da circulação pulmonar

A circulação pulmonar caracteriza-se por ser, em condições normais, um circuito de baixa pressão, alta capacitância e baixa resistência ao fluxo sanguíneo. O leito vascular pulmonar pode acomodar grandes volumes sanguíneos com pequenos aumentos na sua pressão arterial, fundamentalmente através do recrutamento de capilares e arteríolas [8]. Além disto, as artérias pulmonares e seus ramos apresentam constituição histológica que os tornam mais complacentes do que as artérias sistêmicas [9].

Na camada íntima dos vasos pulmonares encontram-se células endoteliais que são capazes de regular o tônus vasomotor, a síntese de substâncias fibrinolíticas, além de regular a permeabilidade vascular [10]. O endotélio é responsável por diversos compostos vasoativos, alguns com função vasodilatadora como o óxido nítrico e as prostaciclina, outros com função vasoconstritora como a endotelina, a angiotensina II e os endoperóxidos [11].

O fluxo sanguíneo pulmonar é, essencialmente, igual ao débito cardíaco. Logo, os fatores que controlam o débito cardíaco – principalmente fatores periféricos, também controlam o fluxo sanguíneo pulmonar. Para que ocorra aeração adequada do sangue, é importante que este seja distribuído para os segmentos dos pulmões onde os alvéolos são mais oxigenados. Isso é realizado pelo seguinte mecanismo: quando a concentração de oxigênio nos alvéolos diminui abaixo da normal (pressão arterial de oxigênio (PaO_2) abaixo de 73 mmHg), os vasos sanguíneos adjacentes aos alvéolos com baixas pressões de oxigênio se contraem.

Isto produz aumentos da resistência vascular pulmonar (RVP) [12] que, por conta da hipóxia é denominado vasoconstrição pulmonar hipóxica.

1.3. Fisiopatologia da hipertensão pulmonar durante EPA

Vários mecanismos participam do desenvolvimento da hipertensão pulmonar durante a EPA [13-15]. Seguem abaixo, alguns deles:

1.3.1. Obstrução mecânica

Um primeiro mecanismo é a obstrução física do leito vascular pulmonar por êmbolos, aumentando significativamente a RVP, o que leva a um aumento da pós-carga do ventrículo direito. Isto pode gerar um quadro de isquemia, depressão miocárdica e abaulamento do septo interventricular em direção ao ventrículo esquerdo [13]. Entretanto, a disfunção miocárdica que se estabelece durante a EPA parece não se restringir somente ao ventrículo direito, pois já foi descrita disfunção miocárdica biventricular durante a embolia pulmonar [16].

1.3.2. Vasoconstrição pulmonar mediada por fatores humorais

A vasoconstrição e a liberação de alguns fatores humorais também agravam a EPA. Estes vasoconstritores pulmonares incluem: tromboxano A_2 , serotonina, endotelina-1, PAF (fator ativador de plaquetas), histamina e algumas prostaglandinas [17]. A liberação destes vasoconstritores pulmonares durante a EPA, somada à obstrução física do leito vascular pulmonar, agravam as alterações hemodinâmicas, aumentando ainda mais a chance de óbito.

Dentre os vasoconstritores pulmonares, o mais potente é a serotonina (5-hidroxitriptamina – 5HT), produzida pelas células enterocromafins gastrintestinais,

neurônios serotoninérgicos, células neuroendócrinas pulmonares e por plaquetas ativadas [18, 19].

O tromboxano A_2 (TxA_2) também é um potente vasoconstritor pulmonar e sistêmico, derivado do metabolismo do ácido araquidônico, podendo ser liberado em quantidades importantes pelas plaquetas ativadas após a EPA. Outra fonte de TxA_2 é o endotélio vascular e os monócitos circulantes [14].

Um outro importante fator humoral produzida pelo endotélio vascular que causa intensa e sustentada vasoconstrição pulmonar é a endotelina (ET). Há subtipos de endotelina, tais como a endotelina-1 (ET-1), conhecida por sua capacidade de causar hipertensão pulmonar, e também seu precursor a *big-endotelina*. A ET-1 ainda causa a vasoconstrição coronariana. [20, 21].

O fator de ativação das plaquetas (PAF) é produzido e liberado pela maioria das células inflamatórias e pelas plaquetas, quando estimuladas; e também participa de uma das etapas da síntese de TxA_2 plaquetário [14]. Estudos revelaram que o PAF causa hipotensão sistêmica, hipertensão e edema pulmonar, além de induzir a vasoconstrição pulmonar quando o tônus vascular está reduzido [22].

A histamina é encontrada em vários tecidos do corpo, porém está presente em altas concentrações nos pulmões e na pele. Ela causa vasoconstrição nos vasos pulmonares, um efeito oposto ao observado na circulação sistêmica. [22].

Após a instalação da EPA são liberadas prostaglandinas (PG). Algumas apresentam atividade vasoconstritora pulmonar e outras, atividade vasodilatadora [23]. Um exemplo de prostaglandina com atividade vasodilatadora pulmonar é a prostaciclina (PGI_2) [24, 25].

1.4. DNA livre circulante: possível marcador em EPA

Vários estudos têm procurado identificar novos marcadores no diagnóstico de doenças, principalmente aquelas que envolvem pacientes de alto risco [26].

O conceito de DNA livre circulante não é novo. A descoberta do DNA livre na circulação ocorreu em 1948 por Mandel e Metais, que detectaram o DNA no plasma humano usando um método de precipitação com ácido perclórico. Mandel e Metais conseguiram quantificar o DNA livre não só em indivíduos com várias doenças, mas também em indivíduos saudáveis [27].

A importância do DNA livre circulante só foi reconhecida em 1994 em um estudo de pacientes com câncer no pâncreas [28]. Mais recentemente o DNA livre se mostrou um novo marcador com algumas aplicações clínicas, auxiliando na discriminação entre indivíduos saudáveis e doentes. A concentração média do DNA livre em indivíduos saudáveis é de 13 ng/mL, enquanto que em um paciente com câncer esta média ultrapassa 100 ng/mL. O DNA livre circulante está aumentado no soro e no plasma de pacientes com algumas complicações clínicas, como lupus, infarto, câncer, gravidez associada a complicações e outras [29-33]. Também foi mostrada uma correlação positiva entre a gravidade de acidentes vasculares encefálicos e as concentrações de DNA livre no plasma [34]. Assim, o DNA livre tem se mostrado como uma medida rápida, sensível e eficaz, além de não invasiva, no auxílio do diagnóstico de algumas doenças.

No diagnóstico da EPA poucos estudos exploraram o DNA livre como um marcador. Além disso, há resultados controversos. Em estudo realizado com 23 pacientes diagnosticados com EPA, o DNA foi encontrado em concentrações aumentadas no plasma de 19 deles (sensibilidade de 83%) [35]. Já os resultados de outro trabalho mostram que de 15 pacientes com suspeita de embolia pulmonar pela

angiografia, apenas 2 deles apresentaram o DNA livre aumentado no plasma [36]. Em outro estudo, no qual foram avaliados 16 pacientes com diagnóstico de EPA, 33 com diagnósticos para outras doenças e 16 controles sadios, o DNA livre aumentado foi encontrado no plasma de 15 pacientes com EPA (94%), em 3 pacientes com outras doenças e em nenhum controle sadio [37]. Possíveis desacordos entre os estudos podem estar relacionados com o método empregado na extração e quantificação do DNA livre. Métodos não muito sensíveis e não específicos podem implicar em resultados falsos positivos, em virtude da concentração do DNA livre ser mínima no plasma.

No entanto, nenhum estudo mostrou até hoje se existe uma relação linear entre o aumento da concentração de DNA no plasma e a gravidade da EPA. Assim, examinar esta questão é importante para tentar predizer o risco de mortalidade e morbidade associado à doença.

1.5. Possibilidades da origem do DNA livre circulante

A origem do DNA circulante ainda não está bem estabelecida. Diferentes hipóteses de mecanismos de liberação do DNA têm sido propostos, incluindo necrose celular e apoptose [38], lise de células tumorais circulantes [39] e liberação ativa [40].

Uma parte dos estudos apóia a evidência do envolvimento de necrose e apoptose. Apoptose e necrose são dois mecanismos de morte celular e representam os extremos desse fenômeno. Durante a apoptose, o DNA cromossomal é clivado em fragmentos de 50-300 Kb e, posteriormente em unidades nucleossomais múltiplas de 180 a 200 pares de bases, que são tidos como marcadores de apoptose. Estes fragmentos são ingeridos por macrófagos e células dendríticas e são

degradados pela DNase II em lipossomos [41, 42]. Contrastando com a apoptose, a necrose causa a digestão incompleta e inespecífica do DNA, produzindo fragmentos de cerca de 10.000 pares de base [43].

A indução de apoptose e necrose de células cultivadas *in vitro* demonstrou um aumento do DNA liberado após o tratamento com indutores destas condições, sendo o DNA liberado típico de apoptose e também de necrose, o que foi investigado por gel de eletroforese de acordo com o tamanho dos fragmentos encontrados. Sugeriu-se que, em pacientes com câncer, a origem do DNA seja determinada de acordo com o tamanho do fragmento liberado: fragmentos com mais de 10.000 pares de base são originados de células necróticas, enquanto que fragmentos menores do que 200 pares de base seriam originados de células apoptóticas [38].

Em contrapartida, o crescimento de células malignas e células normais liberaram o DNA no meio de cultura quando tratadas com um iniciador de apoptose. As mesmas células, quando tratadas com um iniciador de necrose (o calor), não apresentaram este comportamento [44]. Assim sendo, há discordâncias na literatura.

Os macrófagos parecem apresentar um importante papel na liberação do DNA circulante. Quando estas células foram co-cultivadas com células necróticas ocorreu um aumento dose dependente do DNA liberado no meio de cultura. O mesmo não aconteceu quando os macrófagos foram co-cultivados com células em apoptose [45].

Ainda há a hipótese de que o DNA seja liberado por células ativas, mas não há evidências convincentes na literatura. Um estudo mostrou a presença do DNA livre em sobrenadante de meio de cultura de células cancerígenas, no qual não havia células mortas e a proporção do DNA aumentava de acordo com a proliferação

das células cancerígenas, sugerindo que o DNA não provém de células mortas [46]. Ainda em estágios precoces de câncer, supostamente sem a presença de células mortas, há uma liberação aumentada do DNA comparado com estágios avançados da doença, quando ocorre proliferação descontrolada das células. Outros tipos celulares, normais e malignos, também podem liberar o DNA circulante durante processo de divisão [47].

1.6. O *clearance* do DNA livre circulante

Apesar do mecanismo de *clearance* do DNA não estar completamente elucidado, sugere-se que há mais de um mecanismo atuante. O *clearance* do DNA fetal ocorre em duas fases, uma lenta e uma rápida, em aproximadamente duas horas após a sua liberação. Estima-se que grandes quantidades do DNA fetal sejam liberadas na circulação materna o que explicaria as altas concentrações encontradas durante a gravidez. Provavelmente a taxa de liberação exceda o *clearance*. Em indivíduos saudáveis e em pacientes com câncer e outras doenças o mecanismo de *clearance* deve ser parecido com o mecanismo do DNA fetal no organismo materno. Sugere-se que os rins, o fígado e o baço sejam responsáveis por alguns dos mecanismos de *clearance* do DNA livre [48].

Ainda, nucleases podem ter um papel parcial na remoção do DNA livre do plasma. A atividade da DNase I está inibida em pacientes com câncer com altas concentrações do DNA livre [49].

Existem proteínas ligadas ao DNA capazes de reorganizar e transportar o DNA livre para dentro da célula, para que seja degradado por oligonucleotídeos. Esta ligação do DNA livre a receptores da membrana da célula é dependente do pH e da temperatura. Um estudo prévio mostrou a expressão de receptores de DNA em

67% de linfócitos e 98% de monócitos. Assim, dependendo da concentração do DNA livre ligado a proteínas, as células com receptores para DNA podem desempenhar um importante papel no *clearance* do DNA livre [50].

1.7. Possíveis intervenções farmacológicas na EPA

1.7.1. O nitrito

O nitrito é um dos principais produtos do metabolismo do NO endógeno, sendo formado, rapidamente, após oxidação do NO. Embora o nitrito tenha sido considerado um metabólito inativo do NO, recentes evidências sugerem que o nitrito seja reduzido a NO em algumas condições especiais, tais como a isquemia, acidose e hipoxemia, frequentemente evidenciadas em algumas doenças cardiovasculares [51].

Os efeitos biológicos do nitrito foram avaliados em diferentes modelos experimentais e a administração de nitrito revelou alguns efeitos interessantes. A adição de nitrito ao banho de coração isolado de rato submetido à isquemia/reperfusão atenuou a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo e reduziu o tamanho do infarto do miocárdio [52]. Ainda, um estudo mostrou os efeitos da inalação de nitrito em modelos experimentais de hipertensão pulmonar aguda induzida por hipóxia ou pela infusão de U46619 (um análogo do tromboxano A₂). Neste estudo, os autores mostraram que a hipertensão pulmonar foi atenuada, nos dois modelos animais, logo após a inalação de nitrito. Além disso, as medidas de NO exalado aumentaram nos grupos tratados com nitrito [53]. Além destes, outros trabalhos mostraram que há uma melhora hemodinâmica em cães submetidos a EPA induzida por microesferas, após a infusão com nitrito [54, 55].

Logo, é sugestivo que o nitrito atue como um agente farmacológico alternativo para o tratamento da EPA.

1.7.2. O sildenafil

Vários efeitos biológicos do NO, tais como a regulação do tônus vascular e da função plaquetária, são mediados pelo GMPc, que é produzido após a ativação da guanilato ciclase solúvel pelo NO. Entretanto, o GMPc é rapidamente degradado pelas fosfodiesterases (PDEs) [56, 57]. Evidências de que a modulação do GMPc possa ser importante durante a hipertensão pulmonar foram demonstrados em vários estudos. Por exemplo, o aumento nos níveis endógenos de GMPc nos vasos pulmonares através da inibição da fosfodiesterase V (PDE5) com o sildenafil dilatou seletivamente os vasos pulmonares durante a hipertensão pulmonar de diferentes etiologias [58-61] incluindo-se a EPA [62].

Assim, a associação de drogas que ativam a via NO-GMPc poderia revelar efeitos potencializadores ou aditivos durante a EPA.

1.7.3. As estatinas

As estatinas ou inibidores da HMG-CoA redutase (3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A), enzima limitante responsável pela conversão da HMG-CoA a mevalonato, um precursor dos esteróis, são designados por reduzirem os níveis de colesterol e as doenças cardiovasculares [63]. Nos últimos anos, as estatinas ultrapassaram o seu uso como agente hipolipemiante. O aparecimento de efeitos pleiotrópicos sugerem que as estatinas melhoram a função cardíaca, diminuem o tamanho do infarto e a infiltração de neutrófilos polimórficos em lesões por isquemia seguido de reperfusão [64, 65]. Os efeitos pleiotrópicos, possivelmente surgem

porque um dos intermediários da síntese do colesterol, o mevalonato, também é precursor de outros compostos isoprenóides, que participam de diferentes vias de sinalização celular.

A atorvastatina, um dos representantes das estatinas, diminui os níveis plasmáticos de colesterol e lipoproteínas através da inibição da HMG-CoA redutase e da síntese de colesterol no fígado, e eleva o número de receptores de LDL hepáticos na superfície da célula, aumentando a absorção e o catabolismo do LDL. Paralelamente aos efeitos hipolipemiantes, a atorvastatina produz um aumento da expressão da eNOS com conseqüente aumento da produção de NO pelas células endoteliais, apresentando provável efeito vasodilatador [66]. Sugere-se que esses efeitos são dependentes da eNOS porque ratos deficientes desta enzima são resistentes às ações cardioprotetoras das estatinas [65].

Em um estudo foi averiguado que a combinação de baixas doses de atorvastatina com outra droga indutora da produção de NO apresentou efeito sinérgico em reduzir o tamanho do infarto [67]. Em outro estudo investigaram os efeitos do pré-tratamento com atorvastatina (5 e 30 mg/kg/dia) por 2 semanas sobre a reatividade vascular de ratos induzida pelo sildenafil. Os autores observaram que o pré-tratamento com atorvastatina gerou um aumento da vasodilatação induzida pelo sildenafil, como também um aumento da concentração plasmática de nitrato/nitrito com ambas concentrações de atorvastatina [68].

Embora as drogas mencionadas acima protejam contra as alterações hemodinâmicas da EPA, até o presente momento não há estudos enfocando se o tratamento farmacológico com drogas de ação cardiovascular atenua possíveis aumentos na concentração do DNA livre durante a EPA.

2.HIPÓTESE

Neste estudo formulamos a hipótese de que a concentração do DNA livre circulante no plasma aumenta proporcionalmente à gravidade da EPA, e que este aumento possa ser influenciado por diferentes tratamentos farmacológicos.

3.OBJETIVOS

- A) Verificar se há aumento na concentração do DNA livre proporcionalmente à gravidade da EPA;
- B) Testar se o tratamento agudo com nitrito de sódio modifica o aumento na concentração do DNA livre no plasma;
- C) Testar se o pré tratamento com atorvastatina atenua o aumento na concentração do DNA livre no plasma e, se a infusão aguda de sildenafil produz efeitos adicionais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os protocolos e procedimentos cirúrgicos empregados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CETEA-FMRP) em sua 12ª Reunião Ordinária realizada em 26 de abril de 2004 (Protocolo nº 002/2004).

4.1. Preparo e monitorização dos animais do estudo 1

Quarenta e quatro cães mestiços de ambos os sexos (peso médio $\pm$ desvio padrão = $10,4 \pm 2,4$ kg) foram obtidos do Biotério Central – Campus da USP de Ribeirão Preto, e anestesiados com Cetamina (25 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) via intramuscular. A manutenção da anestesia foi feita com injeções intramuscular repetidas a cada hora de Cetamina (10 mg/kg) e Xilazina (5 mg/kg). Após a intubação traqueal, os animais foram ventilados mecanicamente com um ventilador (Ventilador EFRA ROAD C.F., Palmer SWZ Ltda, London, UK), utilizando-se ar ambiente e volume corrente de 15 ml/kg. A ventilação mecânica foi realizada com o auxílio do bloqueador neuromuscular (pancurônio - 0,10 mg/kg) administrado em dose única por via intravenosa, na veia femoral esquerda. A frequência respiratória foi ajustada de modo a se obter níveis fisiológicos de PaCO_2 (30 a 40 mmHg), verificados através da análise gasométrica.

