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

Juliana Alves Uzuelli

Alterações das concentrações plasmáticas de troponina I e de metaloproteinases 2 e 9 da matriz extracelular após embolia aguda em cães

RIBEIRÃO PRETO - SP 2008

Juliana Alves Uzuelli

Alterações das concentrações plasmáticas de troponina I e de metaloproteinases 2 e 9 da matriz extracelular após embolia aguda em cães

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

RIBEIRÃO PRETO – SP 2008 AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha Catalográfica

Uzuelli, Juliana Alves

Alterações das concentrações plasmáticas de troponina I e de metaloproteinases 2 e 9 da matriz extracelular após embolia aguda em cães/ Juliana Alves Uzuelli; orientador Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos. Ribeirão Preto, 2008 85 p.

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

Palavras-chaves: embolia pulmonar aguda, metaloproteinases da matriz extracelular, zimografia, troponina, marcadores.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Alves Uzuelli

Alterações das concentrações plasmáticas de troponina I e de metaloproteinases 2 e 9 da matriz extracelular após embolia aguda em cães

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

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em: 07 de fevereiro de 2008

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Instituição: FMRP-USP Assinatura:

Prof. Dr. José Antonio Baddini Martinez

Instituição: FMRP-USP Assinatura:

Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

Instituição: FOP-UNICAMP 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.

Ao meu querido avô materno, Altino Idelfonso Alves, que sempre acreditou na minha força de vontade em alcançar os meus objetivos.

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 membros da minha banca, Prof. Dr. Baddini e Prof. Dr. Sérgio Line por aceitarem o convite para participar e contribuir para minha formação.

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

A todos meus amigos do laboratório, que em algum momento conviveu 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.

Ao amigo Carlos, grande ser humano e meu braço direito. Sem ele, não seria possível este acontecimento.

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

Ao Prof. Milton César Foss e seu funcionário Sebastião pela colaboração nas pesquisas.

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

Alterações das concentrações plasmáticas de troponina I e de metaloproteinases 2 e 9 da matriz extracelular após embolia aguda em cães

O diagnóstico da tromboembolia pulmonar aguda (EPA) e a avaliação da gravidade desta condição é desafiador. Enquanto as concentrações de troponina I cardíaca (TI) já estão bem estabelecidas quanto ao risco de estratificação, não há estudos prévios que tenham examinado se há alguma relação linear entre as concentrações de TI cardíaca e a gravidade da EPA. Além disso, as metaloproteinases (MMPs) da matriz extracelular estão envolvidas fisiopatologia da EPA. Entretanto, é desconhecido se o aumento da atividade gelatinolítica das MMPs após a EPA reflete a gravidade desta condição. Nós examinamos se as concentrações circulantes destes biomarcadores aumentam em proporção à gravidade da EPA experimental induzida em cães anestesiados. A EPA foi induzida com coágulos de sangue autólogo (salina, 1, 3 ou 5 mL/Kg) injetados no átrio direito. As avaliações hemodinâmicas foram realizadas no momento basal e 120 minutos após a EPA. Da mesma forma, foram realizadas as quantificações de troponina I no soro e a zimografia das MMPs 2 e 9 no plasma. Nossos resultados sugerem não haver aumento significativo da atividade gelatinolítica da pró-MMP-2 no plasma após a EPA, enquanto que a atividade da pró-MMP-9 aumenta em 80% apenas no grupo que recebeu 5 mL/Kg de coágulos. A TI cardíaca no soro e a atividade da pró-MMP-9 no plasma tiveram uma correlação positiva com o índice de resistência vascular pulmonar (p=0,007 e rs=0,833 para a TI, e p=0,034 e rs=0,684 para a pró-MMP-9) e com a pressão média na artéria pulmonar (p=0,005 e rs=0,610 para a TI, e p=0,022 e rs=0,720 para a pró-MMP-9). Concluímos que a TI cardíaca e a pró-MMP-9 circulantes aumentam em proporção à gravidade da EPA, embora o aumento da pró-MMP-9 não seja muito evidente em graus menos severos da EPA. Estes achados podem

Palavras chaves: embolia pulmonar aguda; marcadores; metaloproteinases da matriz; troponina; zimografia

ser relevantes para a clínica da EPA.

ABSTRACT

Severity dependent increases in circulating cardiac troponin I and MMP-2 and 9 concentrations after experimental acute pulmonary thromboembolism

Making the diagnosis of acute pulmonary thromboembolism (APT) and assessing its severity is very challenging. While cardiac troponin I (CTI) levels are promising in risk stratification, no previous study has examined whether there is a linear relation between CTI levels and the severity of APT. Moreover, matrix metalloproteinases (MMPs) are involved in the pathophysiology of APT. However, it is unknown whether the increases in MMP levels after APT reflect the severity of this condition. We examined whether the circulating levels of these biomarkers increase in proportion to the severity of experimental APT induced in anesthetized dogs. APT was induced with autologous blood clots (saline, 1, 3, or 5 mL/kg) injected into the right atrium. Hemodynamic evaluations were carried out for 120 min. Gelatin zymography of MMP-2 and MMP-9 from plasma samples were performed and serum CTI levels were determined at baseline and 120 min after APT. Our results sugest that while no significant increases in pro-MMP-2 levels were found after APT, pro-MMP-9 levels increased by 80% only after 5 mL/kg of clot embolization. Serum CTI and plasma pro-MMP-9 levels correlated positively with pulmonary vascular resistance (p=0.007 and rs=0.833 for troponin I, and p=0.034 and rs=0.684 for pro-MMP-9) and with pulmonary artery pressure (p=0.005 and rs=0.610 for troponin I, and p=0.022 and rs=0.720 for pro-MMP-9). We conclude that circulating CTI and pro-MMP-9 increase in proportion to the severity of APT, although the increases in plasma pro-MMP-9 are less clear with less severe APT. These findings may be relevant for clinical APT.

Keywords: acute pulmonary embolism; markers; matrix metalloproteinases; troponin; zymography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático do protocolo experimental antes e após a EPA
Figura 2: Índice de resistência vascular pulmonar (IRVP)
Figura 3: Pressão média da artéria pulmonar (PMAP)
Figura 4: Pressão parcial do oxigênio no sangue arterial (PO ₂)
Figura 5: Saturação do oxigênio (SaO ₂)
Figura 6: Pressão arterial média (PAM)
Figura 7: Freqüência cardíaca (FC)
Figura 8: Indice cardiaco (IC)
Figura 9: Concentração de troponina I no soro
Figura 10: Correlação entre a concentração de troponina I e o
índice de resistência vascular pulmonar (IRVP)
Figura 11: Correlação entre a concentração de troponina I e a
média da pressão arterial pulmonar (PMAP)
Figura 12: Delta percentual em relação ao momento basal da
atividade gelatinolítica da pró-MMP-2
Figura 13: Delta percentual em relação ao momento basal da
atividade gelatinolítica da pró-MMP-9
Figura 14: Representação de um gel de zimografia
Figura 15: Correlação entre a atividade da pró-MMP-9 e o índice
de resistência vascular pulmonar (IRVP)
Figura 16: Correlação entre a atividade da pró-MMP-9 e a pressão
média da artéria pulmonar (PMAP)

TABELAS

Tabela 1: Índice de resistência vascular pulmonar (IRVP)	48
Tabela 2: Pressão média da artéria pulmonar (PMAP)	49
Tabela 3: Pressão parcial do oxigênio (PO ₂)	50
Tabela 4: Saturação do oxigênio (SaO ₂)	51
Tabela 5: Pressão arterial média (PAM)	52
Tabela 6: Freqüência cardíaca (FC)	53
Tabela 7: Índice cardíaco (IC)	54
Tabela 8: Concentração de troponina I no soro	55
Tabela 9: Atividade gelatinolítica de pró-MMP-2 no plasma	57
Tabela 10: Atividade gelatinolítica de pró-MMP-9 no plasma	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância de uma via APMA: acetato de 4-aminofenilmercúrico

ASC: área de superfície corpórea

B: Basal

BNP: peptídeo natriurético do tipo B

CaCl₂: cloreto de cálcio

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

de Medicina de Ribeirão Preto

CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CV: coeficiente de variação

DC: débito cardíaco

E 120: 120 minutos após a embolia

ECG: eletrocardiograma

EDTA: ácido etilenodiamino tetracético

EPA: embolia pulmonar aguda

EPM: erro padrão da média

ET: endotelina

ET-1: endotelina 1

FC: freqüência cardíaca 5-HT: 5-hidroxitriptamina

IC: índice cardíaco

ICAM: molécula de adesão intercelular 1

IRVP: índice de resistência vascular pulmonar

MMPs: metaloproteinases da matriz

NO: óxido nítrico

NS: não significativo

PAF: fator ativador de plaquetas

PAM: pressão arterial média

PaCO₂: pressão arterial do gás carbônico

PaO₂: pressão arterial do oxigênio

PG: prostaglandina PGI₂: prostaciclina

PMAP: pressão média artéria pulmonar

Poap: pressão de oclusão da artéria pulmonar

PSAP: pressão sistólica da artéria pulmonar

ROS: espécies reativas do oxigênio RVP: resistência vascular pulmonar

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS/PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com o uso de SDS