Para a monitorização hemodinâmica, foi inicialmente introduzido um cateter em uma das artérias femorais, cuja extremidade ficou posicionada na aorta abdominal, visando-se obter medida direta da pressão arterial média (PAM). A veia femoral direita foi isolada e nela introduzida um cateter de Swan-Ganz 7,5-F (Edwards Lifesciences, USA), cuja extremidade distal ficou posicionada num dos ramos da artéria pulmonar,

objetivando-se medir os seguintes parâmetros hemodinâmicos: pressão média da artéria pulmonar (PMAP) e pressão de oclusão da artéria pulmonar (Poap). Cada registro apresentou curvas de pressão com características típicas de cada localização anatômica, ou seja, de cada vaso sanguíneo ou câmara cardíaca. Todos os cateteres de pressão foram acoplados aos transdutores de pressão do monitor hemodinâmico (Dixtal modelo DX2010, Dixtal do Brasil, Manaus, Brasil).

O débito cardíaco (DC) foi avaliado em triplicata pelo método da termodiluição, que consiste no seguinte: esse método usa a temperatura de salina resfriada e a quantidade de temperatura perdida ao atravessar o cateter, ou seja, após a injeção de 3 ml de salina resfriada, a queda de temperatura é registrada inicialmente pelo termistor proximal incorporado no cateter de Swan-Ganz. Imediatamente após a injeção de salina resfriada, o tempo necessário para o retorno à temperatura fisiológica (38°C de um cão saudável) é determinado pelo volume de sangue bombeado pelo coração por minuto, o débito cardíaco (DC). Desta forma, o termistor distal do cateter de Swan-Ganz registra o momento em que o sangue retorna a 38°C. Essas medidas de débito cardíaco apresentaram um coeficiente de variação menor que 5 por cento ($CV < 5\%$).

A diferença de temperatura foi, então, calculada “automaticamente” e a temperatura corporal central foi determinada pelo monitor, pois o termistor denota a temperatura específica conforme designada por sua resistência elétrica e calcula a área da curva da temperatura em função do tempo.

As gasometrias arteriais foram executadas no gasômetro (Stat Profile 5 Analyser; Biomedical, Waltham, MA) do Laboratório Central de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

Os animais foram sacrificados no final de cada experimento por meio da injeção endovenosa de cloreto de potássio.

4.2. Estudo experimental 1

Antes do início do experimento propriamente dito, foi colhido 1 mL de sangue venoso/kg do animal. Este sangue foi acondicionado adequadamente por 1 hora para que coagulasse. Então, o coágulo foi passado através de uma peneira (tamis), cujo diâmetro dos poros são conhecidos, e cortados em cubos de 2-3 mm. Após anestesia, monitorização e estabilização hemodinâmica por 20 min, foi feita a avaliação hemodinâmica inicial (Basal).

A embolia foi induzida por infusão dos coágulos autólogos de 5-10 minutos com o auxílio de uma seringa conectada à cânula inserida no átrio direito.

Assim, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais designados abaixo:

- * Sham (n=6): recebeu apenas a infusão de salina durante o período experimental;
- * Trombo 1 (T₁, n=6): infusão de 1 mL de coágulo/Kg
- * Trombo 3 (T₃, n=6): infusão de 3 mL de coágulo/Kg
- * Trombo 5 (T₅, n=8): infusão de 5 mL de coágulo/Kg

Ainda testamos se a terapia com nitrito afetava as concentrações do DNA livre em outro grupo experimental (T₅+nitrito; n=6) que recebeu 3,75 µmol/Kg de nitrito por 15 minutos, seguido de uma infusão de manutenção de 0,28 µmol/Kg/minuto.

Em um outro modelo de EPA induzida com microesferas de *Sephadex* (300µm; n=12) por injeções repetidas a cada 30 segundos, na veia cava por 5 a 10 minutos, foi possível determinar se a concentração do DNA livre era alterada em virtude do modelo experimental utilizado. A quantidade de microesferas infundida foi ajustada para produzir um aumento de 20mmHg na pressão média da artéria

pulmonar, que é comparável ao aumento de pressão da artéria pulmonar obtida no grupo T5 descrito acima, o que permitiu a comparação entre estes dois modelos.

Foram avaliadas as medidas hemodinâmicas e colhidas amostras de sangue arterial em EDTA, de cada grupo, nos momentos basal e 120 minutos após a embolia. O sangue foi centrifugado e o plasma foi separado e estocado a -70°C para a realização das análises do DNA livre.

4.3. Preparo e monitorização dos animais do estudo 2

Vinte e sete carneiros da raça Santa Inês (peso médio $\pm$ desvio padrão = $17,0 \pm 3,0$ kg e, altura $\pm$ desvio padrão = $87,0 \pm 1,0$ cm) fornecidos por criador particular foram anestesiados com Cetamina (20 mg/Kg) associada ao Midazolam (0,2 mg/Kg) por via intramuscular. A manutenção da anestesia foi realizada com injeções intramusculares com metade da dose usada para a indução a cada hora. Em seguida a veia femoral esquerda foi dissecada e canulada para ser utilizada como via de administração de drogas. Os animais foram ventilados mecanicamente como no protocolo anterior. A dose de pancurônio utilizada ao longo do estudo foi de 0,06 mg/kg por via intravenosa (veia femoral esquerda) e à medida que havia competição respiratória foram realizadas doses de manutenção (0,03 mg/kg) até o fim do experimento.

A monitorização hemodinâmica seguiu como no estudo anterior.

4.4. Estudo experimental 2

Os carneiros foram pré tratados com injeções subcutâneas de atorvastatina (30 mg/kg/dia) durante 7 dias.

Os animais foram anestesiados e preparados para a cirurgia de acordo com os procedimentos padrões descritos acima. Foram divididos de acordo com os grupos especificados abaixo:

- * Sham (n=3): não recebeu o pré tratamento e durante o processo experimental cirúrgico recebeu apenas uma infusão de salina;
- * Embolia (Emb, n=6): infusão dos coágulos autólogos (0,5 g/Kg, compatível ao grau de embolia do grupo T5 do estudo 1) de 5-10 minutos por meio de uma seringa conectada à cânula inserida no átrio direito;
- * Embolia + Sildenafil (Emb + Sild, n=6)
- * Atorvastatina + Embolia (Atorv + Emb, n=6);
- * Atorvastatina + Embolia + Sildenafil (Atorv + Emb + Sild, n=6)

Todos os grupos que tiveram a EPA induzida com coágulos autólogos, após 60 minutos de embolia receberam ou uma infusão de salina 0,9% ou sildenafil (0,7 mg/Kg) pela veia femoral esquerda.

Foram avaliadas as medidas hemodinâmicas e colhidas amostras de sangue arterial em EDTA, de cada grupo, nos momentos basal e 150 minutos após a embolia. O sangue foi centrifugado e o plasma foi separado e estocado a -70°C até a realização das análises do DNA.

4.5. Cálculo do índice de Resistência Vascular Pulmonar (IRVP)

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

onde 80 é uma constante que converte mmHg/l/min em dyn.s/cm⁻⁵ e IC é o índice cardíaco que foi calculado conforme a fórmula a seguir:

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

onde ASC é a área de superfície corpórea calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$ASC = [\text{peso(kg)}]^{0,425} \times [\text{comprimento(m)}]^{0,007184} [1]$$

A frequência cardíaca (FC) foi avaliada através do eletrocardiograma de superfície (ECG de derivação DII).

4.6. Extração e quantificação do DNA livre no plasma

O DNA livre foi extraído de 500 µL de amostra de plasma usando o kit QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen, Hilden, Germany, cat. nº. 51106), conforme instruções do protocolo para fluidos corpóreos, especificado no kit. Trata-se de um método de extração e purificação com coluna de cromatografia por afinidade, na qual fica aderido, após sucessivas lavagens com tampões específicos, apenas as moléculas de DNA presentes na amostra. Os contaminantes são eluídos da coluna. O volume de eluato no final do processo foi de 200 µL.

A quantificação foi feita em triplicata usando o kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA detection (Molecular Probes, Oregon, USA, cat. nº. 11495). Trata-se de um método de quantificação para dupla fita de DNA, baseado na intercalação do fluoróforo PicoGreen, altamente seletivo, à dupla fita de DNA. Foi usado 50 µL do eluato final do processo de extração, sem a diluição do mesmo, na proporção 1:1 com o fluoróforo. A curva padrão de DNA foi de 1 a 1000 ng/mL. Os respectivos pontos foram feitos em triplicata e, se necessário um valor foi excluído, caso contrário, foi feita uma média com os 3 valores quantificados. Para cada ensaio de dosagem do DNA livre uma curva foi feita. A leitura das amostras foi feita em um fluorímetro (Spectra Max Gemini EM, Molecular Devices, USA) conforme as

exigências do protocolo proposto pelo kit, em um comprimento de onda de 520 nm de emissão e 480 nm de absorção. O limite de detecção do método é de 25 pg/mL.

4.7. Estudo com coágulos *in vitro*

Com o objetivo de elucidar a possível origem do aumento da concentração de DNA no plasma, foi verificado se o coágulo liberava DNA *in vitro* de maneira dose-dependente. Para isso, foi colhido sangue de um cão sem raça definida. Esperou-se que a amostra de sangue coagulasse espontaneamente, o que demorou cerca de 60 minutos. O coágulo foi lavado três vezes com tampão salina fosfato (PBS) e processado da mesma forma que no estudo experimental 1. Os coágulos foram pesados de modo a se obter misturas em PBS contendo 0, 10, 20 e 40 mg de coágulo/mL de PBS (n=6). Estas misturas colocadas em tubos de vidro adequados foram incubadas a 37 °C por 2 horas. Após foram centrifugadas 5 minutos a 14000 x g e o sobrenadante coletado. A concentração do DNA livre foi dosada no sobrenadante como descrito acima.

4.8. Estudo com ratos não embolizados pré tratados com atorvastatina

No intuito de estudar se o sildenafil e a atorvastatina atenuam o aumento na concentração do DNA livre possivelmente liberado por trombos *in vitro*, trinta e dois ratos Wistar com peso médio de 200 g foram requisitados do Biotério da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto.

Eles foram divididos em 4 grupos:

- * Controle (n=8): receberam veículo (salina) durante o estudo;
- * Atorvastatina (Atorv, n=8);
- * Sildenafil (Sild, n=8);
- * Atorvastatina + Sildenafil (Atorv + Sild, n=8).

Os ratos do grupo Atorv e Atorv + Sild foram pré tratados por gavagem com atorvastatina (30 mg/Kg/dia) durante 7 dias. O grupo Sild e o grupo Atorv + Sild receberam sildenafil (10 mg/Kg) subcutâneo no 7º dia de tratamento, após 60 minutos da gavagem com atorvastatina. Todos os animais foram pesados todos os dias para o cálculo correto das drogas administradas.

Após 2 horas da administração do sildenafil subcutâneo, os animais foram mortos por decaptação e o sangue foi colhido. Cerca de 3 mL de sangue foi coletado em um tubo de citrato 3,2% (BD Vacutainer) e, imediatamente foi colocado a este tubo 15 µL de trombina (1 U/mL de sangue total) para acelerar o processo de formação do coágulo. Os tubos foram incubados a 37 °C por 2 horas para a completa formação e retração do coágulo [69].

Após foram centrifugados a 2000 x g por 10 minutos e o plasma foi separado e congelado a -70 °C para posterior separação e quantificação do DNA livre, como foi explicado no item 4.6.

4.9. Análise Estatística

Todos os resultados foram apresentados como média e seus respectivos erro padrão da média (média $\pm$ EPM). A comparação entre os grupos experimentais foi feita por uma análise de variância de uma via (ANOVA), a cada momento experimental, seguido do teste de *Student-Newman-Keuls*. Teste T pareado foi usado para diferenças dentro dos grupos. Correlação de Pearson foi calculada para as associações entre os parâmetros hemodinâmicos e o DNA livre. Foi considerado estatisticamente significativo o valor mínimo de probabilidade $< 0,05$ (* = $p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Resultados hemodinâmicos e respiratórios do estudo 1

Os parâmetros hemodinâmicos e respiratórios basais foram semelhantes em todos os grupos experimentais e também não achamos diferenças significativas entre os animais SHAM ao longo do período de estudo.

A embolização com os coágulos autólogos aumentou IRVP e PMAP em T1, T3 e T5 proporcionalmente a gravidade da EPA, todos os grupos apresentaram diferença significativa em relação ao momento basal com $p < 0,05$. Conforme esperado, a terapia com nitrito atenuou o aumento do IRVP quando comparado com o grupo T5, ambos $p < 0,05$. O valor do IRVP do grupo tratado com nitrito aproximou-se do valor de IRVP do grupo T1. Os cães embolizados com microesferas apresentaram aumento similar ao grupo T5 embolizado com coágulos autólogos, em relação ao IRVP e a PMAP, conforme exposto nas figuras 1 e 2 com suas respectivas tabelas.

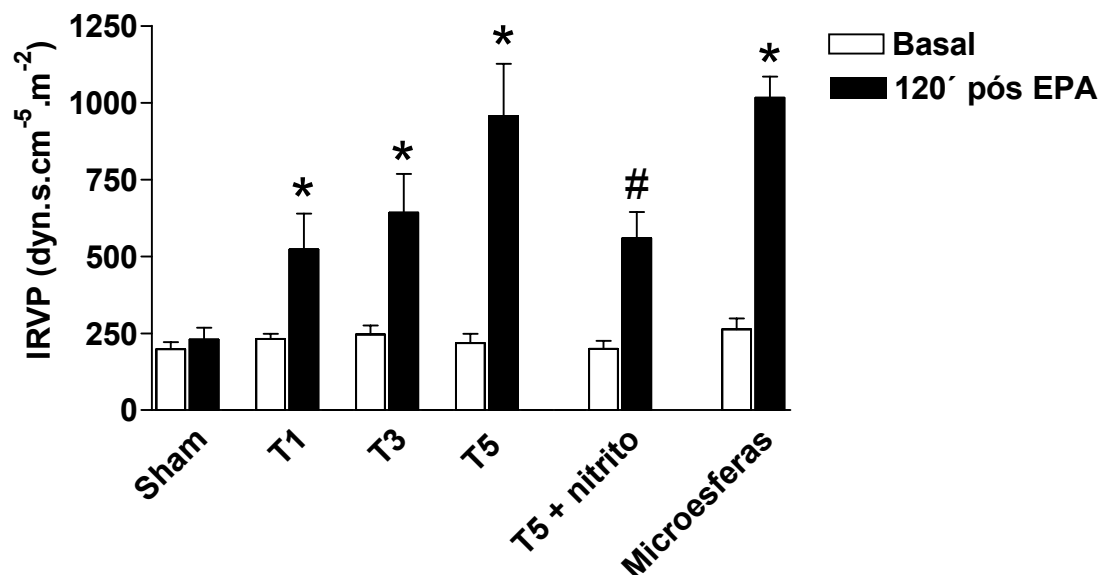


Figura 1 – Índice de resistência vascular pulmonar (IRVP) nos momentos basal e 120 minutos após a tromboembolia pulmonar aguda (EPA) nos grupos Sham, T1, T3 e T5, T5 + nitrito e microesferas. Os valores são as médias $\pm$ E.P.M. (* *versus* medidas do momento basal e # *versus* o grupo T5).

Tabela 1. Índice de resistência vascular pulmonar em $\text{dyn.s.cm}^{-5}.\text{m}^{-2}$

Momentos	IRVP (média $\pm$ erro padrão)					
	Grupos					
	SHAM	T1	T3	T5	T5+nitr.	Microesf.
Basal	198,8 $\pm$ 22,9	231,3 $\pm$ 16,8	246,4 $\pm$ 29,5	218,6 $\pm$ 29,9	199,1 $\pm$ 25,9	262,7 $\pm$ 35,3
120' pós EPA	229,3 $\pm$ 38,9	*522,0 $\pm$ 117,1	*642,4 $\pm$ 125,9	*957,3 $\pm$ 168,8	#559,1 $\pm$ 85,5	*1016,0 $\pm$ 68,8

* *versus* medidas do momento basal e # *versus* o grupo T5

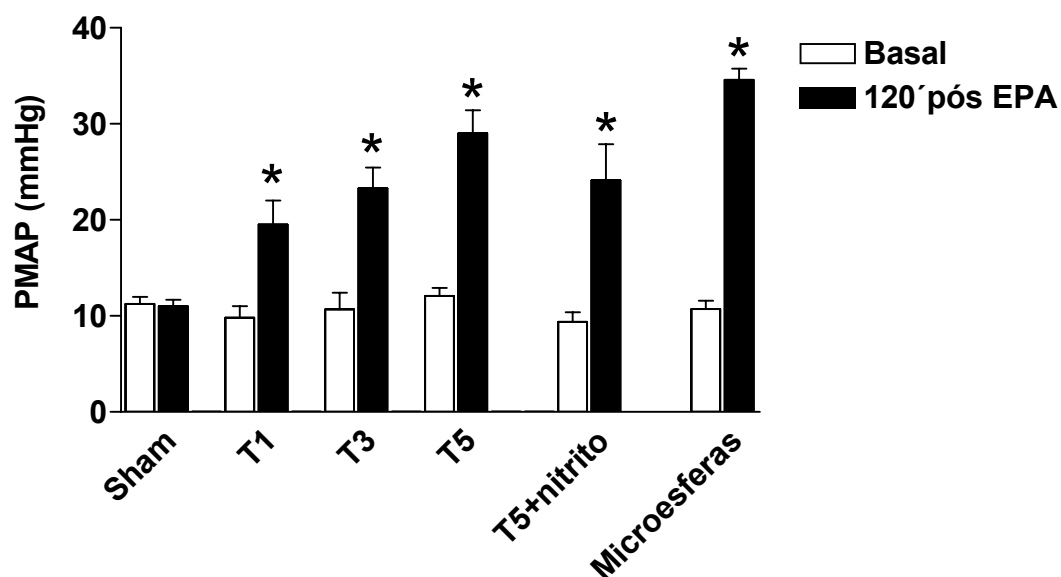


Figura 2 – Pressão média da artéria pulmonar (PMAP) nos momentos basal e 120 minutos após a tromboembolia pulmonar aguda (EPA) nos grupos Sham, T1, T3 e T5, T5 + nitrito e microesferas. Os valores são as médias $\pm$ E.P.M. (* *versus* medidas do momento basal).

Tabela 2. Pressão Média da Artéria Pulmonar em mmHg						
PMAP (média $\pm$ erro padrão)						
Momentos	Grupos					
	SHAM	T1	T3	T5	T5+nitrito	Microesferas
Basal	11,2 $\pm$ 0,7	9,8 $\pm$ 1,1	10,7 $\pm$ 1,7	12,1 $\pm$ 0,8	9,3 $\pm$ 1,0	10,7 $\pm$ 0,8
120' pós EPA	11,0 $\pm$ 0,6	*19,5 $\pm$ 2,5	*23,3 $\pm$ 2,1	*29,0 $\pm$ 2,4	*24,1 $\pm$ 3,7	*34,5 $\pm$ 1,1

* *versus* medidas do momento basal

Também foi observado uma redução da pressão arterial do oxigênio e saturação nos grupos T5, T5+nitrito e microesferas, associado com um quadro de hipoxemia, todos os grupos citados com $p < 0,05$, de acordo com figuras 3 e 4 e respectivas tabelas.

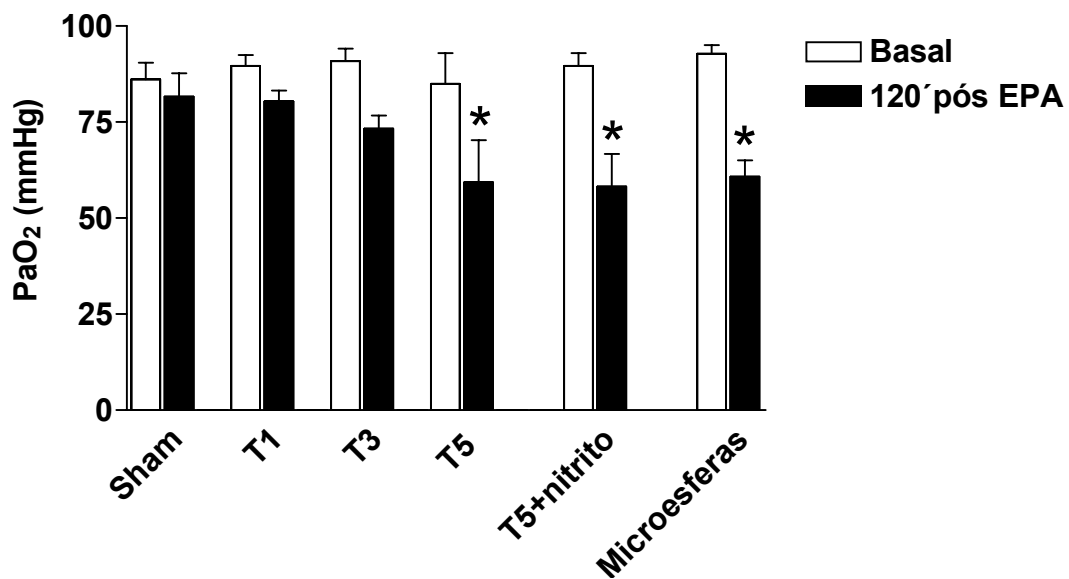


Figura 3 – Pressão arterial do oxigênio (PaO₂) nos momentos basal e 120 minutos após a tromboembolia pulmonar aguda (EPA) nos grupos Sham, T1, T3 e T5, T5 + nitrito e microesferas. Os valores são as médias $\pm$ E.P.M. (* *versus* medidas do momento basal).

Tabela 3. Pressão Arterial do Oxigênio em mmHg						
PaO ₂ (média $\pm$ erro padrão)						
Momentos	Grupos					
	SHAM	T1	T3	T5	T5+nitrito	Microesferas
Basal	86,1 $\pm$ 4,3	89,6 $\pm$ 2,8	90,8 $\pm$ 3,2	84,9 $\pm$ 8,0	89,6 $\pm$ 3,3	92,8 $\pm$ 2,2
120' pós EPA	81,6 $\pm$ 6,0	80,3 $\pm$ 2,8	73,3 $\pm$ 3,3	*59,2 $\pm$ 11,0	*58,2 $\pm$ 8,5	*60,8 $\pm$ 4,2

* *versus* medidas do momento basal

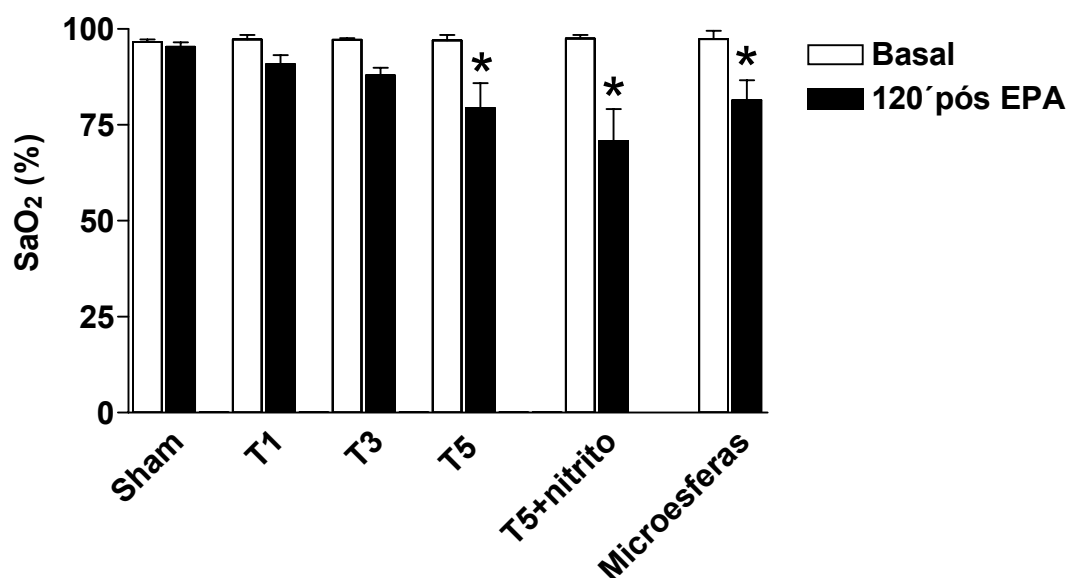


Figura 4 – Saturação arterial do oxigênio (SaO₂) nos momentos basal e 120 minutos após a tromboembolia pulmonar aguda (EPA) nos grupos Sham, T1, T3 e T5, T5 + nitrito e microesferas. Os valores são as médias $\pm$ E.P.M. (* versus medidas do momento basal).

Tabela 4. Saturação Arterial do Oxigênio em mmHg						
SaO ₂ (média $\pm$ erro padrão)						
Momentos	Grupos					
	SHAM	T1	T3	T5	T5+nitrito	Microesferas
Basal	96,6 $\pm$ 0,6	97,3 $\pm$ 1,1	97,2 $\pm$ 0,3	97,0 $\pm$ 1,4	97,5 $\pm$ 0,9	97,4 $\pm$ 2,1
120'pós EPA	95,3 $\pm$ 11	90,7 $\pm$ 2,4	87,8 $\pm$ 2,0	*79,4 $\pm$ 6,4	*70,8 $\pm$ 8,3	*81,4 $\pm$ 5,1

* versus medidas do momento basal

5.2. Dosagem plasmática do DNA livre do estudo 1 e dos coágulos *in vitro*

A curva padrão proposta pelo kit de quantificação (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA detection) do DNA livre possui 4 pontos: 1, 10, 100 e 1000 ng de DNA / mL. A mesma apresentou uma boa reprodutibilidade em todos os ensaios realizados. A curva mostrada na figura 5 apresentou um *slope* de 0.7849 ± 0.0067 e R^2 de 0,9999.

Encontramos um aumento dose dependente do DNA livre no plasma causado pela EPA, com aumento significativo no grupo T5, com $p < 0.05$, conforme figura 6. As concentrações do DNA foram correlacionadas positivamente com IRVP (figura 7, $p = 0.002$ e $r = 0.897$) e com a PMAP (figura 7, $p = 0.006$ e $r = 0.856$) nos cães embolizados com coágulos autólogo. Embora a infusão do nitrito tenha atenuado o aumento do IRVP, a droga não afetou o aumento da concentração de DNA associado a EPA. Não houve diferença significativa no grupo embolizado com microesferas, como apresentado na figura 6 e respectiva tabela.

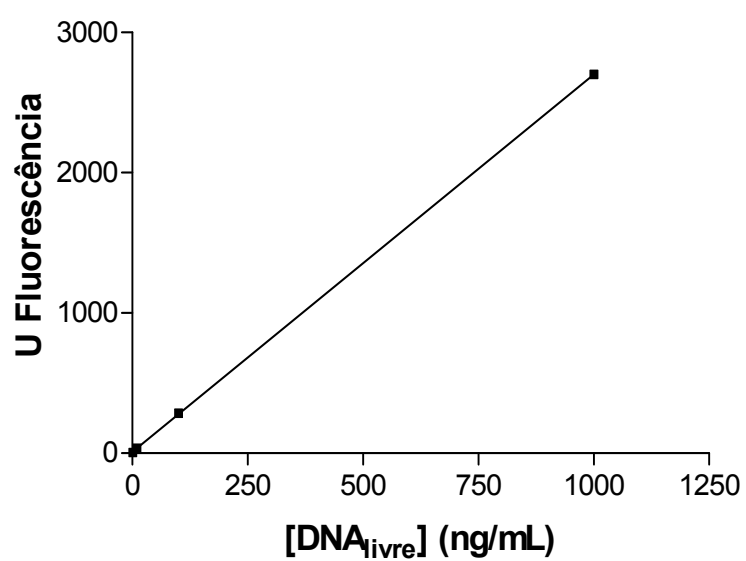


Figura 5: Curva padrão representativa da dosagem do DNA livre circulante extraído de plasma de cães

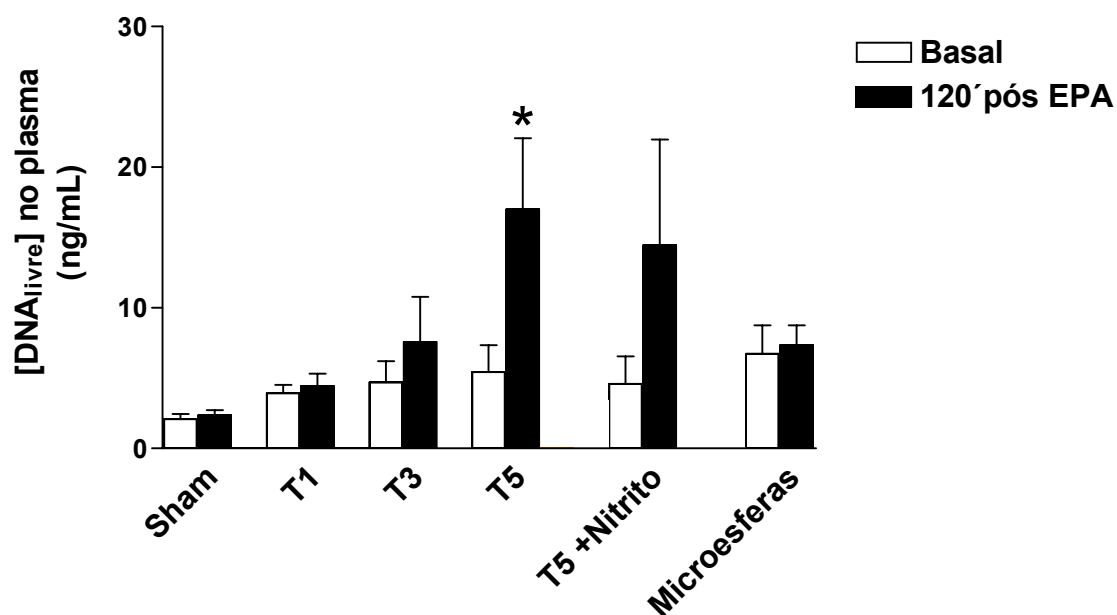


Figura 6: Concentração do DNA livre no plasma nos momentos basal e 120 minutos após a tromboembolia pulmonar aguda (EPA) nos grupos Sham, T1, T3 e T5, T5 + nitrito e microesferas. Os valores são as médias $\pm$ E.P.M. (* *versus* medidas do momento basal).

Tabela 5. Concentração de DNA livre no plasma em ng/mL

[DNA _{livre}] (média $\pm$ erro padrão)						
Momentos	Grupos					
	SHAM	T1	T3	T5	T5+nitrito	Microesferas
Basal	2,1 $\pm$ 0,3	3,9 $\pm$ 0,5	4,7 $\pm$ 1,4	5,4 $\pm$ 1,9	4,5 $\pm$ 1,9	6,7 $\pm$ 2,0
120' pós EPA	2,3 $\pm$ 0,3	4,4 $\pm$ 0,8	7,5 $\pm$ 3,2	*17,0 $\pm$ 5,0	14,4 $\pm$ 7,5	7,3 $\pm$ 1,4

* *versus* medidas do momento basal

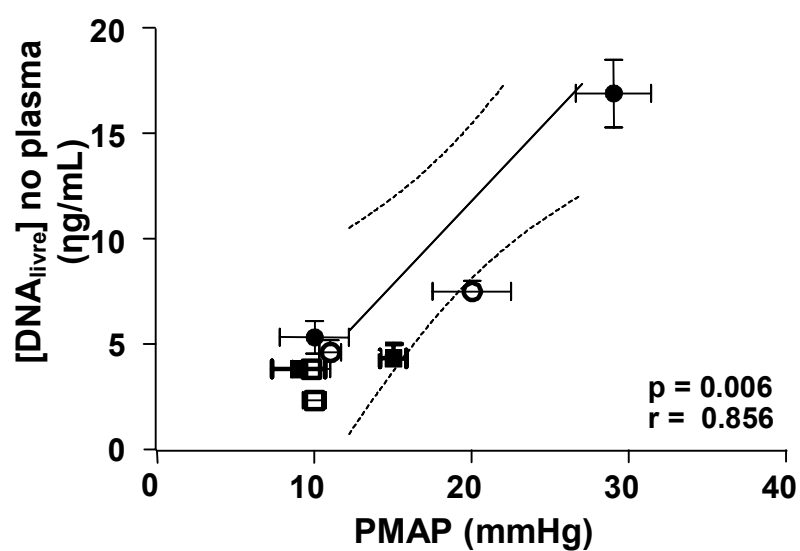
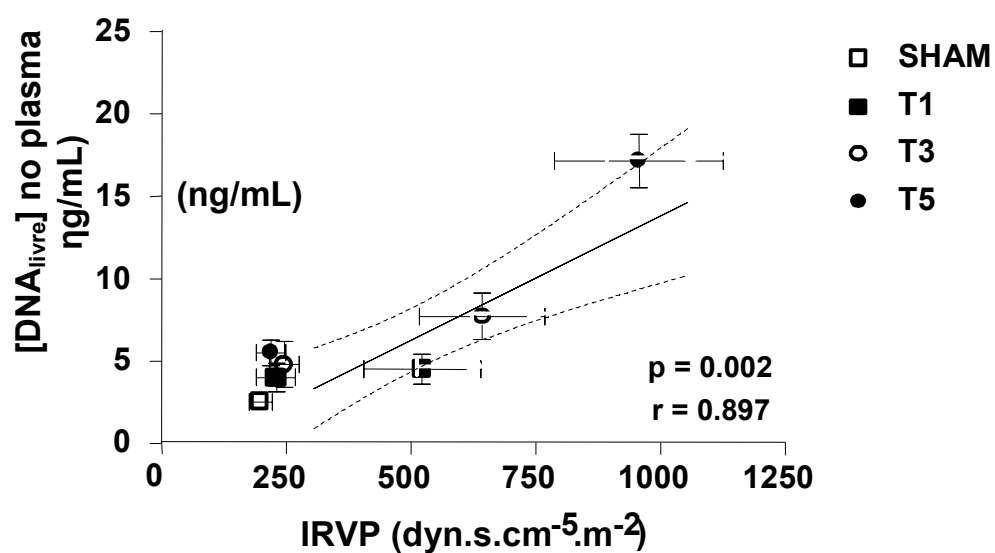


Figura 7: Correlação positiva entre as concentrações de DNA livre no plasma e o índice de resistência vascular periférica (IRVP) e a pressão média da artéria pulmonar (PMAP). A linha de regressão e intervalo de confiança são mostrados (r = coeficiente de Pearson).

A figura 8 mostra a curva padrão da dosagem do DNA livre liberado no sobrenadante com coágulos de sangue. A mesma apresentou um *slope* de 1.161 ± 0.0094 e R^2 de 0,9999, semelhante a curva descrita anteriormente.

Encontramos uma liberação significativa dose dependente de DNA livre dos coágulos de sangue incubados a 37°C por duas horas em PBS. Os grupos apresentaram um $p < 0.05$ em relação ao basal, que não tinha DNA nenhum no meio, apenas PBS, conforme mostrado na figura 9 e tabela 6.

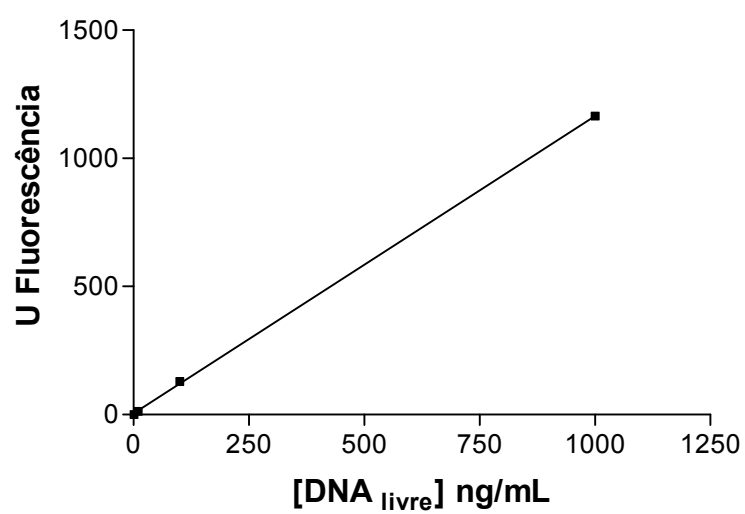


Figura 8: Curva padrão representativa da dosagem do DNA livre circulante liberado em sobrenadante com coágulos de sangue.