SH: sulfidril

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

TIMPs: inibidores teciduais das MMPs

cTnl: troponina I cTnT: troponina T

TXA₂: tromboxano A₂

VCAM: molécula de adesão vascular

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1.INTRODUÇÃO	18
1.1- A importância clínica da Embolia Pulmonar Aguda	19
1.2- A fisiologia da circulação pulmonar	20
1.3- A fisiopatologia da hipertensão pulmonar durante a EPA	22
1.4-Alguns marcadores associados com a gravidade da EPA	24
1.5-Metaloproteinases da matriz extracelular	27
1.6-Possível relevância das MMPs na EPA	30
2. HIPÓTESE	32
3. OBJETIVOS	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1-Preparo e monitorização dos animais	37
4.2-Cálculo do Índice de Resistência Vascular Pulmonar (IRVP)	39
4.3-Protocolo experimental	40
4.4-Zimografia para MMP-2 e MMP-9 das amostras de plasma dos cães	42
4.5-Dosagem de troponina I	43
4.6–Análises estatísticas	44
5. RESULTADOS	46
5.1- Resultados Hemodinâmicos	47
5.2- Resultados da dosagem de troponina I	55

5.3-Resultados da atividade gelatinolítica (zimografia) das metaloproteinase	s 2
e 9 da matriz extracelular	57
6. DISCUSSÃO	60
6.1- As alterações hemodinâmicas	61
6.2- A troponina I	62
6.3- As metaloproteinases 2 e 9 da matriz extracelular	63
7. CONCLUSÕES	67
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
9. APÊNDICE	79
Artigo publicado (Clin Chim Acta, 2007, no prelo)	

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância clínica da embolia pulmonar aguda

A embolia pulmonar aguda (EPA) é uma emergência médica comum, de complicado diagnóstico, pois apresenta sintomas não específicos, sendo potencialmente letal, e que resultam da obstrução vascular pulmonar após migração de êmbolos para os pulmões. Apesar de existirem algumas fontes de êmbolos pulmonares, a principal são os trombos oriundos de veias profundas dos membros inferiores (tromboembolia) (Riedel 2001a; Riedel 2001c; Sadosty et al. 2003a; Wood 2002b)

Aproximadamente 33% de todos os pacientes que apresentam sintomatologia de trombose venosa profunda manifestam a EPA. Estima-se que ocorram nos EUA, a cada ano, 237.000 casos não fatais e 294.000 casos fatais de EPA (Almahameed et al. 2007). Embora não tenhamos estatísticas, podemos imaginar um número pouco menor para o Brasil.

A EPA pode levar à morte nas primeiras horas após sua instalação, tendo sido relatada uma taxa de mortalidade de até 30% em casos de EPA acompanhada de hipotensão arterial. Curiosamente, 2/3 dos pacientes pertencentes aos casos fatais acabam morrendo na primeira hora de EPA (Bailen et al. 2001)

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 e apresentarem um risco de morte < 5% (Douketis 2001; Wood 2002b).

Desta 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 (West 2006). Além disto, as artérias pulmonares e seus ramos apresentam constituição histológica que os tornam mais complacentes do que as artérias sistêmicas (Reeves et al. 1998).

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

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

Quantitativamente, temos que, em indivíduos sadios e ao nível do mar, a pressão sistólica da artéria pulmonar (PSAP) é de 18 a 25 milímetros de mercúrio (mmHg) e a pressão média da artéria pulmonar (PMAP) de 12 a 16 mmHg (Elliot 1992; Wood 2002a). Quando a pressão arterial pulmonar aumenta acima destes valores normais, temos hipertensão pulmonar, caracterizada por PMAP superior a 25 mmHg em repouso, ou 30 mmHg durante esforço (Wood 2002a).

O fluxo sanguíneo dos pulmões 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 (PaO₂) abaixo de 73 mmHg), os vasos sanguíneos adjacentes aos alvéolos com baixas pressões de oxigênio se contraem. Isto pode levar a aumentos da resistência vascular pulmonar (RVP) (Voelkel et al. 2000) que, por conta da hipóxia é denominado vasoconstrição pulmonar hipóxica. Acredita-se que a baixa concentração de oxigênio determine a liberação de alguma substância vasoconstritora, ainda desconhecida, do tecido pulmonar (Dantzker et al. 1978).

1.3. Fisiopatologia da hipertensão pulmonar durante EPA

Vários mecanismos participam do desenvolvimento da hipertensão pulmonar durante a EPA (Lualdi et al. 1995; Smulders 2001; Smulders 2000b). 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, levando ao aumento da póscarga do ventrículo direito. Isto pode levar à isquemia, depressão miocárdica e abaulamento do septo interventricular em direção ao ventrículo esquerdo (Lualdi & Goldhaber 1995). 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 (Sullivan et al. 2001).

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 A₂, serotonina, endotelina-1, PAF (fator ativador de plaquetas), histamina e algumas prostaglandinas (Wood 2002a). A liberação destes vasoconstritores pulmonares

durante a EPA, somada à obstrução física do leito vascular pulmonar, agrava as alterações hemodinâmicas, aumentando ainda mais a chance de levar à morte.

Dentre eles o mais potente vasoconstritor pulmonar conhecido é a serotonina (5-hidroxitriptamina – 5HT). A 5HT é produzida pelas células enterocromafins gastrintestinais, neurônios serotoninérgicos, células neuro-endócrinas pulmonares e por plaquetas ativadas. A 5HT causa vasodilatação sistêmica e apresenta propriedade inotrópica positiva (Liras et al. 2000), (Egermayer et al. 1999).

O **tromboxano** A₂ (**TxA₂**) 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 TxA₂ é o endotélio vascular e os monócitos circulantes (Smulders 2001).

Um outro importante fator humoral produzida pelo endotélio vascular que causa intensa e sustentada vasoconstrição pulmonar sustentada vasoconstrição pulmonar é a **endotelina (ET)**. Há vários subtipos de endotelina, tais como a endotelina-1 (ET-1), conhecida por sua capacidade de causar hipertensão pulmonar, e também seu precursor a *big-endotelina*. A ET-1 ainda causa a vasoconstrição coronariana. (Battistini 2003; Lee et al. 2001a).

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 TxA₂ plaquetário (Smulders 2001). Estudos revelaram que o PAF causa hipotensão sistêmica, hipertensão e

edema pulmonar, além de induzir a vasoconstrição pulmonar quando o tônus vascular está reduzido (Barnes et al. 1995).

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. (Barnes & Liu 1995).

Após a instalação da EPA são liberadas **prostaglandinas (PG).** Algumas apresentam atividade vasoconstritora pulmonar e outras, atividade vasodilatadora (Broeders et al. 2001). Um exemplo de prostaglandina com atividade vasodilatadora pulmonar é a **prostaciclina (PGI₂)** (Hill et al. 1999; Liu et al. 1999). Outro vasodilatador é o **óxido nítrico (NO)**, o qual, administrado por via inalatória, produziu dilatação seletiva dos vasos pulmonares em condições de hipertensão arterial pulmonar induzida experimentalmente (Bottiger et al. 1996; Tanus-Santos et al. 1999a; Tanus-Santos et al. 1999b; Tanus-Santos et al. 2002; Weimann et al. 1999).

1.4 Alguns marcadores associados com a gravidade da EPA

Marcadores bioquímicos têm sido usados na avaliação da gravidade de síndromes cardíacas que levam à lesão miocárdica.

Um destes marcadores são as troponinas T (cTnT) e I (cTnI) cardíacas. Tais troponinas são componentes do aparato contrátil miofibrilar do músculo cardíaco.

Em indivíduos saudáveis, geralmente não são detectadas no sangue. Estas proteínas de baixo peso molecular são liberadas na circulação após uma lesão nos miócitos por isquemia, lesão tóxica, infarto, trauma ou inflamação (Apple 1999; Imazio et al. 2003). O uso diagnóstico das concentrações circulantes de troponinas como indicadores de lesão cardíaca está bem estabelecido em pacientes com infarto agudo do miocárdio (Katus et al. 1991). Em pacientes com EPA, apesar dos níveis elevados de troponinas no sangue, as razões para tal não estão completamente definidas, mas as troponinas permanecem aumentadas por 2 a 3 dias (Muller-Bardorff et al. 2002). A lesão no miocárdio resultante da embolia pulmonar provavelmente ocorre por redução do débito cardíaco e do fluxo sanguíneo coronário, ambos associados a aumentos da pós-carga no ventrículo direito (Hamm et al. 2002).

Aumentos das concentrações de troponinas cardíacas ocorrem em, pelo menos, um terço dos pacientes com embolia pulmonar severa. Mas como são altamente sensíveis em caso de lesão do miócito, é possível que elas também estejam aumentadas em quadros menos graves de embolia. Assim, um estudo com 24 pacientes com EPA de grau brando, sem histórico de doença cardíaca, mostrou que a cTnl aumentou em 20,8% destes pacientes (0,4 µg/L) (Douketis et al. 2002).

Em outro estudo, com 64 pacientes com EPA de gravidade branda, a cTnT (> 0,1 μg.L⁻¹) ocorreu em 50% dos pacientes e também foi associada com risco aumentado de morte (Konstantinides et al. 2002). Ainda, Mehta et al (2003), estudaram 38 pacientes com EPA, dos quais 47% (18) apresentaram níveis elevados de Tnl. Destes 18 pacientes, 12 apresentaram pressão sistólica do

ventrículo direito alterada comparado ao grupo controle, o que aumenta em 33% a chance de desenvolvimento de um choque cardiogênico (Mehta et al. 2003).

As troponinas cardíacas são consideradas marcadores bem sensíveis em síndromes cardíacas que levam à lesão miocárdica. Tanto a troponina T quanto a troponia I são codificadas por três genes diferentes, que resultam nas duas isoformas do músculo esquelético e na isoforma cardíaca. Ainda, a TnI é unicamente específica para o coração, apresentando uma seqüência de 31 aminoácidos na porção N-terminal, que a difere das formas do músculo esquelético (Apple, 1999).