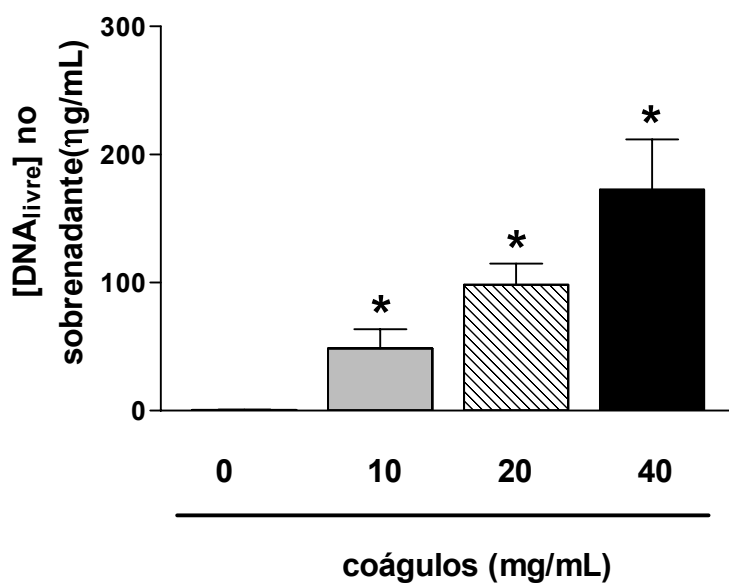


Figura 9. Medida da concentração do DNA livre do sobrenadante de coágulos de sangue incubados em PBS por 2 horas a 37°C. Os valores são as médias $\pm$ E.P.M. (* *versus* concentração 0 mg/mL, somente PBS).

Tabela 6. Concentração de DNA livre no sobrenadante de coágulos incubados em PBS em ng/mL

[DNA _{livre}] (média $\pm$ erro padrão)				
Grupos				
	0	10	20	40
[DNA _{livre}]	0	48,5 $\pm$ 15,0	98,3 $\pm$ 16,5	172,6 $\pm$ 39,3

* *versus* medidas do grupo 0 (somente PBS)

5.3. Resultados hemodinâmicos do estudo 2

Os parâmetros hemodinâmicos basais foram semelhantes em todos os grupos experimentais e também não houve diferenças significativas entre os animais SHAM ao longo do período de estudo.

A embolização aumentou IRVP e PMAP nos grupos Emb, Emb + Sild, Atorv + Emb e Atorv + Emb + Sild, todos com $p < 0,05$. A terapia com sildenafil atenuou o IRVP quando comparado ao aumento do grupo embolia, $p < 0,05$. O mesmo não ocorreu nos animais pré tratados com atorvastatina, mas voltou a aparecer quando os animais foram pré-tratados e receberam infusão de sildenafil, com $p < 0,05$, conforme figuras 10 e 11 e, respectivas tabelas.

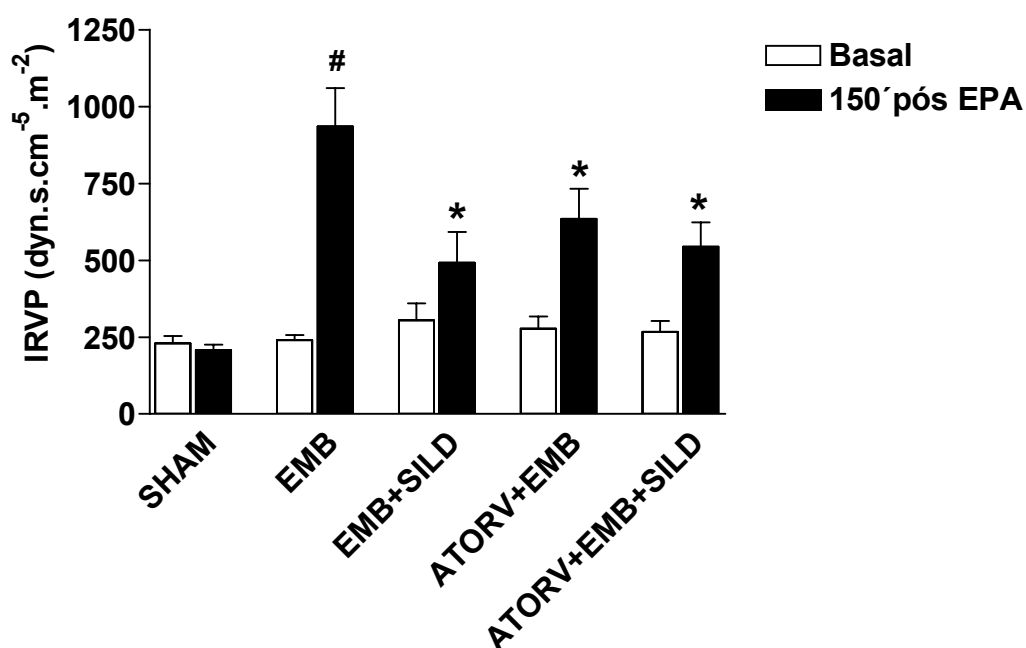


Figura 10 – Índice de resistência vascular pulmonar (IRVP) nos momentos basal e 150 minutos após a tromboembolia pulmonar aguda (EPA) nos grupos Sham, Emb, Emb + Sild, Atorv + Emb e Atorv + Emb + Sild. Os valores são as médias $\pm$ E.P.M. (* *versus* medidas do momento basal e # *versus* o grupo Emb + Sild e o grupo Atorv + Emb + Sild).

Tabela 7. Índice de resistência vascular pulmonar em dinas.cm ⁻⁵ .m ⁻²					
IRVP (média $\pm$ erro padrão)					
Momentos	Grupos				
	SHAM	EMB	EMB+SILD	ATORV+EMB	ATORV+EMB+SILD
Basal	229,3 $\pm$ 23,9	240,2 $\pm$ 16,9	305,0 $\pm$ 55,2	277,3 $\pm$ 40,0	267,4 $\pm$ 35,1
150' pós EPA	208,0 $\pm$ 17,7	#934,5 $\pm$ 125,8	*492,3 $\pm$ 100,4	*635,0 $\pm$ 97,5	*543,8 $\pm$ 80,0

* *versus* medidas do momento basal e # *versus* o grupo Emb + Sild e Atorv + Emb + Sild.

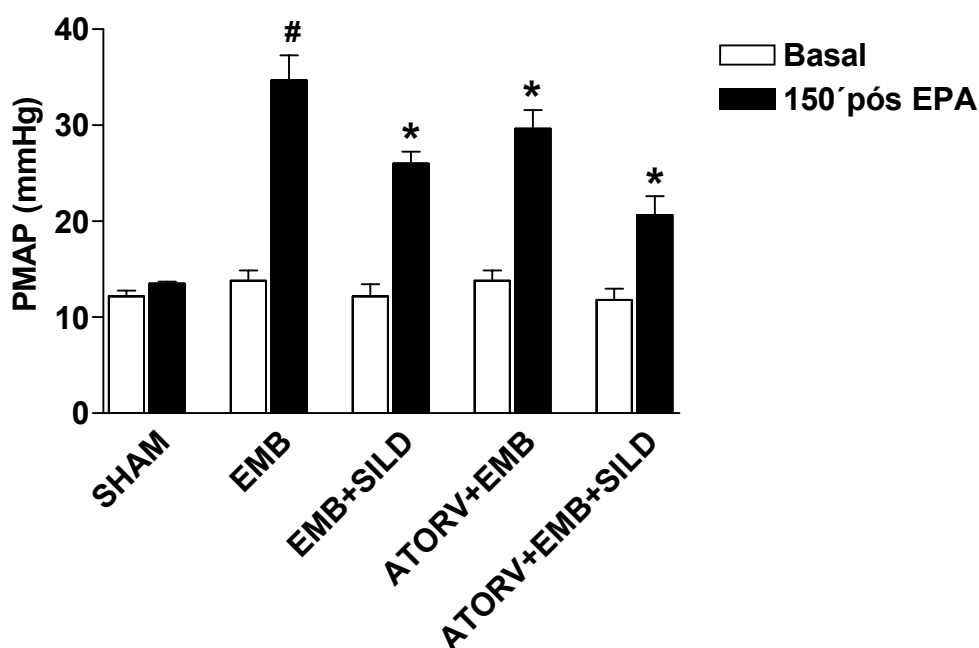


Figura 11 – Pressão Média da Artéria Pulmonar (PMAP) nos momentos basal e 150 minutos após a tromboembolia pulmonar aguda (EPA) nos grupos Sham, Emb, Emb + Sild, Atorv + Emb e Atorv + Emb + Sild. Os valores são as médias $\pm$ E.P.M. (* *versus* medidas do momento basal e # *versus* o grupo Emb + Sild e o grupo Atorv + Emb + Sild).

Tabela 8. Pressão Média da Artéria Pulmonar em mmHg					
PMAP (média $\pm$ erro padrão)					
Momentos	Grupos				
	SHAM	EMB	EMB+SILD	ATORV+EMB	ATORV+EMB+SILD
Basal	12,1 $\pm$ 0,6	13,8 $\pm$ 1,0	12,1 $\pm$ 1,2	13,8 $\pm$ 1,0	11,8 $\pm$ 1,1
150' pós EPA	13,5 $\pm$ 0,2	#34,6 $\pm$ 2,6	*26,0 $\pm$ 1,2	*29,6 $\pm$ 1,9	*20,6 $\pm$ 1,9

* *versus* medidas do momento basal e # *versus* o grupo Emb + Sild e Atorv + Emb + Sild.

A terapia com sildenafil diminuiu o IRVS em relação ao grupo embolizado e ao grupo que recebeu o pré tratamento com atorvastatina, apresentando todos $p < 0,05$, de acordo com figura 12 e tabela 9. A PMA apresentou diminuição significativa no grupo pré tratado e que recebeu a infusão de sildenafil em relação ao grupo embolizado e ao grupo pré tratado com atorvastatina, todos com $p < 0,05$, conforme apresentado na figura 13 e tabela 10.

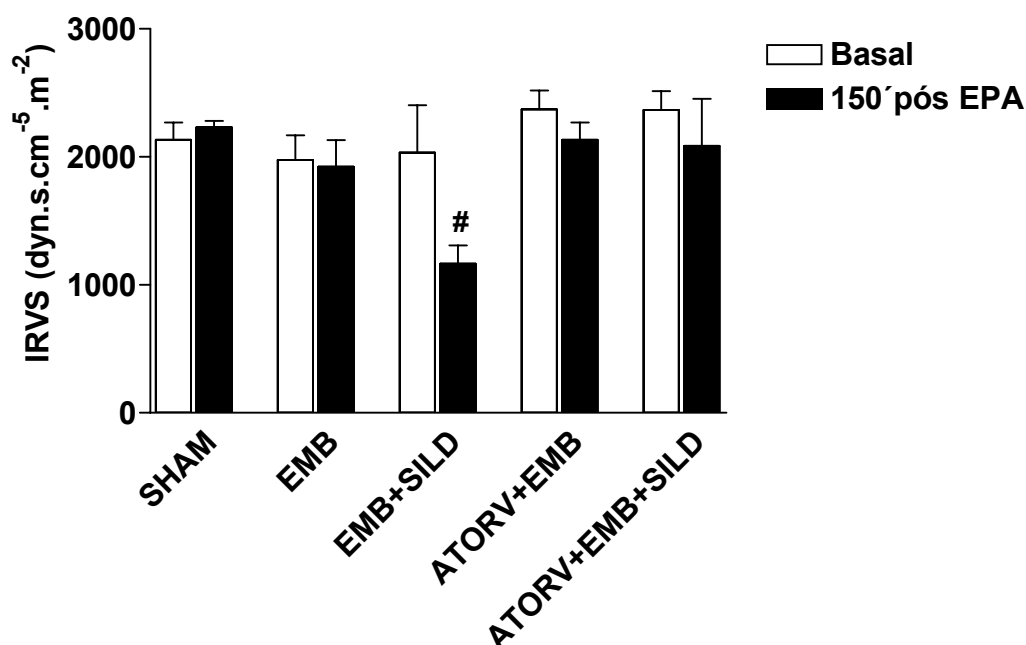


Figura 12 – Índice de Resistência Vascular Sistêmico (IRVS) nos momentos basal e 150 minutos após tromboembolia pulmonar aguda (EPA) nos grupos Sham, Emb, Emb + Sild, Atorv + Emb e Atorv + Emb + Sild. Os valores são as médias $\pm$ E.P.M. (# versus o grupo Emb e o grupo Atorv + Emb).

Tabela 9. Índice de Resistência Vascular Sistêmico em dinas.cm ⁻⁵ .m ⁻²					
IRVS (média $\pm$ erro padrão)					
Momentos	Grupos				
	SHAM	EMB	EMB+SILD	ATORV+EMB	ATORV+EMB+SILD
Basal	2134,0 $\pm$ 135,9	1976,0 $\pm$ 193,8	2035,0 $\pm$ 368,0	2372,0 $\pm$ 147,4	2366,0 $\pm$ 149,2
150' pós EPA	2230,0 $\pm$ 50,8	1925,0 $\pm$ 205,2	#1166,0 $\pm$ 142,2	2134,0 $\pm$ 135,9	2087,0 $\pm$ 365,8

versus o grupo Emb e Atorv + Emb.

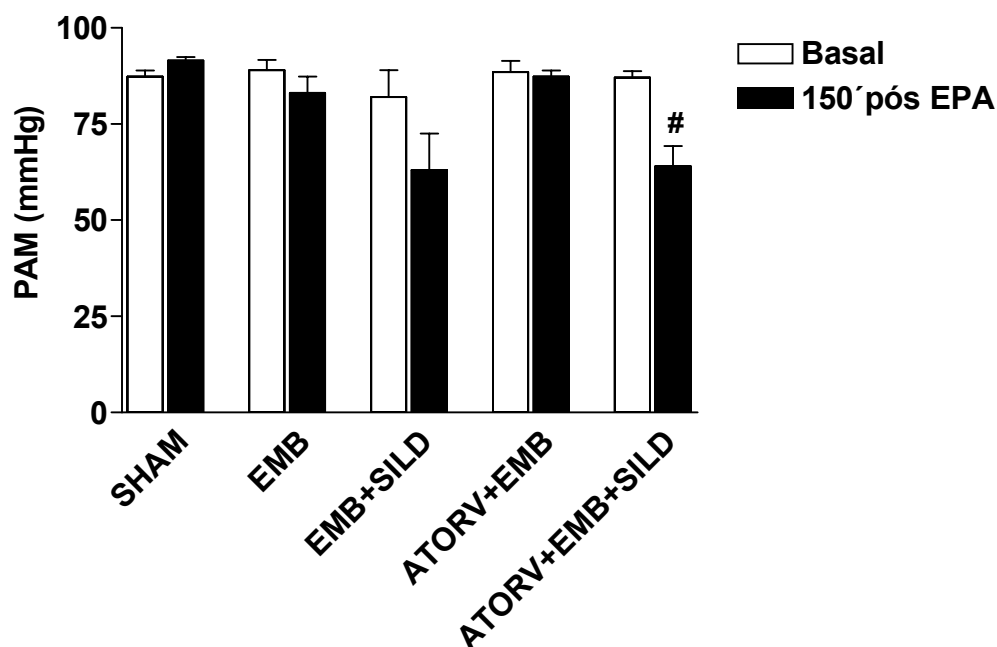


Figura 13 – Pressão Média Arterial (PMA) nos momentos basal e 150 minutos após tromboembolia pulmonar aguda (EPA) nos grupos Sham, Emb, Emb + Sild, Atorv + Emb e Atorv + Emb + Sild. Os valores são as médias $\pm$ E.P.M. (# versus o grupo Emb e o grupo Atorv + Emb).

Tabela 10. Pressão Média Arterial (PMA) em mmHg

Momentos	PMA (média $\pm$ erro padrão)				
	Grupos				
	SHAM	EMB	EMB+SILD	ATORV+EMB	ATORV+EMB+SILD
Basal	87,3 $\pm$ 1,5	89,0 $\pm$ 2,7	82,0 $\pm$ 7,0	88,5 $\pm$ 2,9	87,1 $\pm$ 1,6
150' pós EPA	91,5 $\pm$ 0,9	83,1 $\pm$ 4,1	63,0 $\pm$ 9,5	87,3 $\pm$ 1,5	# 64,0 $\pm$ 5,2

versus o grupo Emb e Atorv + Emb.

Em relação à frequência cardíaca (FC) não foram encontradas diferenças em nenhum dos grupos experimentais, o que evidenciado na figura 14 e tabela 11. A terapia com sildenafil aumentou o IC, não só em relação ao momento basal, mas também em relação ao grupo embolizado, estatisticamente $p < 0,05$, de acordo com figura 15 e tabela 12.

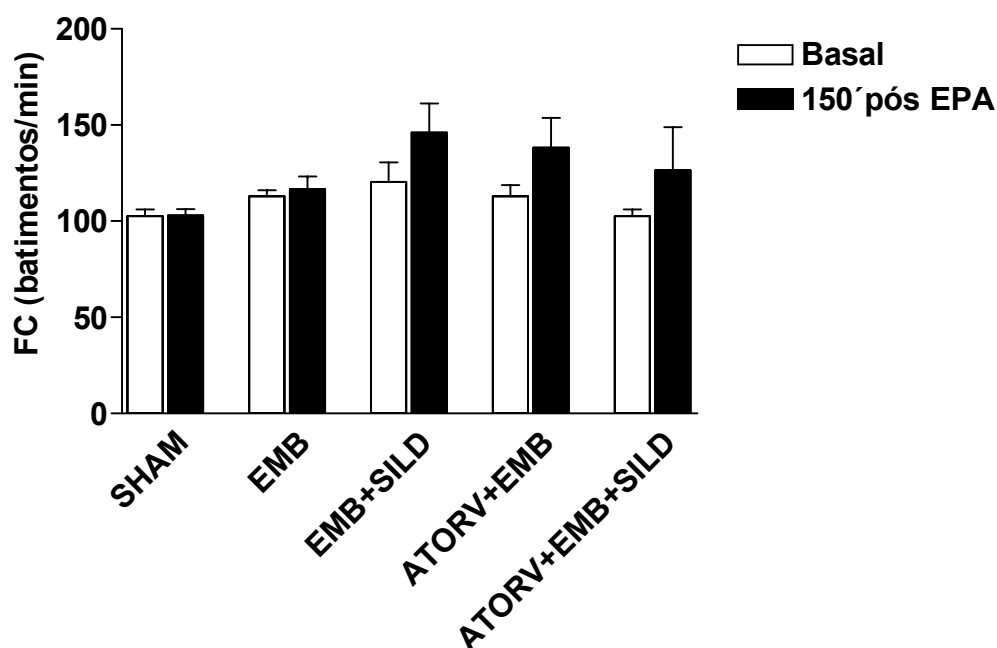


Figura 14 – Frequencia Cardíaca (FC) nos momentos basal e 150 minutos após tromboembolia pulmonar aguda (EPA) nos grupos Sham, Emb, Emb + Sild, Atorv + Emb e Atorv + Emb + Sild. Os valores são as médias $\pm$ E.P.M.