Ainda, alguns trabalhos enfocam que a TnI não está tão fortemente ligada aos filamentos finos dentro das células cardíacas, sendo assim, poderiam ser extraídas dos miócitos bem antes de outras proteínas (Strauss et al 1992; Shiraishi et al 1992). Isto sugere que durante uma lesão cardíaca, a TnI pode ser a proteína inicialmente liberada na corrente sanguínea. Dessa forma, a TnI pode ser considerada um marcador superior à TnT (Mullen et al 2002).

Outro marcador associado com a gravidade da EPA é o peptídeo natriurético do tipo B (BNP). O BNP é sintetizado na forma de um precursor, o pré-pró-BNP, que é clivado a pró-BNP, que após algumas reações forma o BNP, um neurohormônio secretado principalmente pelos ventrículos cardíacos em resposta a um aumento de pressão. Apresenta potente ação diurética e propriedade vasorelaxante sistêmica (Aubert 2005).

Um estudo avaliou os níveis de BNP em pacientes com lesão pulmonar aguda e demonstrou uma correlação do BNP com o índice de resistência vascular

sistêmica (R=0,708) e o índice de resistência vascular pulmonar (0,573) (Mitaka et al. 1997). Outro estudo, demonstrou-se que os níveis do BNP estão aumentados proporcionalmente ao grau de disfunção do ventrículo direito em pacientes com EPA e que, quando administrou-se uma terapia vasodilatora por um tempo prolongado, os níveis de BNP caíram de 315 pg/mL para 144 pg/mL (Nagaya et al. 1998).

Pelos achados obtidos até então, tanto o BNP quanto as TnT e TnI apresentam importância clínica como um apoio suplementar na triagem e avaliação do risco de gravidade em pacientes com EPA. No entanto, as troponinas cardíacas, em especial a TnI, parece-nos atuar como marcadores mais sensíveis.

1.5. Metaloproteinases da matriz extracelular

A matriz extracelular tem uma composição estrutural biologicamente ativa e dinâmica, com proteínas fibrosas embebidas em um meio hidratado por proteoglicanas e glicosaminoglicanas. A habilidade das células detectarem pequenas diferenças na combinação específica, concentração e componentes da matriz sugere que perturbações na homeostase da matriz possam permitir a remodelagem da parede vascular. Isso ocorre após uma lesão vascular em várias condições patológicas (Coats et al. 1997).

Enzimas proteolíticas únicas e específicas, as metaloproteinases (MMPs), regulam a integridade da matriz extracelular. Consistem, atualmente, de uma família com mais de 20 tipos que apresentam diferentes substratos. As MMPs são enzimas zinco-dependentes que degradam várias proteínas da matriz extracelular (colágeno, elastina, proteoglicanas) e têm importantes papéis em vários processos fisiológicos (desenvolvimento embrionário, morfogênese, reprodução, reabsorção e remodelagem tecidual) e patológicos (destruição de cartilagem em artrite, ruptura de placa aterosclerótica, reestenose miocárdica, desenvolvimento de aneurismas, metástase tumoral, degeneração macular, entre outros) (Corbel et al. 2000).

Entre as MMPs, incluem-se: colagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelisinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11) e as MMPs tipo membrana (MT1-MMP). A maioria é secretada livremente no espaço extracelular, mas algumas são estocadas dentro de células, como a MMP-9, que se acumula em grânulos de neutrófilos. Outras MMPs são ancoradas à superfície celular, como a MT1-MMP (Corbel et al. 2000; Hobeika et al. 2007; Nagase et al. 2006)

As MMPs são organizadas em uma estrutura principal que compreende três domínios básicos e bem conservados: um domínio pro-peptídeo no sítio aminoterminal da cadeia polipeptídica, um domínio catalítico e um domínio hemopexina-like na porção carboxiterminal da cadeia polipeptídica, o qual possui

similaridades estruturais com a hemopexina e com a vitronectina (Massova et al. 1998).

As MMPs são secretadas na forma de precursores inativos (zimogênios) cuja latência é mantida através da interação entre o resíduo de cisteína presente no domínio pró-peptídico com o zinco presente no domínio catalítico, bloqueando o acesso deste ao substrato. São ativadas no tecido por clivagem do domínio pró-peptídico que vai deixar o sítio catalítico livre para interação com o substrato (Visse et al. 2003). A exposição do sítio catalítico também permite a lise de substrato por pró-MMPs e é o fundamento para a detecção de ambas MMPs, latentes e ativadas, na presença de SDS por zimografia (Galis et al. 2002).

Enzimas, como a plasmina, e algumas MMPs podem ativar as próprias MMPs. Porém, num ambiente com lesão vascular, as pró-MMPs podem ser ativadas por agentes não proteolíticos, com grupamentos SH, como sais de mercúrio (APMA), ácido hipocloroso e glutationa oxidada, agentes desnaturantes, como o SDS e a uréia, e espécies reativas do oxigênio (ROS) (Nagase et al. 1999).

As MMPs têm suas atividades reguladas em vários níveis: transcrição gênica, síntese de zimogênios inativos, ativação dos zimogênios (pró-enzima) após tradução e interação das MMPs com inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Na realidade, o microambiente vascular providencia modos específicos de regulação das MMPs. A regulação inibitória da atividade das MMPs é realizada por um inibidor não específico (α₂-macroglobulina) ou por

inibidores específicos (os TIMPs). Os TIMPs regulam a atividade das MMPs nos tecidos, enquanto a α_2 -macroglobulina regula no plasma. Os TIMPs compreendem 4 proteínas: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e o TIMP 4, os quais inibem a atividade das MMPs por ligação não covalente ao domínio catalítico das mesmas. Formam-se, assim, complexos de alta afinidade 1:1 (Kranzhofer et al. 1999; Sang 1998; Willenbrock et al. 1993). Isso implica que os processos biológicos envolvidos com as MMPs são sempre dependentes do balanço entre proteinases e seus inibidores naturais. Assim, o desequilíbrio desse balanço resulta em doenças associadas com proteólise descontrolada do tecido conectivo, como em doenças crônicas degenerativas, em tumores e na inflamação (Gomez et al. 1997).

1.6. Possível relevância das MMPs na EPA

Estudos têm demonstrado que a ativação da MMP-2 e/ou MMP-9 pode atuar de modo a aumentar a ação de peptídeos vasoativos constritores como a endotelina, ou diminuir a ação vasodilatadora pulmonar de outros peptídeos como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a adrenomedulina. Fernandez-Patron et al demonstraram que a MMP-2 vascular pode clivar *big* endotelina-1 (1-38) em endotelina-1 (1-32), que é um potente vasoconstritor pulmonar. Este mesmo autor também demonstrou que esta mesma enzima foi capaz de clivar o CGRP em peptídeos com ações vasodilatadoras menos potentes

(Fernandez-Patron et al. 1999; Fernandez-Patron et al. 2000; Fernandez-Patron et al. 2001).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que as MMPs, especificamente a MMP-9 e talvez a MMP-2, podem participar da hipertensão arterial pulmonar associada à EPA. Em um dos trabalhos, a EPA foi associada com o aumento da atividade da MMP-9 e MMP-2 no pulmão. A L-arginina, nas concentrações de 3 e 10 mmol/L, atenuou este aumento de MMPs após a embolia (Souza-Costa et al. 2005b). Ainda, em outro estudo, demonstrou-se que a inibição da MMP-9 atenuou os efeitos hemodinâmicos provocados na EPA em modelos experimentais diferentes (Fortuna et al. 2006; Palei et al. 2005).

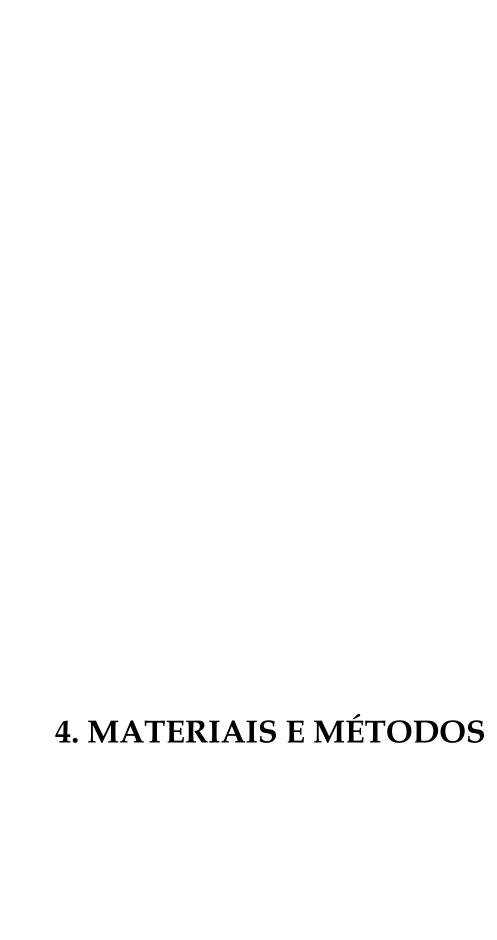
Estas evidências sugerem que as MMPs estejam envolvidas na hipertensão pulmonar associada à EPA. Entretanto, nenhum estudo avaliou, até o presente momento, a existência de uma possível correlação entre a gravidade dos distúrbios hemodinâmicos e o aumento de MMP-2 e MMP-9 plasmáticas durante EPA experimental. Parece-nos importante examinar esta hipótese, tendo em vista que a existência de tal correlação daria maior sustentação à participação das MMPs na fisiopatologia da hipertensão pulmonar associada à EPA. Além disso, havendo tal correlação, o uso de drogas inibidoras das MMPs poderiam ser usadas como terapia farmacológica no sentido de melhorar a condição do paciente com hipertensão pulmonar associada a EPA.