Tabela 11. Frequência Cardíaca (FC) em batimentos/minuto					
FC (média $\pm$ erro padrão)					
Momentos	Grupos				
	SHAM	EMB	EMB+SILD	ATORV+EMB	ATORV+EMB+SILD
Basal	102,5 $\pm$ 3,5	112,8 $\pm$ 3,2	120,3 $\pm$ 10,1	112,8 $\pm$ 5,8	102,5 $\pm$ 3,5
150' pós EPA	102,8 $\pm$ 3,4	116,7 $\pm$ 6,5	146,0 $\pm$ 15,2	138,2 $\pm$ 15,5	126,3 $\pm$ 22,6

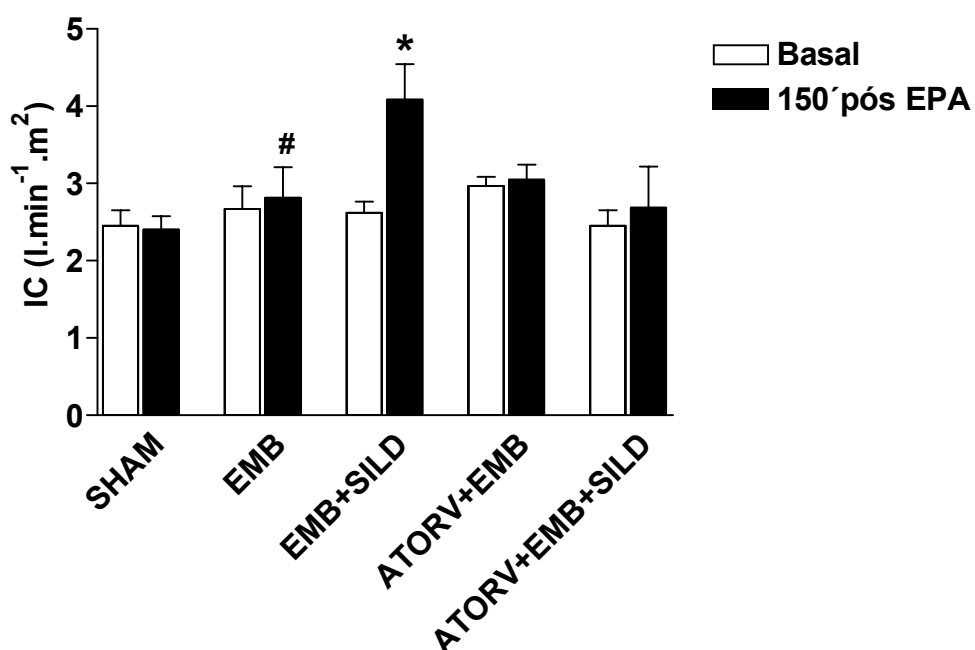


Figura 15 – Índice Cardíaco (IC) nos momentos basal e 150 minutos após tromboembolia pulmonar aguda (EPA) nos grupos Sham, Emb, Emb + Sild, Atorv + Emb e Atorv + Emb + Sild. Os valores são as médias $\pm$ E.P.M. (**versus* medidas do momento basal e # *versus* o grupo Emb + Sild).

Tabela 12. Índice Cardíaco (IC) em l.min ⁻¹ .m ²					
IC (média $\pm$ erro padrão)					
Momentos	Grupos				
	SHAM	EMB	EMB+SILD	ATORV+EMB	ATORV+EMB+SILD
Basal	2,4 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,2
150' pós EPA	2,4 $\pm$ 0,1	#2,8 $\pm$ 0,3	*4,0 $\pm$ 0,4	3,0 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,5

* *versus* medidas do momento basal e # *versus* o grupo Emb + Sild.

5.4. Dosagem plasmática do DNA livre do estudo 2

A curva padrão mostrada na figura 16 referente à dosagem do DNA livre do plasma de carneiros apresentou um *slope* de 1.935 ± 0.016 e R^2 de 0,9999.

Encontramos um aumento do DNA livre no plasma dos carneiros embolizados com coágulos autólogos na concentração de 0,5g/Kg, compatível ao grau de embolia do grupo T5. Esse aumento foi atenuado pelo tratamento com sildenafil e, resultado muito semelhante foi obtido com o pre tratamento com atorvastatina e a infusão de sildenafil. O grupo ATORV+EMB apresentou um aumento do DNA livre em relação ao momento basal, mas não inter grupos, como mostrado na figura 17 e respectiva tabela, todos $p < 0,05$.

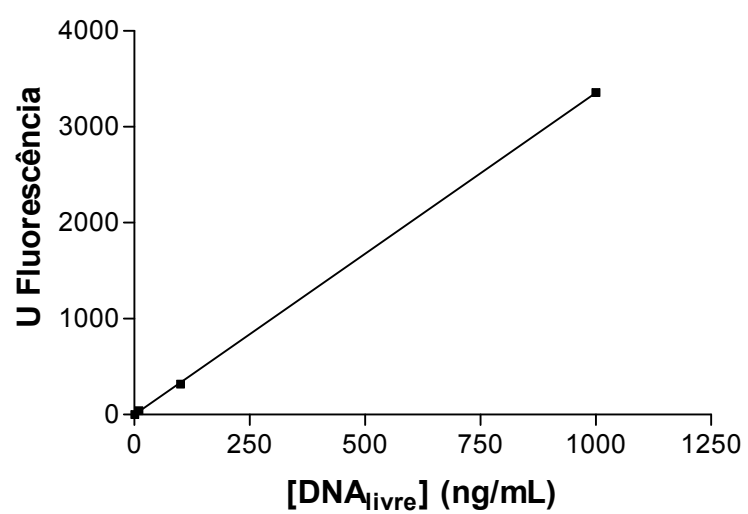


Figura 16: Curva padrão representativa da dosagem do DNA livre circulante extraído de plasma de carneiros

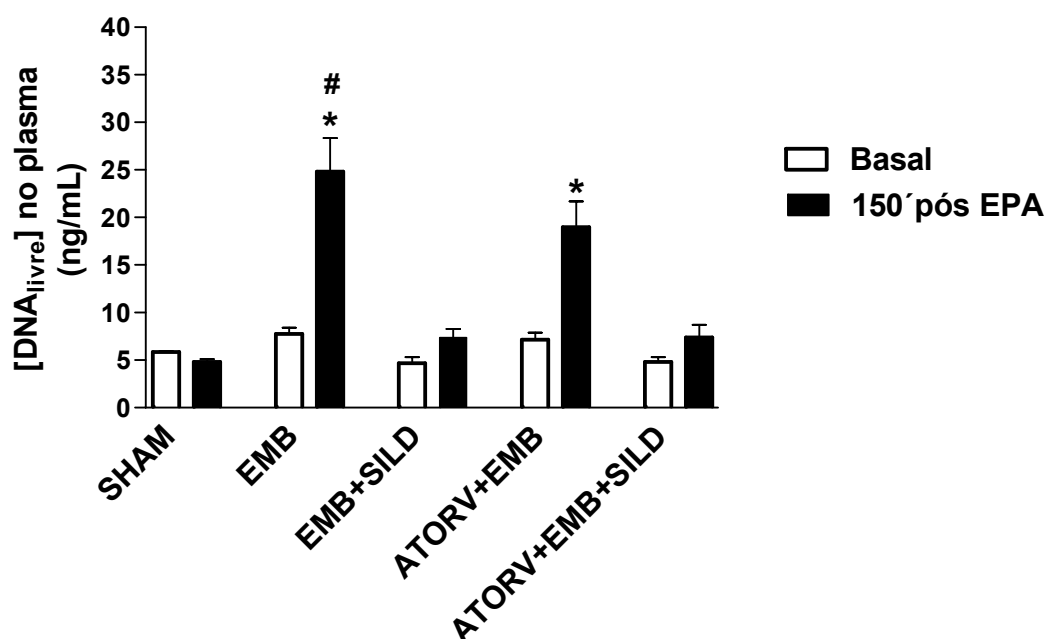


Figura 17: Concentração do DNA livre no plasma nos momentos basal e 150 minutos após a tromboembolia pulmonar aguda (EPA) nos grupos Sham, Emb, Emb + Sild, Atorv + Emb e Atorv + Emb + Sild. Os valores são as médias $\pm$ E.P.M. (**versus* medidas do momento basal e # *versus* os grupos Emb + Sild e Atorv + Emb + Sild).

Tabela 13. Concentração de DNA livre no plasma em ng/mL					
[DNA _{livre}] (média $\pm$ erro padrão)					
Momentos	Grupos				
	SHAM	EMB	EMB+SILD	ATORV+EMB	ATORV+EMB+SILD
Basal	5,8 $\pm$ 0,1	7,7 $\pm$ 0,6	4,6 $\pm$ 0,6	7,1 $\pm$ 0,7	4,8 $\pm$ 0,4
150'pós EPA	4,8 $\pm$ 0,3	#*24,8 $\pm$ 3,5	7,3 $\pm$ 0,9	*18,9 $\pm$ 2,6	7,3 $\pm$ 1,3

* *versus* medidas do momento basal e # *versus* os grupos Emb + Sild e Atorv + Emb + Sild.

5.5. Dosagem plasmática do DNA livre dos ratos pré-tratados com atorvastatina

A curva padrão mostrada na figura 18 referente à dosagem do DNA livre no plasma citratado de ratos pré-tratados com atorvastatina por 7 dias e decaptados após esse período, apresentou um *slope* de 2.291 ± 0.008 e R^2 de 1,0000.

Nesse estudo da dosagem do DNA livre com ratos *in vitro*, estimulamos a formação do trombo mediante a coleta imediata do sangue e acréscimo de trombina (1 U/mL). Não houve diferenças entre os grupos, conforme figura 19 e tabela 14. Neste estudo nenhum animal foi embolizado.

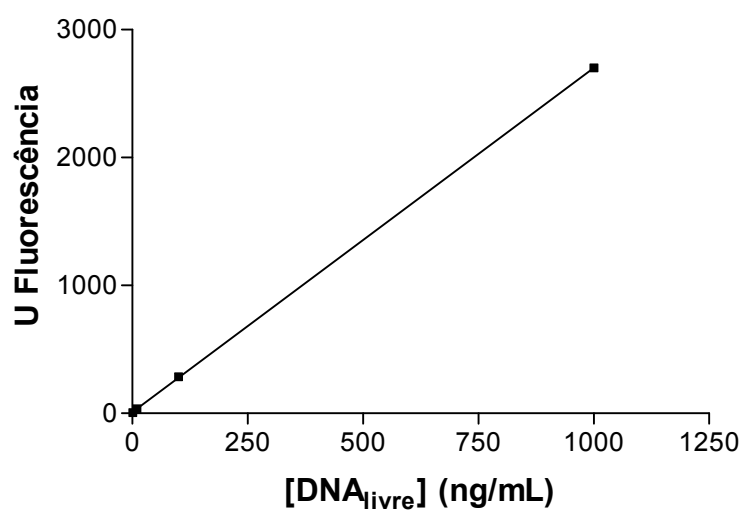


Figura 18: Curva padrão representativa da dosagem do DNA livre circulante extraído de plasma citratado de ratos

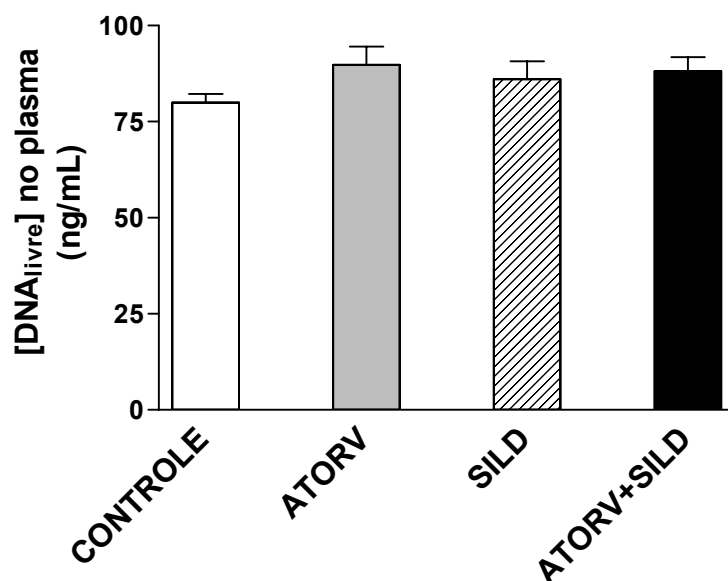


Figura 19: Concentração do DNA livre no plasma de ratos pré tratados com atorvastatina por 7 dias e que receberam ou não sildenafil subcutâneo. Os valores são as médias $\pm$ E.P.M.

Tabela 14. Concentração de DNA livre no plasma de ratos pré tratados com atorvastatina em ng/mL

[DNA_{livre}] (média $\pm$ erro padrão)

	Grupos			
	Controle	Atorv	Sild	Atorv+Sild
[DNA_{livre}]	79,9 $\pm$ 2,2	89,8 $\pm$ 4,7	86,1 $\pm$ 4,6	88,1 $\pm$ 3,6

6. DISCUSSÃO

6.1. Resultados do estudo 1 em cães

Os resultados encontrados no que diz respeito a hemodinâmica dos animais refletem muito bem as alterações encontradas na clínica da EPA [3]. O modelo de trombos autólogos usado para a indução da EPA tornou os resultados mais fidedignos com a fisiopatologia da doença, embora o modelo no qual empregamos microesferas de *Sephadex* tenha conseguido aproximar-se da realidade hemodinâmica da doença.

O aumento do IRVP (figura 1) e da PMAP (figura 2) proporcionalmente à gravidade da doença foi bem pronunciado. O mesmo ocorreu no modelo de EPA induzida com microesferas. O aumento da PMAP causado pela obstrução dos vasos pulmonares, e o aumento do IRVP, explicado não só pela obstrução dos vasos, mas também pela liberação de fatores constritores e conseqüente constrição arteriolar neurogênica [70], gerou um quadro de hipoxemia grave nos animais que receberam 5 mL de coágulo/Kg e microesferas, e tal alteração não foi revertida pela infusão de nitrito (figuras 3 e 4). O nitrito atenuou o aumento do IRVP e da PMAP, o que já foi mostrado em outros trabalhos [54, 55].

Neste estudo, enfocando principalmente a gravidade variável da EPA, foi possível a determinação da concentração de um marcador circulante no plasma com o uso de kits disponíveis no comércio e ainda, este marcador (o DNA livre) aumenta proporcional a gravidade da EPA (figura 6), uma síndrome grave marcada por sinais e sintomas não específicos. Alguns estudos já citados anteriormente [32, 35, 37]

mostraram um aumento do DNA livre no plasma de pacientes com EPA diagnosticada ou suspeita, mas nenhum deles enfocou o DNA livre como marcador de gravidade. A embolização com coágulos autólogos produziu um aumento dose dependente das concentrações do DNA livre, que foi correlacionado positivamente com o IRVP e a PMAP (figura 7).

A embolização com microesferas de *Sephadex* gerou resultados semelhantes do ponto de vista hemodinâmico. O tamanho das partículas se correlacionam positivamente com o grau de hipóxia gerado [71] e, no nosso experimento tanto o modelo de coágulos quanto o de microesferas geraram um grau de hipóxia muito semelhante (figura 3).

No que diz respeito a dosagem do DNA livre, os resultados nos dois modelos não foram semelhantes, o que nos fez refletir que o aumento da concentração do DNA livre dependia dos constituintes do trombo e não da lesão gerada pela tromboembolia. O trombo é uma estrutura complexa formado não apenas por fibrina, mas também por elementos celulares do sangue, como plaquetas, hemácias e leucócitos. As plaquetas têm um papel importante na lesão vascular inicial porque quando ativadas, se aderem à parede do vaso, agregam e secretam mediadores que ativam novas plaquetas e também mais leucócitos [72]. Possivelmente, a explicação para nossos resultados vem do fato de que o DNA livre pode ser liberado dos leucócitos. Há estudos mostrando que a concentração do DNA livre é maior no soro do que no plasma [73-75], ou seja, durante o processo de coagulação ocorre lise dos leucócitos que liberam fragmentos nucleares no soro. A concentração do DNA livre no soro aumenta significativamente durante a estocagem a 4°C justamente devido a essa lise dos leucócitos. Mais especificamente, uma subfração de linfócitos apoptóticos poderiam ser responsáveis pelo aumento do DNA. Os

linfócitos apoptóticos representam de 1 a 3% do *pool* total de linfócitos em indivíduos saudáveis. Durante a coagulação estes linfócitos podem ser mecanicamente rompidos, resultando na liberação do DNA nucleossomal no soro [75]. A proporção de concentração do DNA livre em amostras de plasma estocado é mínima comparado com o soro estocado [74]. Assim sendo, não encontramos resultados semelhantes no modelo de embolia induzido com microesferas, já que trata-se de trombos artificiais e não possuem células para liberarem o DNA.

Nossos achados com animais se alinham com os resultados obtidos no experimento *in vitro* de liberação do DNA em PBS incubado com coágulos de sangue. Nesse experimento conseguimos mostrar que o DNA livre é liberado de modo dependente da concentração do trombo, ou seja, quanto mais trombos, maior a concentração de células (principalmente leucócitos), maior a lise e maior a quantidade do DNA livre liberado no meio.

O tratamento com nitrito, conhecidamente uma droga vasodilatadora que atenua a hipertensão pulmonar associada com a EPA [54, 55], não afetou a concentração do DNA livre no plasma. Isso não significa que outros tratamentos farmacológicos já preconizados na EPA implicarão no mesmo resultado. O nitrito não está envolvido no mecanismo de liberação do DNA livre, que de acordo com nossas evidências é proveniente de células lisadas dentro do trombo.

A fisiopatologia da EPA implica uma série de eventos [70], entre os quais há ocorrência de processo inflamatório e lesão vascular. Dessa forma, não podemos afirmar que todo o DNA livre medido no estudo provém do trombo. Mediante as evidências parte dele é proveniente do trombo, mas não investigamos a presença de outras células necróticas e apoptóticas por meio de ensaios específicos e

eletroforese em gel de agarose para determinação do tamanho dos fragmentos encontrados.