2. HIPÓTESE

Baseados em estudos prévios nos quais as troponinas cardíacas e as MMPs estão aumentadas na hipertensão pulmonar associada a EPA, pretendemos avaliar se as concentrações plasmáticas de troponina I e de MMPs 2 e 9, além dos distúrbios hemodinâmicos, aumentam em proporção a gravidade da embolia pulmonar aguda experimental em cães.

3. OBJETIVOS

- a. Verificar alterações nas concentrações plasmáticas de troponina I de cães submetidos a diferentes graus de embolia;
- b. Verificar alterações nas concentrações plasmáticas de MMP-9 da matriz extracelular de cães submetidos a diferentes graus de embolia;
- c. Verificar também, possíveis alterações de MMP-2 da matriz extracelular de cães submetidos a diferentes graus de embolia.
- d. Verificar se há correlação entre os parâmetros acima mencionados.



4.1 Preparo e monitorização dos animais

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

Vinte e seis 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 entubação 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 auxilio do bloqueador neuromuscular (pancurônio - 0,10 mg/kg) administrado em dose única por via intravenosa, na veia femoral esquerda. A freqüência respiratória foi ajustada de modo a se obter níveis fisiológicos de PaCO2 (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 artéria aorta, visando-se obter medida direta da pressão arterial média (PAM). A veia

femoral direita foi isolada e introduzido 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. Cálculo do índice de Resistência Vascular Pulmonar (IRVP)

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:

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

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

ASC = $[peso(kg)]^{0,425}$ x $[comprimento(m)]^{0,007184}$ (Wood 2002b), sendo que o comprimento do cão foi medido do focinho ao ânus.

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

4.3. Protocolo experimental

Antes do início do experimento propriamente dito, foi colhido 5 mL de sangue venoso/kg do animal com agulha e seringa estéreis. Este sangue foi acondicionado adaquadamente em placa de vidro por 1 hora para que coagulasse. Então, o coágulo foi cortado grosseiramente e passado através de uma peneira (tamis), de poros iguais a 3 mm. Assim, conseguimos coágulos de 2-3 mm de diâmetro. Tais coágulos foram misturados a 10 mL de salina 0,9%, 5 minutos antes da indução da embolia (todos os materiais utilizados neste procedimento foram lavados com água, detergente neutro e álcool).

Após anestesia, monitorização e estabilização hemodinâmica por 20 minutos, foi feita a avaliação hemodinâmica inicial (Basal). Foi coletado 1 mL de sangue arterial (em seringa estéril heparinizada) para análise gasométrica, bem como 4 mL de sangue arterial adicionados a tubos contendo solução de EDTA (1 mg/mL de sangue) para a separação do plasma por centrifugação (1000 g por 10 minutos) e armazenamento a -70°C para posteriores análises bioquímicas. Também foram coletados mais 5 mL de sangue e colocado em tubo estéril para que, após a retração do coágulo, o mesmo fosse centrifugado (1000 g por 10 minutos) para a separação do soro. Após, foram feitas alíquotas de 1 mL e acondicionadas a -70°C para posteriores análises bioquímicas.

A embolia foi induzida por infusão dos coágulos autólogos por 5-10 minutos com o auxílio de uma seringa estéril conectada à cânula de calibre espesso

inserida no átrio direito (Lee et al. 2001b). O estudo foi composto por 4 grupos experimentais:

- * o grupo 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

Foram avaliados as medidas hemodinâmicas e colhidas amostras de sangue arterial, de cada grupo, nos momentos basal e 120 minutos após a embolia. O esquema a seguir (figura 1) ilustra o procedimento experimental explicado acima:

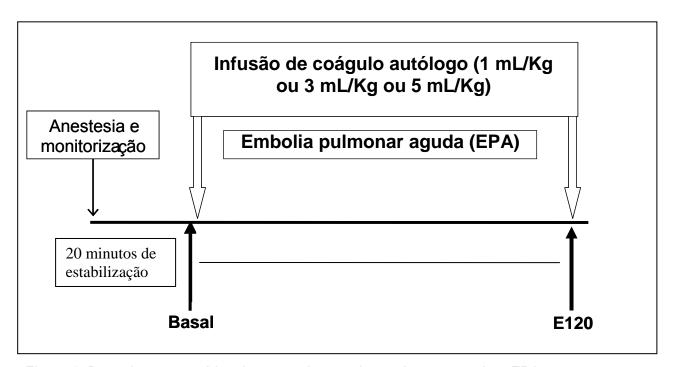


Figura 1. Desenho esquemático do protocolo experimental antes e após a EPA

4.4. Zimografia para MMP-2 e MMP-9 das amostras de plasma dos cães

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

Após a corrida de aproximadamente 5 horas, os géis foram submetidos a dois banhos de 30 minutos cada (temperatura ambiente) em solução de Triton X-100 2,0% para renaturar as enzimas e, em seguida, incubados durante 16 horas em tampão Tris-HCl a 50 mM, pH 7,4, contendo CaCl₂ a 10 mM, à temperatura de 37°C. Após, os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue G-250* 0,05% por 3 horas, para logo em seguida serem descorados por 15, 30 e 60 minutos em

metanol 30% e ácido acético 10% até a visualização das bandas características da atividade gelatinolítica das MMPs: bandas claras contra um fundo azul escuro.

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

4.5. Dosagem da troponina I

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

A fase sólida, uma pérola de poliestireno encapsulada dentro da unidade teste IMMULITE é recoberta com anticorpo monoclonal específico a troponina I de murino. Enquanto o soro do paciente e a fosfatase alcalina conjugada a anticorpo policional específico a troponina I de cabra são incubados por 30 minutos a 37°C na unidade teste, com agitação intermitente, a troponina I da amostra é ligada de maneira a formar um complexo de anticorpos tipo "sanduíche". O conjugado não ligado é então removido pela lavagem por centrifugação, o substrato é adicionado

e a unidade teste é incubada por mais 10 minutos. O substrato quimiluminescente usado na reação enzimática é um éster de adamantil fosfato dioxetano, o qual é submetido a hidrólise na presença da fosfatase alcalina gerando um intermediário instável. A produção contínua deste intermediário resulta na emissão de luz ininterrupta aumentando assim a precisão por prover uma janela para múltiplas leituras. O complexo ligado, assim como sua emissão de fótons são medidos pelo luminômetro, no analisador Immulite (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA), sendo proporcional a concentração de troponina I existente na amostra. A concentração mínima detectável pelo ensaio é de 0,35 ng de troponina I/mL.

4.6. Análise Estatística

Os resultados pertinentes às medidas hemodinâmicas bem como os resultados da troponina I foram apresentados como média e seus respectivos erro padrão da média (média <u>+</u> EPM). Os resultados relacionados à dosagem das MMPs 2 e 9 foram expressos como delta %.

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 (Stat View for Windows, Cary, NC). As mudanças nos

marcadores bioquímicos foram analisadas por um teste T de *Student*, seguido do teste pareado de Wilcoxon.

A correlação de Spearman foi calculada para as associações entre os parâmetros hemodinâmicos e os marcadores bioquímicos. Foi considerado estatisticamente significativo o valor mínimo de probabilidade < 0.05 (*= p < 0.05).

5. RESULTADOS

5.1. Resultados hemodinâmicos

Os resultados pertinentes aos parâmetros respiratórios e hemodinâmicos basais foram similares em todos os grupos experimentais, conforme apresentados a seguir. A embolização do pulmão levou a uma tendência de aumento do IRVP e a PMAP proporcionalmente à gravidade da EPA (todos * p<0,05; figura 2 e tabela 1, figura 3 e tabela 2, respectivamente).

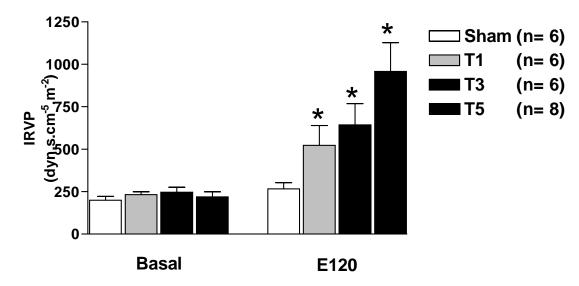


Figura 2 – Índice de resistência vascular pulmonar (IRVP) nos momentos basal e 120 minutos após a tromboembolia pulmonar aguda (E120) nos grupos Sham, T1, T3 e T5. Os valores são as médias \pm E.P.M. (E120 *versus* medidas do momento basal).

Tabela 1 . Índice de resistência vascular pulmonar em dinas.cm ⁻⁵ .m ⁻²						
IRVP (média ± erro padrão)						
Momentos		Grupos				
	SHAM T1 T3 T5					
Basal	199 ± 23 231 ± 17 246 ± 30 219 ± 30					
E 120	266 ± 37	*522 ± 117	*642 ± 126	*957 ± 159		

Grupos T1, T3 e T5, todos no momento E120, versus medidas do momento basal

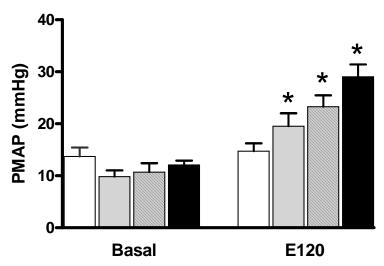


Figura 3 – Pressão média da artéria pulmonar (PMAP) nos momentos basal e 120 minutos após a tromboembolia pulmonar aguda (E120) nos grupos Sham, T1, T3 e T5. Os valores são as médias ± E.P.M. (E120 *versus* medidas do momento basal).