A literatura ainda apresenta controvérsias com relação a origem do DNA livre circulante. Estudo *in vitro* com linhagens específicas de células evidenciou quantidades ínfimas do DNA livre quando a cultura foi exposta a um agente necrótico, enquanto a exposição a diferentes agentes apoptóticos evidenciou a liberação exacerbada de DNA no meio de cultura [44]. Por outro lado, um estudo similar mostrou que a cultura celular estimulada com agente necrótico libera quantidades consideráveis de DNA livre no meio [38]. Essas diferenças não estão claras do ponto de vista científico, mas refletem os diferentes sistemas de cultura, a sensibilidade do ensaio e a maneira pela qual a morte celular é induzida. *In vivo* o mecanismo é muito mais complexo, pois atuam em conjunto uma série de fatores hemodinâmicos e humorais.

Resultados *in vivo* e *in vitro*, sugerem que o DNA pode ser liberado por mais de um mecanismo. Células apoptóticas podem liberar diretamente o DNA, enquanto nas células necróticas, a liberação é mais complicada e depende da intervenção de outros fatores celulares e humorais [76].

O DNA livre no sangue e em outros fluidos biológicos, enquanto não clivado, apresenta propriedades funcionais que influenciam a resposta do organismo a lesão e perda tecidual. O DNA pode contribuir na progressão de uma inflamação ou lesão, pois na forma de complexos imunes pode estimular a produção de citocinas. Altas concentrações de DNA livre podem refletir a grande extensão de morte celular ou um déficit no mecanismo de *clearance* [44, 77].

No nosso modelo de embolia não sabemos se há um equilíbrio entre a liberação do DNA no plasma e o seu *clearance*. Principalmente, por se tratar de uma

situação fisiopatológica, pode ocorrer um desequilíbrio nestes mecanismos. Também não investigamos a enzima DNase I, uma das responsáveis pelo mecanismo de degradação do DNA no plasma.

6.2. Resultados do estudo 2 em carneiros

O modelo de embolia adotado no estudo com carneiros foi o de coágulos autólogos empregado no estudo com cães, referente ao nível mais grave da doença, ou seja, usamos 0,5 g/Kg, comparável ao grau de embolia do grupo T5. Para tanto, foi realizado um estudo de padronização de forma a se conseguir uma quantidade fixa de coágulos, que ao serem injetados no animal causariam uma elevação da pressão média da artéria pulmonar em 20 mmHg.

Os resultados hemodinâmicos do grupo embolizado apresentaram-se bem consistentes com as alterações encontradas na clínica da EPA, como é possível analisar nas figuras 10 e 11 com suas respectivas tabelas. O grupo SHAM não apresentou diferenças significativas ao longo da execução do estudo.

A infusão de sildenafil (0,7 mg/Kg), que apresenta efeitos vasodiladores seletivos na vasculatura pulmonar [62], foi capaz de atenuar o IRVP e a PMAP, além de aumentar o IC (figuras 10, 11 e 15 com suas respectivas tabelas), como já era esperado concordando com outros trabalhos da literatura [55, 62, 78].

Tanto o sildenafil como as estatinas podem ativar a via do NO-GMPc [79, 80]. Baseados nessa colocação verificamos que o pré-tratamento com atorvastatina por 7 dias (30 mg/Kg/dia) e o tratamento combinado com o sildenafil afetaram os parâmetros hemodinâmicos na EPA.

A ativação da enzima guanilato ciclase solúvel e subsequente aumento da biodisponibilidade do GMPc intracelular, ativa uma proteína kinase dependente de

GMP que modula proteínas alvo e inibem a contração. Assim, o sildenafil inibindo a fosfodiesterase V, responsável pela degradação do GMPc, promove o relaxamento da musculatura lisa vascular [81]. No entanto, alguns trabalhos propõem que o sildenafil possua alvos além da via NO-GMPc. O sildenafil parece influenciar a sinalização da proteína rho kinase por diminuir a expressão da proteína Rho [82]. A proteína Rho, envolvida em vias de sinalização celular, torna-se ativa durante o processo de isoprenilação, que é inibido pelas estatinas. A inibição da proteína rho aumenta a expressão da óxido nítrico sintase [79]. O possível aumento do NO previne a vasoconstrição da vasculatura pulmonar e, conseqüentemente diminuição da PMAP e IRVP, efeitos observados em nossos resultados e, intensificados quando as duas drogas foram usadas em combinação, conforme apresentado nas figuras 10 e 11. As estatinas ainda previnem o aumento de células inflamatórias, evitando o aumento da lesão endotelial vascular presente na EPA [83].

O pré-tratamento com atorvastatina não diminuiu significativamente a liberação do DNA livre. As estatinas inibirem a isoprenilação de algumas proteínas, como as proteínas Rho e Ras, ambas envolvidas em processos de sobrevivência celular. Assim, as estatinas induzem a morte celular por apoptose [84], inclusive inibindo a expressão de proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl-2 e a Bcl-xl [85].

A evidência de apoptose é reforçada por estudo prévio que associa o tratamento com estatina em ratos com hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina à diminuição da hipertrofia da camada média e oclusão da íntima, e aumento da apoptose em células do músculo liso vascular, verificado por aumento de núcleos apoptóticos pela coloração de TUNEL [86].

Ainda, as estatinas potencializam a sinalização do TNF α nas células endoteliais vasculares, importante citocina inflamatória e com efeitos pró apoptóticos

[87]. Também em miócitos, as estatinas demonstraram um aumento da sinalização do TGF β , da expressão do receptor II de TGF β e do ligante TGF β ₁. A sinalização do TGF β atua como controle negativo da Rho [88]. A estimulação de monócitos humanos com estatinas aumenta a produção de citocinas inflamatórias e a resposta das células no sítio inflamatório [89]. Esses fatos sugerem possíveis explicações para a concentração de DNA livre encontrada no grupo de animais pré-ratados com atorvastatina, possivelmente pela ocorrência da estimulação de processos apoptóticos.

Um ponto importante a se considerar no estudo com a atorvastatina é a questão da dose. Usamos a dose de 30 mg/Kg/dia, subcutânea, mas há estudo prévio enfatizando que a combinação de sildenafil (0,7 mg/Kg/dia, intraperitoneal) e atorvastatina em baixas doses (10 mg/Kg/dia, oral) foi capaz de reduzir o tamanho do infarto no músculo cardíaco [67]. Apesar de estudos prévios no nosso grupo terem mostrado resultados positivos do pré-tratamento com atorvastatina tanto com baixas doses (5 mg/Kg/dia) quanto altas (30 mg/Kg/dia) em vasorelaxamento de anéis de aorta induzido pelo sildenafil [68], nosso resultado referente à concentração do DNA livre poderia ter sido diferente se tivéssemos usado uma dose menor de atorvastatina.

O tratamento com sildenafil diminuiu significativamente a concentração do DNA livre. A combinação do pré-tratamento com atorvastatina e o sildenafil pós EPA mantiveram a concentração do DNA livre, sugestivo de um efeito protetor do sildenafil.

Estudo prévio mostrou o aumento do estresse oxidativo na EPA [90]. O estresse oxidativo é caracterizado por um aumento das substâncias oxidantes, como peróxido de hidrogênio e superóxido. Os oxidantes causam danos diretos no tecido

por oxidação de moléculas biológicas, mecanismo conhecido como peroxidação lipídica e dano direto ao DNA. A própria condição de mediadores inflamatórios presentes na EPA pode contribuir para o desenvolvimento do estresse oxidativo.

O aumento do estresse oxidativo pode diminuir a disponibilidade do óxido nítrico, reduzindo a vasodilatação induzida pelo óxido nítrico na vasculatura pulmonar [91]. E ainda, as espécies reativas do oxigênio podem induzir a morte celular via os mecanismos de peroxidação lipídica, alteração de proteínas celulares e início de diversas vias de sinalização que levam ao aumento do estresse [92].

Nesse contexto, alguns trabalhos sugerem um efeito protetor do sildenafil através de mecanismos antioxidantes que podem reduzir processos apoptóticos e necróticos em células cardíacas e outras [93-95]. O sildenafil pode ainda, proteger contra a diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico gerado por espécies reativas do oxigênio liberadas na EPA. Alguns estudos reforçam o efeito protetor do sildenafil associado com aumento do estresse oxidativo [93, 96-98]. Tais propostas de mecanismos protetores do sildenafil são compatíveis com nossos resultados, já que ocorreu uma diminuição significativa da concentração do DNA livre, talvez, por meio da inibição de processos apoptóticos ou necróticos.

O estudo de coagulação *in vitro* realizado no sangue de ratos pré-tratados com atorvastatina, não embolizados, e que receberam infusão de sildenafil ou associação, mostrou que os trombos oriundos destes diferentes grupos liberaram quantidades semelhantes de DNA, conforme apresentado na figura 19. Estes achados sugerem que a atorvastatina, o sildenafil e a associação das duas drogas não influenciam a liberação do DNA a partir dos trombos propriamente ditos.

7. CONCLUSÕES

1. O DNA livre circulante no plasma aumenta durante a EPA, tanto no modelo de indução com microesferas ou coágulos autólogo;
2. O aumento do DNA livre é modulado pela gravidade da doença no modelo de indução da EPA por coágulos autólogo, provavelmente devido ao aumento do número de trombos obstruindo os vasos pulmonares;
3. Tratamentos farmacológicos, com a atorvastatina e o sildenafil, e associação, alteram a concentração do DNA livre circulante no plasma. É sugestivo que o sildenafil exerça um papel protetor na EPA.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Wood, K.E., *Major pulmonary embolism: review of a pathophysiologic approach to the golden hour of hemodynamically significant pulmonary embolism*. Chest, 2002. **121**(3): p. 877-905.
2. Sadosty, A.T., E.T. Boie, and L.G. Stead, *Pulmonary embolism*. Emerg Med Clin North Am, 2003. **21**(2): p. 363-84.
3. Riedel, M., *Acute pulmonary embolism 1: pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis*. Heart, 2001. **85**(2): p. 229-40.
4. Riedel, M., *Acute pulmonary embolism 2: treatment*. Heart, 2001. **85**(3): p. 351-60.
5. Almahameed, A. and T.L. Carman, *Outpatient management of stable acute pulmonary embolism: proposed accelerated pathway for risk stratification*. Am J Med, 2007. **120**(10 Suppl 2): p. S18-25.
6. Bailen, M.R., J.A. Cuadra, and E. Aguayo De Hoyos, *Thrombolysis during cardiopulmonary resuscitation in fulminant pulmonary embolism: a review*. Crit Care Med, 2001. **29**(11): p. 2211-9.
7. Douketis, J.D., *Prognosis in pulmonary embolism*. Curr Opin Pulm Med, 2001. **7**(5): p. 354-9.
8. West, J.B., *How well designed is the human lung?* Am J Respir Crit Care Med, 2006. **173**(6): p. 583-4.
9. Reeves, J.T. and L.J. Rubin, *The pulmonary circulation: snapshots of progress*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(4 Pt 2): p. S101-8.
10. Elliot, C.G., *Pulmonary physiology during pulmonary embolism*. Chest, 1992. **101**: p. 163S-171S.

* Referências citadas conforme as normas de Vancouver

11. Riedel, M., *Acute pulmonary embolism 1: pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis*. Heart, 2001. **85**(2): p. 229-240.
12. Voelkel, N.F. and R.M. Tuder, *Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease?* J Clin Invest, 2000. **106**(6): p. 733-8.
13. Lualdi, J.C. and S.Z. Goldhaber, *Right ventricular dysfunction after acute pulmonary embolism: pathophysiologic factors, detection, and therapeutic implications*. Am Heart J, 1995. **130**(6): p. 1276-82.
14. Smulders, Y.M., *Contribution of pulmonary vasoconstriction to haemodynamic instability after acute pulmonary embolism. Implications for treatment?* Neth J Med, 2001. **58**(6): p. 241-7.
15. Smulders, Y.M., *Pathophysiology and treatment of haemodynamic instability in acute pulmonary embolism: the pivotal role of pulmonary vasoconstriction*. Cardiovasc Res, 2000. **48**(1): p. 23-33.
16. Sullivan, D.M., J.A. Watts, and J.A. Kline, *Biventricular cardiac dysfunction after acute massive pulmonary embolism in the rat*. J Appl Physiol, 2001. **90**(5): p. 1648-56.
17. Wood, K.E., *Major pulmonary embolism: review of a pathophysiologic approach to the golden hour of hemodynamically significant pulmonary embolism*. Chest, 2002. **121**(3): p. 877-905.
18. Liras, A., R.E. Catalan, and A.M. Martinez, *Synergistic effect of endothelin-1 and serotonin in rabbit platelets. Effect On tyrosine phosphorylation [In Process Citation]*. Thromb Res, 2000. **100**(4): p. 325-31.
19. Egermayer, P., G.I. Town, and A.J. Peacock, *Role of serotonin in the pathogenesis of acute and chronic pulmonary hypertension*. Thorax, 1999. **54**(2): p. 161-8.
20. Lee, J.H., et al., *Pathogenic role of endothelin 1 in hemodynamic dysfunction in experimental acute pulmonary thromboembolism*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(7): p. 1282-7.
21. Battistini, B., *Modulation and roles of the endothelins in the pathophysiology of pulmonary embolism*. Can J Physiol Pharmacol, 2003. **81**(6): p. 555-69.

22. Barnes, P.J. and S.F. Liu, *Regulation of pulmonary vascular tone*. Pharmacol Rev, 1995. **47**(1): p. 87-131.
23. Broeders, M.A., et al., *Endogenous nitric oxide and prostaglandins synergistically counteract thromboembolism in arterioles but not in venules [In Process Citation]*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(1): p. 163-9.
24. Liu, X., D. Bee, and G.R. Barer, *Role of nitric oxide synthase and cyclooxygenase in pulmonary vascular control in isolated perfused lungs of ferrets, rats and rabbits*. Exp Physiol, 1999. **84**(5): p. 907-16. 15: Brady TC et al. Nitric oxide inhalation trans...[PMID: 9728045]Related Articles, Links.
25. Hill, L.L. and R.G. Pearl, *Combined inhaled nitric oxide and inhaled prostacyclin during experimental chronic pulmonary hypertension*. J Appl Physiol, 1999. **86**(4): p. 1160-4.
26. Vasan, R.S., *Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations*. Circulation, 2006. **113**(19): p. 2335-62.
27. Mandel, P. and P. Metais, *[Not Available.]*. C R Seances Soc Biol Fil, 1948. **142**(3-4): p. 241-3.
28. Sorenson, G.D., et al., *Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1994. **3**(1): p. 67-71.
29. Sozzi, G., et al., *Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer*. J Clin Oncol, 2003. **21**(21): p. 3902-8.
30. Raptis, L. and H.A. Menard, *Quantitation and characterization of plasma DNA in normals and patients with systemic lupus erythematosus*. J Clin Invest, 1980. **66**(6): p. 1391-9.
31. Chang, C.P., et al., *Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction*. Clin Chim Acta, 2003. **327**(1-2): p. 95-101.
32. Vargo, J.S., et al., *Plasma DNA. A simple, rapid test for aiding the diagnosis of pulmonary embolism*. Chest, 1990. **97**(1): p. 63-8.
33. Bauer, M., et al., *A prospective analysis of cell-free fetal DNA concentration in maternal plasma as an indicator for adverse pregnancy outcome*. Prenat Diagn, 2006. **26**(9): p. 831-6.

34. Rainer, T.H., et al., *Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke*. Clin Chem, 2003. **49**(4): p. 562-9.
35. Sipes, J.N., et al., *A prospective study of plasma DNA in the diagnosis of pulmonary embolism*. Am Rev Respir Dis, 1978. **118**(3): p. 475-8.
36. Breitwieser, W.R., et al., *Plasma DNA in the diagnosis of pulmonary embolism*. Thorax, 1983. **38**(3): p. 209-11.
37. Riboldi, P., et al., *Detection of circulating DNA in plasma of patients with pulmonary embolism by counterimmunoelectrophoresis*. Respiration, 1984. **45**(1): p. 45-9.
38. Jahr, S., et al., *DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells*. Cancer Res, 2001. **61**(4): p. 1659-65.
39. Li, C.N., et al., *Cell-free DNA is released from tumor cells upon cell death: a study of tissue cultures of tumor cell lines*. J Clin Lab Anal, 2003. **17**(4): p. 103-7.
40. Stroun, M., et al., *About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release*. Clin Chim Acta, 2001. **313**(1-2): p. 139-42.
41. Nagata, S., et al., *Degradation of chromosomal DNA during apoptosis*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 108-16.
42. Nagata, S., *DNA degradation in development and programmed cell death*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 853-75.
43. Wang, B.G., et al., *Increased plasma DNA integrity in cancer patients*. Cancer Res, 2003. **63**(14): p. 3966-8.
44. Choi, J.J., C.F. Reich, 3rd, and D.S. Pisetsky, *Release of DNA from dead and dying lymphocyte and monocyte cell lines in vitro*. Scand J Immunol, 2004. **60**(1-2): p. 159-66.
45. Choi, J.J., C.F. Reich, 3rd, and D.S. Pisetsky, *The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells*. Immunology, 2005. **115**(1): p. 55-62.

46. Chen, Z., et al., *Circulation DNA: biological implications for cancer metastasis and immunology*. Med Hypotheses, 2005. **65**(5): p. 956-61.
47. Stroun, M. and P. Anker, *Circulating DNA in higher organisms cancer detection brings back to life an ignored phenomenon*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2005. **51**(8): p. 767-74.
48. Lo, Y.M., et al., *Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma*. Am J Hum Genet, 1999. **64**(1): p. 218-24.
49. Tamkovich, S.N., et al., *Circulating DNA and DNase activity in human blood*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1075**: p. 191-6.
50. Chelobanov, B.P., P.P. Laktionov, and V.V. Vlasov, *Proteins involved in binding and cellular uptake of nucleic acids*. Biochemistry (Mosc), 2006. **71**(6): p. 583-96.
51. Lundberg, J.O. and E. Weitzberg, *NO generation from nitrite and its role in vascular control*. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2005. **25**(5): p. 915-22.
52. Webb, A., et al., *Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(37): p. 13683-8.
53. Hunter, C.J., et al., *Inhaled nebulized nitrite is a hypoxia-sensitive NO-dependent selective pulmonary vasodilator*. Nat Med, 2004. **10**(10): p. 1122-7.
54. Dias-Junior, C.A., M.T. Gladwin, and J.E. Tanus-Santos, *Low-dose intravenous nitrite improves hemodynamics in a canine model of acute pulmonary thromboembolism*. Free Radic Biol Med, 2006. **41**(12): p. 1764-70.
55. Dias-Junior, C.A., et al., *Sildenafil improves the beneficial haemodynamic effects of intravenous nitrite infusion during acute pulmonary embolism*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2008. **103**(4): p. 374-9.
56. Moro, M.A., et al., *cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(4): p. 1480-5.
57. Rybalkin, S.D., et al., *Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function*. Circ Res, 2003. **93**(4): p. 280-91.