Tabela 2. Pressão média da artéria pulmonar em mmHg						
PMAP (média ± erro padrão)						
Momentos		Grupos				
	SHAM T1 T3 T5					
Basal	14 ± 1.7 9.8 ± 1.2 11 ± 1.7 12 ± 0.84					
E 120	15 ± 1,5	*20 ± 2,5	*23 ± 2,2	*29 ± 2,4		

Grupos T1, T3 e T5, todos no momento E120, versus medidas do momento basal

A hipertensão pulmonar induzida pela EPA foi associada com hipoxemia significante apenas no grupo T5, como é observado nas figuras 4 (seguida da tabela 3) e 5 (seguida da tabela 4):

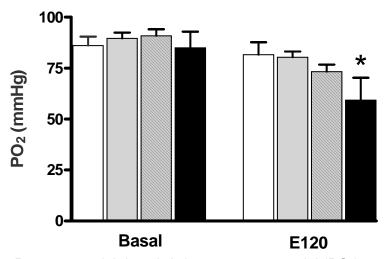


Figura 4 – Pressão parcial do oxigênio no sangue arterial (PO₂) em mmHg nos momentos basal e 120 minutos após a tromboembolia pulmonar aguda (E120) nos grupos Sham, T1, T3 e T5. Os valores são as médias ± E.P.M. (E120 *versus* medidas do momento basal).

Tabela 3. Pressão parcial do oxigênio em mmHg, no sangue arterial						
PO ₂ (média ± erro padrão)						
Momentos		Grupos				
	SHAM T1 T3 T5					
Basal	86 ± 4,3	90 ± 2.8	91 ± 3,2	85 ± 8		
E 120	82 ± 6	80 ± 2,8	73 ± 3,4	*59 ± 11		

Grupo T5, no momento E120, versus medidas do momento basal

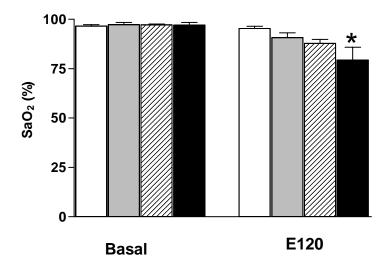


Figura 5 – Saturação do oxigênio (SaO_2) em % nos momentos basal e 120 minutos após a tromboembolia pulmonar aguda (E120) nos grupos Sham, T1, T3 e T5. Os valores são as médias \pm E.P.M. (E120 *versus* medidas do momento basal).

Tabela 4. Saturação do oxigênio em percentual (%)						
SaO ₂ (média ± erro padrão)						
Momentos	Grupos					
	SHAM T1 T3 T5					
Basal	100 100 100 100					
E 120	95 ± 1,1	91 ± 2,5	89 ± 1.8	*86 ± 4,4		

Grupo T5, no momento E120, versus medidas do momento basal

Conforme apresentado abaixo na figura 6 e tabela 5, respectivamente, a pressão arterial média não apresentou diferença estatística entre os grupos. Os grupos experimentais apresentaram comportamento similar tanto no momento basal quanto no momento 120 minutos após embolia (E120).

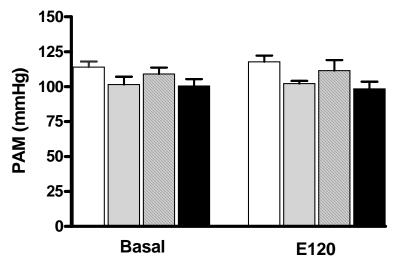


Figura 6 – Pressão arterial média (PAM) em mmHg nos momentos basal e 120 minutos após a tromboembolia pulmonar aguda (E120) nos grupos Sham, T1, T3 e T5. Os valores são as médias ± E.P.M.

Tabela 5. Pressão arterial média em mmHg						
PAM (média ± erro padrão)						
Momentos	Grupos					
	SHAM T1 T3 T5					
Basal	114 $\pm 4,1$ 102 $\pm 5,7$ 109 $\pm 4,5$ 101 $\pm 4,9$					
E 120	118 ± 4,5	102 ± 2,0	112 ± 7,5	98 ± 5,2		

Os resultados hemodinâmicos de freqüência cardíaca e índice cardíaco apresentados na figura 7 e tabela 6, e figura 8 e tabela 7, respectivamente, não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais. Os grupos experimentais apresentaram comportamento similar tanto no momento basal quanto no momento 120 minutos após embolia (E120).

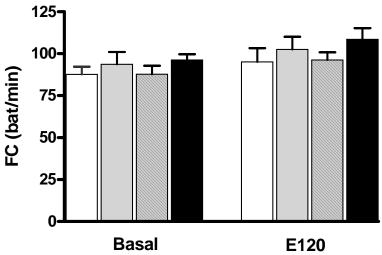


Figura 7 – Freqüência cardíaca (FC) em batimentos/minutos (bat/min) nos momentos basal e 120 minutos após a tromboembolia pulmonar aguda (E120) nos grupos Sham, T1, T3 e T5. Os valores são as médias ± E.P.M.

Tabela 6. Freqüência cardíaca em batimentos/minutos						
FC (média ± erro padrão)						
Momentos		Grupos				
	SHAM	T 1	Т3	Т5		
Basal	88 ± 4,7	$94 \pm 7,4$	88 ± 5.0	$96 \pm 3,4$		
E 120	95 ± 8,3	103 ± 7,6	96 ± 4,6	109 ± 6,7		

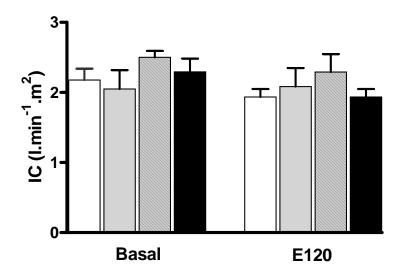


Figura 8 – Indice cardiaco (IC) em I.min⁻¹.m⁻² nos momentos basal e 120 minutos após a tromboembolia pulmonar aguda (E120) nos grupos Sham, T1, T3 e T5. Os valores são as médias ± S.E.M.

Tabela 7. Índice cardíaco em l.min ⁻¹ .m ⁻²					
IC (média ± erro padrão)					
Momentos	Grupos				
	SHAM T1 T3 T5				
Basal	$2,2 \pm 0,16$ $2,1 \pm 0,27$ $2,5 \pm 0,09$ $2,3 \pm 0,19$				
E 120	1,9 ± 0,11	2,1 ± 0,7	2,3 ± 0,26	1,9 ± 0,11	

5.2. Resultado da dosagem de troponina I

Com relação ao ensaio da troponina I, os animais Sham não apresentaram mudanças significativas, enquanto a embolização no pulmão foi associada com aumento significativo da troponina I no soro, nos grupos T1, T3 e T5, conforme sugere a figura 9, cujos dados numéricos são expressos na tabela 8.

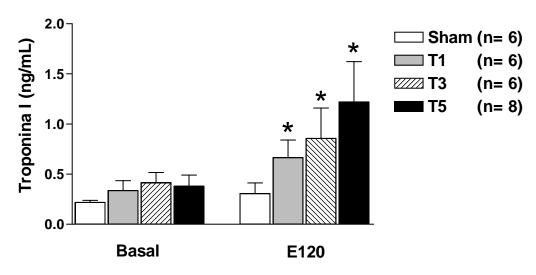


Figura 9 – Concentração de troponina I no soro nos momentos basal e 120 minutos após a tromboembolia pulmonar aguda (E120) nos grupos Sham, T1, T3 e T5. Os valores são as médias ± E.P.M. (E120 *versus* medidas do momento basal).

Tabela 8. Concentração de troponina I em ng/mL no soro						
Troponina I (média ± erro padrão)						
Momentos		Grupos				
	SHAM T1 T3 T5					
Basal	0,22 ± 0,02	0.34 ± 0.09	$0,42 \pm 0,1$	0.38 ± 0.11		
E 120	0,31 ± 0,11	0,67 ± 0,17	0,86 ± 0,30	1,2 ± 0,40		

Grupos T1, T3 e T5, todos no momento E120, versus medidas do momento basal

A troponina I no soro correlacionou-se positivamente com o IRVP (p=0,007 e rs=0,833) e com a PMAP (p=0,005 e rs=0,610), conforme é mostrado pelas figuras 10 e 11, respectivamente:

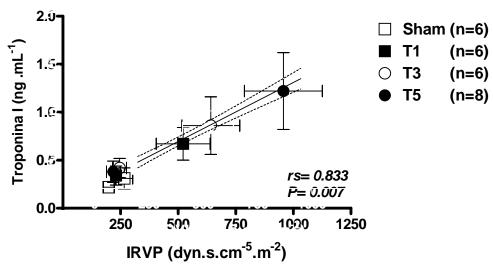


Figura 10 – Correlação entre a concentração de troponina I e o índice de resistência vascular pulmonar (IRVP). Linha de regressão, intervalo de confiança de 95% e coeficiente de correlação de Spearman (rs), foram plotados.

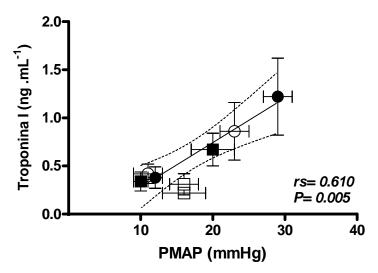
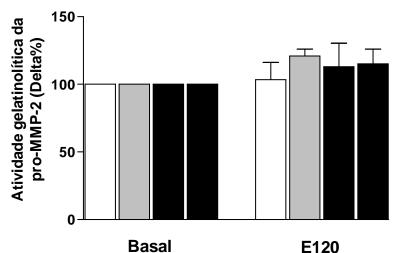


Figura 11– Correlação entre a concentração de troponina I e a média da pressão arterial pulmonar (PMAP). Linha de regressão, intervalo de confiança de 95% e coeficiente de correlação de Spearman (rs), foram plotados.

5.3. Resultados da atividade gelatinolítica (zimografia) das metaloproteinases 2 e 9

Com relação ao ensaio da zimografia nas amostras de plasma, enquanto a atividade da pró-MMP-2 não aumentou significativamente após a EPA (figura 12 e tabela 9, respectivamente), a pró-MMP-9 aumentou aproximadamente 80% no grupo T5 (figura 13 e tabela 10, respectivamente), enquanto nos grupos T1 e T3 não ocorreram aumentos significativos.



Basal E120 Figura 12 – Delta percentual em relação ao momento basal (100%) da atividade gelatinolítica da pró-MMP-2 nos grupos Sham, T1, T3 e T5. Os valores são o delta % \pm E.P.M.

Tabela 9. A	Tabela 9. Atividade gelatinolítica de pró-MMP-2 em delta %, no plasma							
pró-MMP-2 (média ± erro padrão)								
Momentos	Grupos							
	SHAM T1 T3 T5							
Basal	100 100 100 100							
E 120	103 ± 13	103 ± 13 121 ± 5.2 113 ± 17 115 ± 11						

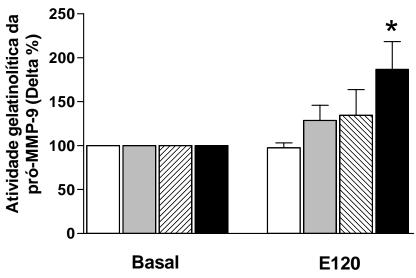
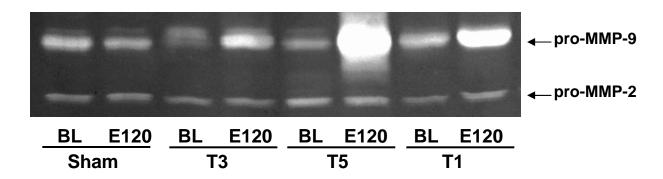


Figura 13 – Delta percentual em relação ao momento basal (100%) da atividade gelatinolítica da pró-MMP-9 nos grupos Sham, T1, T3 e T5. Os valores são o delta % \pm E.P.M. (T5 no momento E120 *versus* medidas do momento basal)

Tabela 10. Atividade gelatinolítica de pró-MMP-9 em delta %, no plasma						
Pró-MMP-9 (média ± erro padrão)						
Momentos	Grupos					
	SHAM	T1	Т3	T5		
Basal	100	100	100	100		
E 120	98 ± 5,2	129 ± 17	134 ± 29	*187 ± 32		

Grupo T5 no momento E120, versus medidas do momento basal

A figura 14 abaixo ilustra um gel de zimografia, enfatizando as bandas características de pró-MMP-2 e da pró-MMP-9:



A atividade da pró-MMP-9 correlacionou-se positivamente com o IRVP (p=0,034 e rs=0,684) e com a PMAP (p=0,022 e rs=0,720), observado nas figuras 15 e 16, respectivamente, abaixo:

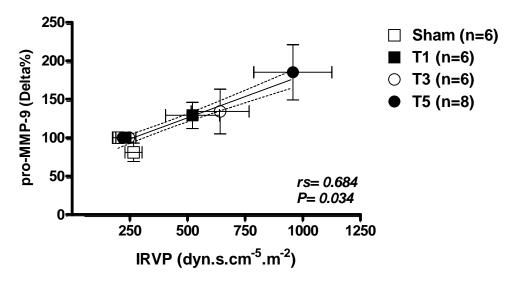


Figura 15 - Correlação entre a atividade da pró-MMP-9 e o índice de resistência vascular pulmonar (IRVP). Linha de regressão, intervalo de confiança de 95% e coeficiente de correlação de Spearman (rs) foram plotados.

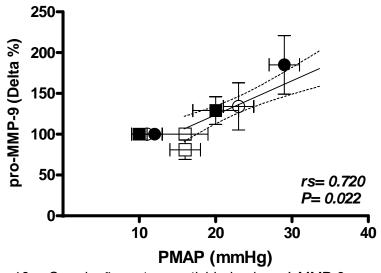


Figura 16 - Correlação entre a atividade da pró-MMP-9 e a pressão média da artéria pulmonar (PMAP). Linha de regressão, intervalo de confiança de 95% e coeficiente de correlação de Spearman (rs) foram plotados.

6. DISCUSSÃO

6.1. As alterações hemodinâmicas

A trombose venosa profunda é a causa principal da migração de êmbolos para o s pulmões com conseqüente obstrução dos vasos pulmonares (Sadosty et al. 2003a). Assim sendo, o modelo de EPA em cães escolhido por nosso grupo, buscou aproximar-se da realidade, como forma de obter resultados mais fidedignos com a fisiopatologia da doença, diferentemente de estudos prévios nos quais trombos exógenos ou outros materiais são injetados na circulação pulmonar (Clozel et al. 1988) (Stassen et al. 1991).

As alterações hemodinâmicas envolvidas em um quadro de EPA foram bem caracterizadas em nossos experimentos. A tendência ao aumento do IRVP (figura 2) e da PMAP (figura 3) proporcionalmente à gravidade da doença foi bem pronunciado. O aumento da PMAP causado pela obstrução dos vasos pulmonares pelos trombos, e o aumento do IRVP, possivelmente explicado não só pela obstrução dos vasos pulmonares, mas também pela liberação de fatores constritores e conseqüente constrição arteriolar neurogênica (Smulders 2000a); (Lualdi et al. 2001), culminaram com um quadro de hipoxemia grave nos animais que receberam 5 mL de coágulo/Kg (figura 4).

A hipoxemia é consistentemente demonstrada em EPA, mas o mecanismo nem sempre é claro. Pode envolver desde anormalidades na relação perfusão/ventilação até *shunts* intrapulmonares e intracardíacos (Huet et al. 1985) (Santolicandro et al. 1995).

Ainda foi testado em nosso trabalho, a dose de coágulo de 7 mL/Kg (n=3), mas os animais não resistiam até o final do protocolo, assim sendo, a maior dose em que os animais conseguiam sobreviver foi a de 5 mL/Kg.

Mediante a tudo o que foi exposto, cada vez torna-se mais relevante o uso de biomarcadores em EPA, como forma de um prognóstico rápido e eficiente de uma patologia grave, além de atuar como possíveis alvos farmacológicos.

6.2. A troponina I

Trabalhos recentes têm mostrado a importância da troponina como biomarcador na EPA, seguido de exames ecocardiográficos do ventrículo direito, direcionando o tratamento e prognóstico em pacientes com embolia pulmonar (Konstantinides 2005).O papel da troponina torna-se mais relevante naqueles pacientes estáveis do ponto de vista hemodinâmico, nos quais fica difícil o prognóstico somente pelo exame clínico (Logeart et al. 2007).

Um dos achados do nosso trabalho foi a tendência do aumento da troponina I no soro, que pode ser explicado pela lesão miocárdica microscópica induzida pela EPA, o que permitiu a degradação de miofibrilas e danos às células do miocárdio (Kucher et al. 2003b). Embora essa tendência ao aumento da concentração de troponina I após a EPA seja mais moderado do que aqueles achados em pacientes com síndromes coronárias agudas, é possível que também possa refletir disfunção ventricular direita induzida pela EPA, até mesmo em pacientes com EPA

submaciça (Horlander et al. 2003; Konstantinides et al. 2002; Pacouret et al. 1998b; Punukollu et al. 2005).

Nós verificamos que a concentração de troponina I no soro correlaciona-se positivamente com IRVP e PMAP. Nosso estudo é o primeiro mostrando que a troponina I aumenta após a EPA em proporção a PMAP e ao IRVP, que é o principal determinante do trabalho do ventrículo direito. Ou seja, ocorreu um aumento da concentração de troponina de acordo com a gravidade da doença. Talvez o uso de terapias farmacológicas que providenciem um suporte vasodilator pulmonar (Souza-Costa et al. 2005b; Souza-Silva et al. 2005; Tanus-Santos et al. 2000) poderiam atenuar o aumento da troponina I após a EPA e melhorar as condições do paciente.

6.3. As metaloproteinases 2 e 9 da matriz extracelular

Estudos recentes têm implicado as MMPs (principalmente a MMP-2 e a MMP-9) no desenvolvimento de hipertensão pulmonar aguda associada com EPA (Fortuna et al. 2006; Palei et al. 2005; Souza-Costa et al. 2007a). O mecanismo preciso envolvido no aumento das MMPs circulantes após a EPA não está claro.

Diferentemente do trabalho de Souza-Costa et al (2005b), em nossos resultados não verificamos um aumento significativo da pró-MMP-2 no plasma circulante. A administração de doses crescentes de L-arginina em perfusato de pulmão de ratos com EPA induzida por microesferas de Sephadex, atenuou o

quadro da hipertensão pulmonar bem como a atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9. Em nosso estudo, a zimografia foi realizada em amostras de plasma, enquanto no trabalho citado anteriormente, a mesma foi realizada em amostras de extrato de pulmão, em que a concentração de enzimas possivelmente é maior em relação ao plasma. Além disso, em se tratando de MMP-2, que é uma enzima constitutiva, presente na maioria dos tecidos em uma concentração basal (Hu et al 2007) talvez, fosse necessário um tempo maior de experimento, possibilitando o aumento da produção e expressão das MMP-2.