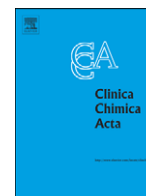
58. Shekerdemian, L.S., H.B. Ravn, and D.J. Penny, *Intravenous sildenafil lowers pulmonary vascular resistance in a model of neonatal pulmonary hypertension*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(8): p. 1098-102.
59. Zhao, L., et al., *Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension*. Circulation, 2001. **104**(4): p. 424-8.
60. Weimann, J., et al., *Sildenafil is a pulmonary vasodilator in awake lambs with acute pulmonary hypertension*. Anesthesiology, 2000. **92**(6): p. 1702-12.
61. Moreland, R.B., et al., *Sildenafil Citrate, a Selective Phosphodiesterase Type 5 Inhibitor*. Trends Endocrinol Metab, 1999. **10**(3): p. 97-104.
62. Dias-Junior, C.A., et al., *Sildenafil selectively inhibits acute pulmonary embolism-induced pulmonary hypertension*. Pulm Pharmacol Ther, 2005. **18**(3): p. 181-6.
63. Edwards, P.A. and J. Ericsson, *Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 157-85.
64. Lefer, A.M., et al., *Simvastatin preserves the ischemic-reperfused myocardium in normocholesterolemic rat hearts*. Circulation, 1999. **100**(2): p. 178-84.
65. Scalia, R., et al., *Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation, 2001. **103**(21): p. 2598-603.
66. Bonetti, P.O., et al., *Statin effects beyond lipid lowering--are they clinically relevant?* Eur Heart J, 2003. **24**(3): p. 225-48.
67. Rosanio, S., et al., *Enhanced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury with combining sildenafil with low-dose atorvastatin*. Cardiovasc Drugs Ther, 2006. **20**(1): p. 27-36.
68. Castro, M.M., et al., *Atorvastatin enhances sildenafil-induced vasodilation through nitric oxide-mediated mechanisms*. Eur J Pharmacol, 2004. **498**(1-3): p. 189-94.
69. Colucci, M., et al., *Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) does not inhibit in vitro thrombolysis by pharmacological concentrations of t-PA*. Thromb Haemost, 2001. **85**(4): p. 661-6.

70. Smulders, Y.M., *Pathophysiology and treatment of haemodynamic instability in acute pulmonary embolism: the pivotal role of pulmonary vasoconstriction*. Cardiovasc Res, 2000. **48**(1): p. 23-33.
71. Roehl, A.B., et al., *Comparison of 3 methods to induce acute pulmonary hypertension in pigs*. Comp Med, 2009. **59**(3): p. 280-6.
72. Sachs, U.J. and B. Nieswandt, *In vivo thrombus formation in murine models*. Circ Res, 2007. **100**(7): p. 979-91.
73. Jung, M., et al., *Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples*. Clin Chem, 2003. **49**(6 Pt 1): p. 1028-9.
74. Lee, T.H., et al., *Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma*. Transfusion, 2001. **41**(2): p. 276-82.
75. Thijssen, M.A., et al., *Difference between free circulating plasma and serum DNA in patients with colorectal liver metastases*. Anticancer Res, 2002. **22**(1A): p. 421-5.
76. Jiang, N., C.F. Reich, 3rd, and D.S. Pisetsky, *Role of macrophages in the generation of circulating blood nucleosomes from dead and dying cells*. Blood, 2003. **102**(6): p. 2243-50.
77. Bave, U., et al., *Activation of natural interferon-alpha producing cells by apoptotic U937 cells combined with lupus IgG and its regulation by cytokines*. J Autoimmun, 2001. **17**(1): p. 71-80.
78. Ichinose, F., et al., *Nebulized sildenafil is a selective pulmonary vasodilator in lambs with acute pulmonary hypertension*. Crit Care Med, 2001. **29**(5): p. 1000-5.
79. Laufs, U., et al., *Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors*. Circulation, 1998. **97**(12): p. 1129-35.
80. Kirsch, M., et al., *Sildenafil in hypoxic pulmonary hypertension potentiates a compensatory up-regulation of NO-cGMP signaling*. Faseb J, 2008. **22**(1): p. 30-40.

81. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical*. Circ Res, 1987. **61**(6): p. 866-79.
82. Sauzeau, V., et al., *Sildenafil prevents change in RhoA expression induced by chronic hypoxia in rat pulmonary artery*. Circ Res, 2003. **93**(7): p. 630-7.
83. Indolfi, C., et al., *Effects of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor simvastatin on smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation in vivo after vascular injury*. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(1): p. 214-21.
84. Garcia-Roman, N., et al., *Lovastatin induces apoptosis of spontaneously immortalized rat brain neuroblasts: involvement of nonsterol isoprenoid biosynthesis inhibition*. Mol Cell Neurosci, 2001. **17**(2): p. 329-41.
85. Adams, J.M. and S. Cory, *Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(1): p. 61-6.
86. Nishimura, T., et al., *Simvastatin rescues rats from fatal pulmonary hypertension by inducing apoptosis of neointimal smooth muscle cells*. Circulation, 2003. **108**(13): p. 1640-5.
87. Tang, D., et al., *Simvastatin potentiates tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis of human vascular endothelial cells via the inhibition of the geranylgeranylation of RhoA*. Life Sci, 2006. **79**(15): p. 1484-92.
88. Park, H.J. and J.B. Galper, *3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors up-regulate transforming growth factor-beta signaling in cultured heart cells via inhibition of geranylgeranylation of RhoA GTPase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11525-30.
89. Kiener, P.A., et al., *Stimulation of inflammatory responses in vitro and in vivo by lipophilic HMG-CoA reductase inhibitors*. Int Immunopharmacol, 2001. **1**(1): p. 105-18.
90. Dias-Junior, C.A., et al., *The effect of sildenafil on pulmonary embolism-induced oxidative stress and pulmonary hypertension*. Anesth Analg, 2005. **101**(1): p. 115-20, table of contents.
91. Bowers, R., et al., *Oxidative stress in severe pulmonary hypertension*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **169**(6): p. 764-9.

92. Chiu, J., et al., *Oxidative stress-induced, poly(ADP-ribose) polymerase-dependent upregulation of ET-1 expression in chronic diabetic complications*. Can J Physiol Pharmacol, 2008. **86**(6): p. 365-72.
93. Abdollahi, M., et al., *Protection by sildenafil and theophylline of lead acetate-induced oxidative stress in rat submandibular gland and saliva*. Hum Exp Toxicol, 2003. **22**(11): p. 587-92.
94. Das, A., L. Xi, and R.C. Kukreja, *Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling*. J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 12944-55.
95. Salloum, F.N., et al., *Sildenafil (Viagra) attenuates ischemic cardiomyopathy and improves left ventricular function in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(3): p. H1398-406.
96. Sandera, P., et al., *8-Br-cyclic GMP given during reperfusion improves post-transplant lung edema and free radical injury*. J Heart Lung Transplant, 2000. **19**(2): p. 173-8.
97. Hillinger, S., et al., *8-Br-cGMP is superior to prostaglandin E1 for lung preservation*. Ann Thorac Surg, 1999. **68**(4): p. 1138-42; discussion 1143.
98. Perk, H., et al., *Sildenafil citrate as a phosphodiesterase inhibitor has an antioxidant effect in the blood of men*. J Clin Pharm Ther, 2008. **33**(6): p. 635-40.

APÊNDICE



Circulating cell-free DNA levels in plasma increase with severity in experimental acute pulmonary thromboembolism

Juliana A. Uzuelli^a, Carlos A.C. Dias-Junior^a, Tatiane C. Izidoro-Toledo^a,
Raquel F. Gerlach^b, Jose E. Tanus-Santos^{a,*}

^a Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900, Ribeirao Preto, SP, Brazil

^b Department of Morphology, Estomatology, and Physiology, Dental School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Av. do Cafe, S/N, 14040-904, Ribeirao Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 August 2009

Received in revised form 4 September 2009

Accepted 4 September 2009

Available online 13 September 2009

Keywords:

Acute pulmonary embolism

Markers

Circulating DNA

ABSTRACT

Background: The diagnosis of acute pulmonary thromboembolism (APT) and its severity is challenging. No previous study has examined whether there is a linear relation between plasma DNA concentrations and the severity of APT. We examined this hypothesis in anesthetized dogs. We also examined the changes in plasma DNA concentrations in microspheres lung embolization and whether the therapy of APT with nitrite could modify APT-induced changes in plasma DNA concentrations. *In vitro* DNA release from blood clots was also studied.

Methods: APT was induced with autologous blood clots (saline, 1, 3, or 5 ml/kg) injected into the right atrium. A group of dogs received 300 μ m microspheres into the inferior vena cava to produce similar pulmonary hypertension. Another group of dogs received 6.75 μ mol/kg nitrite after APT with blood clots of 5 ml/kg. Hemodynamic evaluations were carried out for 120 min. DNA was extracted from plasma samples using QIAamp DNA Blood Mini Kit and quantified using Quant-iTTM PicoGreen[®] dsDNA detection kit at baseline and 120 min after APT.

Results: APT produced dose-dependent increases in plasma DNA concentrations, which correlated positively with pulmonary vascular resistance ($P=0.002$, $r=0.897$) and with mean pulmonary arterial pressure ($P=0.006$, $r=0.856$). Conversely, lung embolization with microspheres produced no significant changes in plasma DNA concentrations. While nitrite attenuated APT-induced pulmonary hypertension, it produced no changes in plasma DNA concentrations. Blood clots released dose-dependent amounts of DNA *in vitro*.

Conclusions: Cell-free DNA concentrations increase in proportion to the severity of APT, probably as a result of increasing amounts of thrombi obstructing the pulmonary vessels.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Acute pulmonary thromboembolism (APT) is a high morbidity and mortality disease [1,2] with an incidence of 1 per 1000 individuals in a year [3]. This condition most commonly results from the migration of deep venous thrombi to the lungs, which obstruct the pulmonary vessels and may lead to acute right heart failure and circulatory shock [4]. Most deaths directly attributable to acute pulmonary embolism occur before a precise diagnosis is made and effective therapy is implemented.

Although the clinical setting is very helpful in suggesting the diagnosis of APT, the differential diagnosis is broad, thus making the specific diagnosis of APT very challenging [1,2]. While the gold standard test for establishing the definitive diagnosis of APT is selective pulmonary angiography [2], this test is inconvenient and risky. Therefore many studies have been carried out to identify biomarkers to aid clinical

assessment [5], especially of high-risk patients [6]. Indeed, there is an extensively researched algorithm to exclude APT/deep venous thrombosis in adult humans [7], which lack specificity. To improve the ability of the clinician to optimally manage the patient, one of the desirable features for a biomarker is a linear relation between change in biomarker and disease severity [6].

The circulating concentrations of cell-free DNA have been studied as a novel biomarker in a variety of disease conditions. For example, increased plasma or serum DNA concentrations were shown in cancer, systemic lupus erythematosus, myocardial infarction, and in pregnancy-associated disorders [8–11]. Interestingly, it is possible that plasma DNA concentrations increase in proportion with the severity of disease conditions, as it has been suggested in patients with stroke [12]. However, while previous studies showed that increased plasma DNA concentrations had a sensitivity of 82% and a specificity of 85% to detect APT [13], no previous study has examined whether there is a linear relation between the increases in plasma DNA concentrations and the severity of APT. Examining this question is relevant because it helps to predict mortality and morbidity associated with APT.

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3602 3163; fax: +55 16 3633 2301.

E-mail addresses: tanus@fmrp.usp.br, tanussantos@yahoo.com (J.E. Tanus-Santos).

In the present study, we hypothesized that the increases in plasma cell-free DNA concentrations after APT are dependent on the severity of this disease. Therefore, the main purpose of the present study was to test this hypothesis in the setting of experimental APT with variable severity. We have also examined whether the therapy of APT with a drug (nitrite) known to produce hemodynamic improvements during APT [14–16] could modify APT-induced changes in plasma DNA concentrations.

2. Materials and methods

2.1. Animal models and hemodynamic measurements

All animals received humane care and study protocols complied with the guidelines and were approved by the ethics committee for the use of experimental animals of the Faculty of Medicine of Ribeirao Preto. We used a whole animal model of APT [14] to study whether plasma DNA concentrations serve as an indicator of the APT severity. Forty-four mongrel dogs (12.3 to 16.5 kg) of both sexes were anesthetized with ketamine (10–15 mg/kg, i.m.) and xylazine (1.5 mg/kg, i.m.), and relaxed with pancuronium (0.1 mg/kg, i.v.). Following tracheal intubation, they were mechanically ventilated with room air using a volume-cycled ventilator (C.F. Palmer, London, UK). The tidal volume was set at 15 ml/kg and the respiratory rate was adjusted to maintain physiologic arterial carbon dioxide tensions. Anesthesia was maintained with an intramuscular injection of ketamine (3 mg/kg) and xylazine (0.3 mg/kg) every 30 min [17]. Fluid-filled catheters were placed into the left femoral artery and right femoral vein for mean arterial pressure monitoring via a pressure transducer and fluid administration, respectively. A 7.5F balloon-tipped pulmonary artery thermodilution catheter was placed into the pulmonary artery via the left femoral vein. The catheter was connected to pressure transducers to allow the monitoring of mean pulmonary artery pressure (MPAP), central venous pressure, and pulmonary capillary wedge pressure [18]. Thermodilution cardiac output measurements were determined in triplicate by injecting 3 ml of saline and the results recorded (DX2010 Dixtal Monitor Dixtal, Dixtal do Brasil, Manaus, Brazil) [19]. The coefficient of variation for cardiac output measurements was below 5%. The heart rate was measured using a surface electrocardiogram (lead I). A venous blood sample (5 ml/kg) was collected and allowed to clot for at least 60 min, then cut into 2- to 3-mm cubes. After a 20-min stabilization, baseline hemodynamics was measured. Then APT was induced by infusing the clots for 5–10 min via a large-bore cannula placed in the right atrium. The animals were assigned to one of four experimental groups: a group of Sham operated animals ($n=6$) received only saline infusions; the dogs in T1, T3, and T5 groups ($n=6$, 6, and 8, respectively) were embolized with clots produced from 1, 3, and 5 ml/kg autologous blood respectively.

The study of the four experimental groups described above would allow us to learn whether the DNA concentrations increase with the severity of APT. However, we thought it would be interesting to study whether the therapy of APT with nitrite (a drug which improved the hemodynamic conditions during experimental APT) [14,15] affects APT-induced changes in plasma DNA concentrations. Therefore, we studied another group of dogs named T5 + nitrite group ($n=6$), which received 6.75 $\mu\text{mol/kg}$ nitrite over 15 min followed by a maintenance infusion of 0.28/kg/min for the duration of the study [14,15].

There is no reliable information describing the origin of increased plasma DNA concentrations after APT. While this DNA may obviously originate from pulmonary vascular cells, blood cells forming blood clots may also be a source of increased circulating DNA concentrations after APT. Therefore, we decided to study another group of embolized dogs to examine the changes in plasma DNA concentrations associated with another model of APT in which the emboli obstructing the pulmonary vessels are not made of blood clots. We examined the effects produced by the infusion of microspheres in a group of dogs (microspheres group; $n=12$) which received repeated injections

(every 30 s) of 300 μm microspheres (Sephadex G50; Pharmacia Fine Chemicals; Uppsala, Sweden) into the inferior vena cava over 5–10 min. The amount of microspheres infused in each dog was adjusted to induce an increase of 20 mm Hg in MPAP, as previously described [18,19]. The 20 mm Hg increase in MPAP is very similar to the increase in MPAP induced by 5 ml/kg autologous blood in the T5 group described above, thus allowing reliable comparisons between these 2 APT models.

Hemodynamic evaluation was performed 120 min after APT. The cardiac index and pulmonary vascular resistance index (PVRI) were calculated by standard formulae. Arterial blood samples were drawn at baseline and 120 min after APT for blood gas analysis with a blood gas analyser (Stat Profile 5 Analyser; Biomedical, Waltham, MA). Venous blood samples were collected at baseline and 120 min after APT into tubes containing EDTA, and plasma samples were stored at -70°C until assayed for the circulating DNA as detailed below.

2.2. Extraction and quantification of plasma DNA concentrations

The cell-free circulating DNA was extracted from 500 μl of plasma samples using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The method principle is based on specific binding of the DNA to the QIAamp silica-gel membrane while the contaminants pass through it. We followed the instructions according to the protocol for body fluids recommended by the manufacturer. Quantification of DNA was carried out in triplicate using Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA detection kit (Molecular Probes, Eugene OR). Briefly, 50 μl of final eluted DNA were mixed with PicoGreen reagent (1:1) according the manufacturer's instructions. The DNA concentrations in the standard curve ranged from 0 to 1000 ng/ml. Fluorescence intensity was measured on a spectrofluorometer (Spectra Max Gemini EM, Molecular Devices, Sunnyvale, PA) at an emission wavelength of 520 nm and excitation of 480 nm.

2.3. In vitro experiments with clots

To further improve our understanding of the possible origin of increased plasma DNA concentrations after APT, we examined whether blood clots release of DNA *in vitro* in a dose-dependent manner. We prepared blood clots ($n=6$) with venous blood samples drawn from dogs, which were allowed to clot for at least 60 min and then cut into 2- to 3-mm cubes, as described above. The clots were washed 3 times with phosphate buffered saline (PBS) and then were used to prepare 4 clot mixtures containing 0, 10, 20, or 40 mg of clots/ml PBS. These clot mixtures were incubated at 37°C for 2 h. After that, the mixtures were centrifuged for 5 min at $14,000\times g$, and the supernatants were collected. The cell-free DNA concentrations were measured in the supernatants as described above.