Ainda, os processos biológicos envolvidos com as MMPs são sempre dependentes do balanço entre proteinases e seus inibidores naturais, os TIMPS (Gomez et al, 1997). Em nosso estudo não dosamos os TIMPS. Dessa forma, não sabemos se há um equilíbrio/desequilíbrio entre as MMPs e os seus inibidores nas amostras dosadas neste trabalho.

Uma resposta inflamatória com um influxo precoce de neutrófilos e macrófagos dentro da artéria pulmonar foi demonstrado em EPA experimental em ratos (Eagleton et al. 2002). Assim, é possível que estas células inflamatórias possam rapidamente liberar grânulos contendo grandes quantidades de MMP-9 (Van den Steen et al. 2002) (Kolaczkowska et al. 2007), o que poderia explicar a tendência ao aumento da pró-MMP-9 circulante achado em nosso estudo. Além disso, os próprios neutrófilos ativados são capazes de liberarem superóxido e outras espécies reativas do oxigênio, possíveis de ativarem as MMPs (Galis & Khatri 2002).

Ainda, alguns fatores presentes no meio, em se tratando de um processo inflamatório, como fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento epitelial, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento de fibroblastos, moléculas de adesão (ICAM, VCAM) (Yakubenko et al. 2000) (Aoudjit et al. 1998), interleucina 1, fator de necrose tumoral, CD-40 e NFkappa-β (Schonbeck et al. 1997), podem estimular a produção das MMPs no ambiente inflamatório.

A tendência ao aumento encontrado na pró-MMP-9 nos grupos T1 e T3 não foram estatisticamente diferente daqueles achados nos cães não embolizados, embora um aumento significativo foi achado no grupo com embolia severa (grupo T5). Esses achados sugerem que a atividade da pró-MMP-9 provavelmente não reflete com precisão a gravidade da EPA, pelo menos nas condições experimentais reportadas no presente estudo. É possível que a variabilidade biológica possa limitar as medidas das concentrações de pró-MMP-9 circulantes como marcador de gravidade em EPA e em outras doenças. Neste caso, a amostragem de pacientes em mais de uma ocasião poderia melhorar a probabilidade de se obter uma estimativa mais próxima da realidade no caso de biomarcadores (Vasan 2006).

O presente estudo tem algumas limitações que devem ser levadas em consideração. Nós focamos os efeitos precoces da EPA sobre as concentrações de troponina I e MMPs. Resultados diferentes poderiam ser achados se esses marcadores bioquímicos fossem averiguados algumas horas após a EPA. Também seria interessante examinar se o uso de drogas inibidoras das MMPs

associadas com uma possível melhora hemodinâmica após a EPA produziriam os mesmos efeitos nesses biomarcadores.

Ainda, a dosagem das MMPs foi feita por zimografia, uma técnica que apesar de ser semiquantitativa, apresenta um custo baixo e uma boa especificidade e sensibilidade. Além disso, permite a identificação de uma enzima em uma mistura de proteinases, e o uso de padrões de diferentes pesos moleculares fornece uma estimativa das MMPs latentes e ativas (Quesada et al 1997). No entanto, há kits comerciais de medida da atividade das MMPS, seja por um ELISA convencional ou fluorimetria, que apresentam uma alta sensibilidade, sendo capazes de dosar amostras na faixa de ng/mL com uma quantidade mínima de amostra, sem diluições. Talvez, o uso de uma metodologia mais sensível do que a zimografia, poderia melhorar os resultados obtidos em nosso trabalho.

Mesmo com tais limitações, os achados deste trabalho podem ser relevantes para a clínica da EPA.

7. CONCLUSÕES

- **7.1.** A TnI cardíaca no soro e a pró-MMP-9 no plasma apresentam uma tendência em aumentar em proporção à gravidade da EPA, embora o aumento da pró-MMP-9 não seja muito evidente em graus menos severos da EPA;
 - **7.2.** Não há aumentos da pró-MMP-2 no plasma.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

^{*} Referências citadas conforme as normas de Vancouver

Almahameed A, Carman TL. Outpatient management of stable acute pulmonary embolism: proposed accelerated pathway for risk stratification. Am J Med 2007; 120 (10 Suppl 2):S18-25.

Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma/endothelial cell contact: implication of ICAM-1. J Immunol 1998; 160 (6):2967-73.

Apple FS. Tissue specificity of cardiac troponin I, cardiac troponin T and creatine kinase-MB. Clin Chim Acta 1999; 284 (2):151-9.

Aubert JD. Biochemical markers in the management of pulmonary hypertension. Swiss Med Wkly 2005; 135 (3-4):43-9.

Bailen MR, Cuadra JA, Aguayo De Hoyos E. Thrombolysis during cardiopulmonary resuscitation in fulminant pulmonary embolism: a review. Crit Care Med 2001; 29 (11):2211-9.

Barnes PJ, Liu SF. Regulation of pulmonary vascular tone. Pharmacol Rev 1995; 47 (1):87-131.

Battistini B. Modulation and roles of the endothelins in the pathophysiology of pulmonary embolism. Can J Physiol Pharmacol 2003; 81 (6):555-69.

Bottiger BW, Motsch J, Dorsam J et al. Inhaled nitric oxide selectively decreases pulmonary artery pressure and pulmonary vascular resistance following acute massive pulmonary microembolism in piglets. Chest 1996; 110 (4):1041-7.

Broeders MA, Tangelder GJ, Slaaf DW 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):163-9.

Clozel JP, Holvoet P, Tschopp T. Experimental pulmonary embolus in the rat: a new in vivo model to test thrombolytic drugs. J Cardiovasc Pharmacol 1988; 12 (5):520-5.

Coats WD, Jr., Faxon DP. The role of the extracellular matrix in arterial remodelling. Semin Interv Cardiol 1997; 2 (3):167-76.

Corbel M, Boichot E, Lagente V. Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury. Braz J Med Biol Res 2000; 33 (7):749-54.

Dantzker DR, Wagner PD, Tornabene VW et al. Gas exchange after pulmonary thromboemoblization in dogs. Circ Res 1978; 42 (1):92-103.

Douketis JD. Prognosis in pulmonary embolism. Curr Opin Pulm Med 2001; 7 (5):354-9.

Douketis JD, Crowther MA, Stanton EB et al. Elevated cardiac troponin levels in patients with submassive pulmonary embolism. Arch Intern Med. 2002; 162 (1):79-81.

Eagleton MJ, Henke PK, Luke CE et al. Inflammation and intimal hyperplasia associated with experimental pulmonary embolism. J Vasc Surg 2002; 36 (3):581-8.

Egermayer P, Town GI, Peacock AJ. Role of serotonin in the pathogenesis of acute and chronic pulmonary hypertension. Thorax 1999; 54 (2):161-8.

Elliot CG. Pulmonary physiology during pulmonary embolism. Chest 1992; 101:163S-71S.

Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. Circ Res 1999; 85 (10):906-11.

Fernandez-Patron C, Stewart KG, Zhang Y et al. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. Circ Res 2000; 87 (8):670-6.

Fernandez-Patron C, Zouki C, Whittal R et al. Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1[1-32]. Faseb J 2001; 15 (12):2230-40.

Fortuna GM, Figueiredo-Lopes L, Dias-Junior CAC et al. A role for matrix metalloproteinase-9 in the hemodynamic changes following acute pulmonary embolism. Int J Cardiol 2006:in Press.

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

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H et al. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. Eur J Cell Biol 1997; 74 (2):111-22.

Hamm CW, Giannitsis E, Katus HA. Cardiac troponin elevations in patients without acute coronary syndrome. Circulation 2002; 106 (23):2871-2.

Hill LL, Pearl RG. Combined inhaled nitric oxide and inhaled prostacyclin during experimental chronic pulmonary hypertension. J Appl Physiol 1999; 86 (4):1160-4.

Hobeika MJ, Thompson RW, Muhs BE et al. Matrix metalloproteinases in peripheral vascular disease. J Vasc Surg 2007; 45 (4):849-57.

Horlander KT, Leeper KV. Troponin levels as a guide to treatment of pulmonary embolism. Curr Opin Pulm Med. 2003; 9 (5):374-7.

Huet Y, Lemaire F, Brun-Buisson C et al. Hypoxemia in acute pulmonary embolism. Chest 1985; 88 (6):829-36.

Imazio M, Demichelis B, Cecchi E et al. Cardiac troponin I in acute pericarditis. J Am Coll Cardiol 2003; 42 (12):2144-8.

Hu, J., et al. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. Nat Rev Drug Discov 2007; 6(6): p. 480-98.

Katus HA, Remppis A, Neumann FJ et al. Diagnostic efficiency of troponin T measurements in acute myocardial infarction. Circulation 1991; 83 (3):902-12.

Kolaczkowska E, Lelito M, Kozakiewicz E et al. Resident peritoneal leukocytes are important sources of MMP-9 during zymosan peritonitis: Superior contribution of macrophages over mast cells. Immunol Lett 2007; 113 (2):99-106.

Konstantinides S. Pulmonary embolism: impact of right ventricular dysfunction. Curr Opin Cardiol 2005; 20 (6):496-501.

Konstantinides S, Geibel A, Olschewski M et al. Importance of cardiac troponins I and T in risk stratification of patients with acute pulmonary embolism. Circulation. 2002; 106 (10):1263-8.

Kranzhofer A, Baker AH, George SJ et al. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, and -3 during neointima formation in organ cultures of human saphenous vein. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19 (2):255-65.

Kucher N, Wallmann D, Carone A et al. Incremental prognostic value of troponin I and echocardiography in patients with acute pulmonary embolism. Eur Heart J. 2003; 24 (18):1651-6.

Lee JH, Chun YG, Lee IC et al. Pathogenic role of endothelin 1 in hemodynamic dysfunction in experimental acute pulmonary thromboembolism. Am J Respir Crit Care Med 2001a; 164 (7):1282-7.