2.4. Statistical analysis

The results are expressed as means $\pm$ S.E.M. Comparisons among groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student–Newman–Keuls test (StatView for Windows, Cary, NC). Student paired *t* tests were used to determine within groups changes. The Pearson correlation (*r*, *P*) was calculated for associations between hemodynamic parameters and cell-free circulating DNA. A $P<0.05$ was considered the minimum level of statistical significance.

3. Results

Baseline hemodynamic and respiratory parameters were similar in all experimental groups (Fig. 1). We found no significant hemodynamic and respiratory changes in Sham operated animals throughout the study period (Fig. 1). Conversely, lung embolization increased MPAP and PVRI in T1, T3, and T5 groups proportionally to the severity

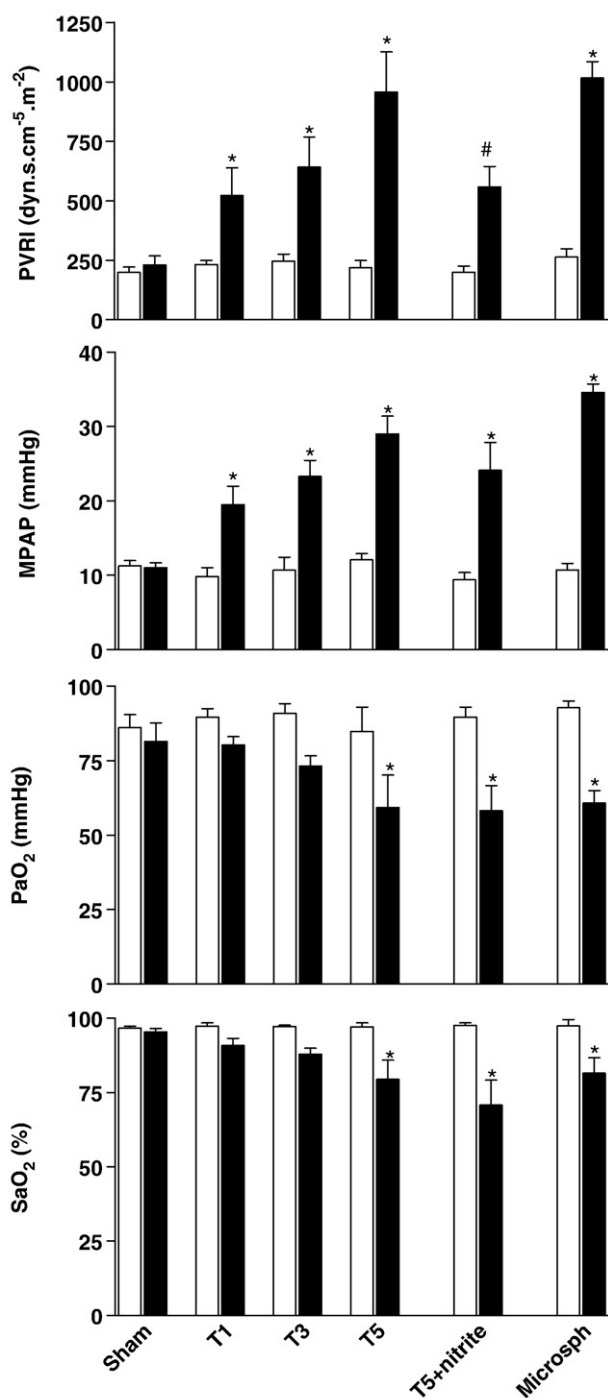


Fig. 1. Pulmonary vascular resistance index (PVRI), mean pulmonary arterial pressure (MPAP), arterial O₂ pressure (PaO₂), and arterial O₂ saturation (SaO₂) at baseline (white bars) and 120 min after acute pulmonary thromboembolism (black bars) in Sham, T1, T3, T5, T5 + nitrite, and microspheres groups. Values are the means $\pm$ S.E.M. * P < 0.05 vs measurements at baseline. # P < 0.05 vs measurements at baseline, and vs the T5 group.

of APT (P < 0.05; Fig. 1). As expected, lower increases in PVRI were found in the T5 + nitrite group, as compared with the T5 group (Fig. 1; both P < 0.05). However, the dogs embolized with microspheres showed similar increases in MPAP and PVRI as compared with respective increases found in the T5 group (Fig. 1). Arterial blood gas analysis showed significant reductions in arterial O₂ pressure and saturation in the T5, T5 + nitrite, and in the microspheres groups (P < 0.05; Fig. 1).

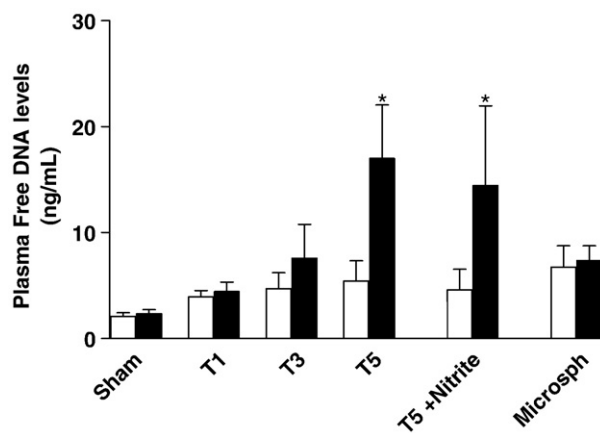


Fig. 2. Plasma DNA concentrations at baseline (white bars) and 120 min after acute pulmonary thromboembolism (black bars) in Sham, T1, T3, T5, T5 + nitrite, and microspheres groups. Values are the means $\pm$ S.E.M. * P < 0.05 vs measurements at baseline.

We found that APT produced dose-dependent increases in plasma DNA concentrations, with significant increases being found in the T5 group (P < 0.05; Fig. 2). While DNA concentrations tended to increase in the T1 and T3 groups, these increases have not reached statistical significance (P > 0.05). Interestingly, the plasma DNA concentrations

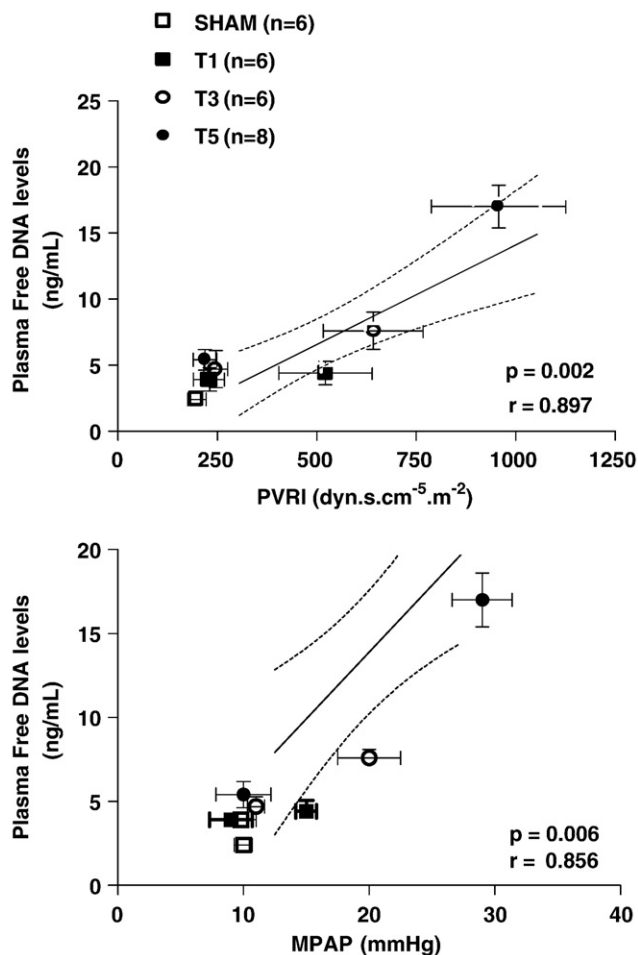


Fig. 3. Positive correlations between plasma DNA concentrations and pulmonary vascular resistance index (PVRI) or mean pulmonary arterial pressure (MPAP). The regression lines and the 95% confidence intervals were plotted. r : Pearson's correlation coefficient.

correlated positively with PVRI (Fig. 4; $P=0.002$, $r=0.897$) and with MPAP (Fig. 4; $P=0.006$, $r=0.856$) in embolized dogs.

While the nitrite infusion attenuated the increases in PVRI, this drug did not affect the increases in circulating DNA levels associated with APT, as revealed by the similar increases in plasma DNA concentrations in the T5 and T5 + nitrite groups ($P>0.05$; Fig. 3). Although we found similar increases in MPAP and in PVRI in the microspheres and in the T5 groups, we found no significant increases in plasma DNA concentrations in the microspheres group (Fig. 2; $P>0.05$). Finally, we found that blood clots released dose-dependent amounts of DNA after 2 h of incubation ($P<0.05$; Fig. 4).

4. Discussion

The main novel findings of this study were that: (i) plasma DNA concentrations increase in proportion to the severity of APT; (ii) the increases in plasma DNA concentrations after APT are probably not affected by vasodilator therapy; and (iii) the blood clots are probably the origin of increased circulating DNA concentrations after APT.

APT is clearly a very challenging condition that is often encountered at the emergency room. This condition typically involves non-specific signs and symptoms, thus making APT a very difficult diagnosis. Unfortunately, despite our improved diagnostic technologies, the antemortem diagnosis of PE is less than one third of cases [20]. However, an early diagnosis may allow immediate, more effective therapy, especially in more severe cases. Indeed, the development of right heart failure and circulatory shock secondary to a massive increase in pulmonary vascular resistance requires prompt diagnosis and management because it is associated with bad prognosis [20]. The significant increases in MPAP and in PVRI reported in the present study are consistent with the hemodynamic alterations commonly reported in clinical APT [21]. Importantly, we were able to assess hemodynamic and biochemical alterations associated with APT of variable severity.

We found that lung embolization with blood clots produced dose-dependent increases in plasma DNA concentrations, which correlated positively with MPAP and PVRI. While few previous studies had shown increased plasma DNA concentrations during APT [13,22,23], our findings suggest that the circulating DNA levels may reflect APT severity. Interestingly, we found that lung embolization with microspheres producing similar increases in MPAP and in PVRI caused no significant increases in plasma DNA concentrations, thus suggesting that the increases in plasma DNA concentrations depend on the constituents of the thrombi. Our findings suggest that DNA may be released from white blood cells within the thrombi, which may

release DNA during the coagulation process [24]. This suggestion is supported by recent findings showing much higher concentrations of cell-free DNA in serum samples compared with those found in plasma samples [24]. These increases in serum compared with plasma were attributed to DNA release from lysed white blood cells after clotting [24]. Therefore, it is probable that we found no increases in circulating DNA concentrations after lung embolization with microspheres because these artificial emboli have no cells to release DNA. In support of this hypothesis, we found that the same thrombi used to induce APT in T1, T3, and T5 groups produced dose-dependent release of DNA when incubated for 2 h with PBS. These *in vitro* experiments provided unequivocal evidence indicating that the thrombi may release DNA in a dose-dependent manner.

To our knowledge, this is the first study showing that plasma free DNA increases after APT in proportion to MPAP and PVRI, which is a major determinant of right ventricle workload. Moreover, we found that therapy of APT with nitrite (a drug that attenuated the pulmonary hypertension associated with APT [14,15]) produced no effects on APT-induced increases in plasma DNA concentrations. These results are consistent with the hypothesis discussed above, which suggests that DNA originates from lysed cells within the thrombi. It is not clear, however, if other drugs including anticoagulants or fibrinolytic drugs may affect the circulating DNA concentrations in APT patients. This issue is very relevant because it is not uncommon that APT patients receive aggressive resuscitation therapy during the evaluation period [20].

In the present study, we have not defined the precise origin of increased plasma DNA concentrations after APT. In addition to the thrombi, other sources may include damaged lung tissue, which may release DNA as a result of cellular necrosis or apoptosis [25,26]. Furthermore, we have not examined the contribution of impaired DNA clearance as another possible mechanism that has been implicated in other conditions [27,28]. Finally, we acknowledge that the DNA analysis carried out in the present study takes at least 4–6 h. Therefore the emergency use of this diagnostic tool may be some way off. However, new technologies to measure DNA concentrations may be much faster than the techniques used in the present study. In addition, the lack of specificity of DNA concentrations in plasma for the diagnosis of specific conditions may limit the utility of this biomarker.

In conclusion, we found that cell-free DNA concentrations increase in proportion to the severity of APT, probably as a result of increasing amounts of thrombi obstructing the pulmonary vessels. These findings may be relevant for patients with APT and needs clinical validation.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- [1] Sadosty AT, Boie ET, Stead LG. Pulmonary embolism. *Emerg Med Clin North Am* 2003;21:363–84.
- [2] Goldhaber SZ. Pulmonary embolism. *Lancet* 2004;363:1295–305.
- [3] Stein PD, Hull RD, Ghali WA, et al. Tracking the uptake of evidence: two decades of hospital practice trends for diagnosing deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *Arch Intern Med* 2003;163:1213–9.
- [4] Layish DT, Tapson VF. Pharmacologic hemodynamic support in massive pulmonary embolism. *Chest* 1997;111:218–24.
- [5] Uzuelli JA, Dias-Junior CA, Tanus-Santos JE. Severity dependent increases in circulating cardiac troponin I and MMP-9 concentrations after experimental acute pulmonary thromboembolism. *Clin Chim Acta* 2008;388:184–8.
- [6] Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation* 2006;113:2335–62.
- [7] Kruip MJ, Slob MJ, Schijen JH, van der Heul C, Buller HR. Use of a clinical decision rule in combination with D-dimer concentration in diagnostic workup of patients with suspected pulmonary embolism: a prospective management study. *Arch Intern Med* 2002;162:1631–5.

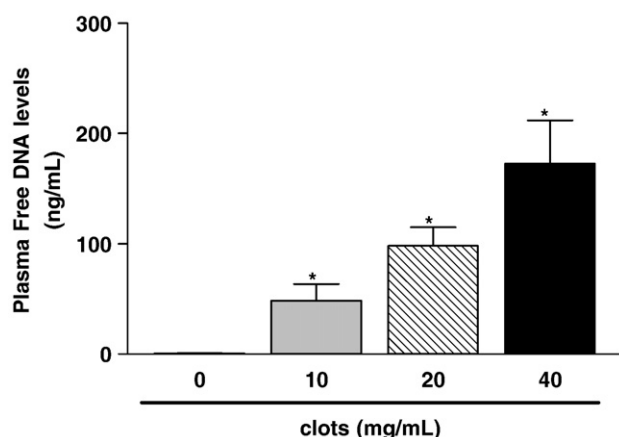


Fig. 4. Blood clots release dose-dependent amounts of DNA. Clot mixtures containing 0, 10, 20, or 40 mg of clots/ml PBS were incubated at 37 °C for 2 h. The bars show the cell-free DNA concentrations measured in the supernatants. Values are the means $\pm$ S.E.M. * $P<0.05$ vs 0 mg/ml.

- [8] Bauer M, Hutterer G, Eder M, et al. A prospective analysis of cell-free fetal DNA concentration in maternal plasma as an indicator for adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn* 2006;26:831–6.
- [9] Chang CP, Chia RH, Wu TL, Tsao KC, Sun CF, Wu JT. Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 2003;327:95–101.
- [10] Raptis L, Menard HA. Quantitation and characterization of plasma DNA in normals and patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1980;66:1391–9.
- [11] Sozzi G, Conte D, Leon M, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:3902–8.
- [12] Rainer TH, Wong LK, Lam W, et al. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin Chem* 2003;49:562–9.
- [13] Vargo JS, Becker DM, Philbrick JT, Schoonover FW, Davis JS. Plasma DNA. A simple, rapid test for aiding the diagnosis of pulmonary embolism. *Chest* 1990;97:63–8.
- [14] Dias-Junior CA, Gladwin MT, Tanus-Santos JE. Low-dose intravenous nitrite improves hemodynamics in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. *Free Radic Biol Med* 2006;41:1764–70.
- [15] Dias-Junior CA, Montenegro MF, Florencio BC, Tanus-Santos JE. Sildenafil improves the beneficial haemodynamic effects of intravenous nitrite infusion during acute pulmonary embolism. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;103:374–9.
- [16] Dias-Junior CA, Cau SB, Oliveira AM, et al. Nitrite or sildenafil, but not BAY 41–2272, blunt acute pulmonary embolism-induced increases in circulating matrix metalloproteinase-9 and oxidative stress. *Thromb Res* 2009;124:349–55.
- [17] Dias-Junior CA, Tanus-Santos JE. Hemodynamic effects of sildenafil interaction with a nitric oxide donor compound in a dog model of acute pulmonary embolism. *Life Sci* 2006;79:469–74.
- [18] Dias-Junior CA, Vieira TF, Moreno Jr H, Evora PR, Tanus-Santos JE. Sildenafil selectively inhibits acute pulmonary embolism-induced pulmonary hypertension. *Pulm Pharmacol Ther* 2005;18:181–6.
- [19] Dias-Junior CA, Souza-Costa DC, Zerbini T, da Rocha JB, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. The effect of sildenafil on pulmonary embolism-induced oxidative stress and pulmonary hypertension. *Anesth Analg* 2005;101:115–20 table of contents.
- [20] Wood KE. Major pulmonary embolism: review of a pathophysiologic approach to the golden hour of hemodynamically significant pulmonary embolism. *Chest* 2002;121:877–905.
- [21] Riedel M. Acute pulmonary embolism 1: pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis. *Heart* 2001;85:229–40.
- [22] Barada Jr FA, Suratt PM, St Davis J, et al. Free plasma DNA in patients with pulmonary embolism. *South Med J* 1980;73:345–6 350.
- [23] Riboldi P, Asero R, Marazzini L, et al. Detection of circulating DNA in plasma of patients with pulmonary embolism by counterimmunoelectrophoresis. *Respiration* 1984;45:45–9.
- [24] Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion* 2001;41:276–82.
- [25] Li CN, Hsu HL, Wu TL, Tsao KC, Sun CF, Wu JT. Cell-free DNA is released from tumor cells upon cell death: a study of tissue cultures of tumor cell lines. *J Clin Lab Anal* 2003;17:103–7.
- [26] Dalen JE, Haffajee CI, Alpert 3rd JS, Howe JP, Ockene IS, Paraskos JA. Pulmonary embolism, pulmonary hemorrhage and pulmonary infarction. *N Engl J Med* 1977;296:1431–5.
- [27] Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* 2001;313:139–42.
- [28] van der Vaart M, Pretorius PJ. Circulating DNA. Its origin and fluctuation. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1137:18–26.

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](#)