Liras A, Catalan RE, Martinez AM. Synergistic effect of endothelin-1 and serotonin in rabbit platelets. Effect On tyrosine phosphorylation [In Process Citation]. Thromb Res 2000; 100 (4):325-31.

Liu X, Bee D, Barer GR. 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):907-16.

Logeart D, Lecuyer L, Thabut G et al. Biomarker-based strategy for screening right ventricular dysfunction in patients with non-massive pulmonary embolism. Intensive Care Med 2007; 33 (2):286-92.

Lualdi JC, Goldhaber SZ. Right ventricular dysfunction after acute pulmonary embolism: pathophysiologic factors, detection, and therapeutic implications. Am Heart J 1995; 130 (6):1276-82.

Massova I, Kotra LP, Fridman R et al. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. Faseb J 1998; 12 (12):1075-95.

Mehta NJ, Jani K, Khan IA. Clinical usefulness and prognostic value of elevated cardiac troponin I levels in acute pulmonary embolism. Am Heart J. 2003; 145 (5):821-5.

Mitaka C, Hirata Y, Nagura T et al. Increased plasma concentrations of brain natriuretic peptide in patients with acute lung injury. J Crit Care 1997; 12 (2):66-71.

Muller-Bardorff M, Weidtmann B, Giannitsis E et al. Release kinetics of cardiac troponin T in survivors of confirmed severe pulmonary embolism. Clin Chem 2002; 48 (4):673-5.

Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc Res 2006; 69 (3):562-73.

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

Nagaya N, Nishikimi T, Okano Y et al. Plasma brain natriuretic peptide levels increase in proportion to the extent of right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension. J Am Coll Cardiol 1998; 31 (1):202-8.

Pacouret G, Schellenberg F, Hamel E et al. [Troponin I in massive acute pulmonary embolism: results of a prospective series]. Presse Med. 1998; 27 (32):1627.

Palei ACT, Zaneti RAG, Fortuna GM et al. Hemodynamic benefits of matrix metalloproteinase-9 inhibition by doxycycline during experimental acute pulmonary embolism. Angiology 2005; 5:611-7.

Punukollu G, Khan IA, Gowda RM et al. Cardiac troponin I release in acute pulmonary embolism in relation to the duration of symptoms. Int J Cardiol. 2005; 99 (2):207-11.

Quesada AR, Barbacid MM, Mira E et al. Evaluation of fluorometric and zymographic methods as activity assays for stromelysins and gelatinases. Clin Exp Metastasis 1997; 15 (1): 26-32.

Reeves JT, Rubin LJ. The pulmonary circulation: snapshots of progress. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157 (4 Pt 2):S101-8.

Riedel M. Acute pulmonary embolism 1: pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis. Heart 2001a; 85 (2):229-40.

Riedel M. Acute pulmonary embolism 1: pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis. Heart 2001b; 85 (2):229-40.

Riedel M. Acute pulmonary embolism 2: treatment. Heart 2001c; 85 (3):351-60.

Sadosty AT, Boie ET, Stead LG. Pulmonary embolism. Emerg Med Clin North Am 2003; 21 (2):363-84.

Sang QX. Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. Cell Res 1998; 8 (3):171-7.

Santolicandro A, Prediletto R, Fornai E et al. Mechanisms of hypoxemia and hypoxapnia in pulmonary embolism. Am J Respir Crit Care Med 1995; 152 (1):336-47.

Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK et al. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plague rupture? Circ Res 1997; 81 (3):448-54.

Shiraishi F, Kambara M, Ohtsuki I. Replacement of troponin components in myofibrils. J Biochem 1992;3:61–65.

Smulders YM. Contribution of pulmonary vasoconstriction to haemodynamic instability after acute pulmonary embolism. Implications for treatment? Neth J Med 2001; 58 (6):241-7.

Smulders YM. Pathophysiology and treatment of haemodynamic instability in acute pulmonary embolism: the pivotal role of pulmonary vasoconstriction. Cardiovasc Res 2000a; 48 (1):23-33.

Souza-Costa DC, Figueiredo-Lopes L, Alves-Filho JC et al. Protective effects of atorvastatin in rat models of acute pulmonary embolism: involvement of matrix metalloproteinase-9. Crit Care Med 2007 (a); 35 (1):239-45.

Souza-Costa DC, Zerbini T, Palei AC et al. L-arginine attenuates acute pulmonary embolism-induced increases in lung matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9b. Chest 2005 (b); 128:3705-10.

Souza-Silva AR, Dias-Junior CA, Uzuelli JA et al. Hemodynamic effects of combined sildenafil and l-arginine during acute pulmonary embolism-induced pulmonary hypertension. Eur J Pharmacol 2005; 524:126-31.

Stassen JM, Lijnen HR, Kieckens L et al. Small animal thrombosis models for the evaluation of thrombolytic agents. Circulation 1991; 83 (6 Suppl):IV65-72.

Strauss JD, Zeugner C, Van Eyk JE, Bletz C, Troschka M, Ru egg JC. Troponin replacement in permeabilized cardiac muscle: reversible extraction of troponin I by incubation with vanadate. FEBS Lett 1992;310:229–234.

Sullivan DM, Watts JA, Kline JA. Biventricular cardiac dysfunction after acute massive pulmonary embolism in the rat. J Appl Physiol 2001; 90 (5):1648-56.

Tanus-Santos JE, Gordo WM, Udelsmann A et al. Nonselective endothelinreceptor antagonism attenuates hemodynamic changes after massive pulmonary air embolism in dogs. Chest 2000; 118 (1):175-9. Tanus-Santos JE, Moreno H, Jr., Moreno RA et al. Inhaled nitric oxide improves hemodynamics during a venous air infusion (VAI) in dogs. Intensive Care Med 1999a; 25 (9):983-9.

Tanus-Santos JE, Moreno H, Jr., Zappellini A et al. Small-dose inhaled nitric oxide attenuates hemodynamic changes after pulmonary air embolism in dogs. Anesth Analg 1999b; 88 (5):1025-9.

Tanus-Santos JE, Theodorakis MJ. Is there a place for inhaled nitric oxide in the therapy of acute pulmonary embolism? Am J Respir Med 2002; 1:167-76.

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

Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. Circulation 2006; 113(19):2335-62.

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

Voelkel NF, Tuder RM. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease? J Clin Invest 2000; 106 (6):733-8.

Weimann J, Zink W, Schnabel PA et al. Selective vasodilation by nitric oxide inhalation during sustained pulmonary hypertension following recurrent microembolism in pigs. J Crit Care 1999; 14 (3):133-40.

West JB. How well designed is the human lung? Am J Respir Crit Care Med 2006; 173 (6):583-4.

Willenbrock F, Crabbe T, Slocombe PM et al. The activity of the tissue inhibitors of metalloproteinases is regulated by C-terminal domain interactions: a kinetic analysis of the inhibition of gelatinase A. Biochemistry 1993; 32 (16):4330-7.

Wood KE. Major pulmonary embolism: review of a pathophysiologic approach to the golden hour of hemodynamically significant pulmonary embolism. Chest 2002a; 121 (3):877-905.

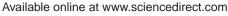
Wood KE. Major pulmonary embolism: review of a pathophysiologic approach to the golden hour of hemodynamically significant pulmonary embolism. Chest 2002b; 121 (3):877-905.

Yakubenko VP, Lobb RR, Plow EF et al. Differential induction of gelatinase B (MMP-9) and gelatinase A (MMP-2) in T lymphocytes upon alpha(4)beta(1)-mediated adhesion to VCAM-1 and the CS-1 peptide of fibronectin. Exp Cell Res 2000; 260 (1):73-84.

9. APÊNDICE

ARTICLE IN PRESS







Clinica Chimica Acta xx (2007) xxx-xxx



Severity dependent increases in circulating cardiac troponin I and MMP-9 concentrations after experimental acute pulmonary thromboembolism

Juliana A. Uzuelli, Carlos A.C. Dias-Junior, Jose E. Tanus-Santos*

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

Received 3 August 2007; received in revised form 28 September 2007; accepted 4 November 2007

Abstract

Background: Making the diagnosis of acute pulmonary thromboembolism (APT) and assessing its severity is very challenging. While cardiac troponin I (cTnI) concentrations are promising in risk stratification, no previous study has examined whether there is a linear relation between cTnI concentrations and the severity of APT. Moreover, matrix metalloproteinases (MMPs) are involved in the pathophysiology of APT. However, it is unknown whether the increases in MMP concentrations after APT reflect the severity of this condition. We examined whether the circulating concentrations of these biomarkers increase in proportion to the severity of experimental APT induced in anesthetized dogs.

Methods: APT was induced with autologous blood clots (saline, 1, 3, or 5 ml/kg) injected into the right atrium. Hemodynamic evaluations were carried out for 120 min. Gelatin zymography of MMP-2 and MMP-9 from plasma samples were performed and serum cTnI concentrations were determined at baseline and 120 min after APT.

Results: While no significant increases in pro-MMP-2 concentrations were found after APT, pro-MMP-9 concentrations increased by 80% only after 5 ml/kg of clot embolization. Serum cTnI and plasma pro-MMP-9 concentrations correlated positively with pulmonary vascular resistance (P=0.007 and rs=0.833 for troponin I, and P=0.034 and rs=0.684 for pro-MMP-9) and with pulmonary artery pressure (P=0.005 and rs=0.610 for troponin I, and P=0.022 and rs=0.720 for pro-MMP-9).

Conclusions: Circulating cTnI and pro-MMP-9 increase in proportion to the severity of APT, although the increases in plasma pro-MMP-9 are less clear with less severe APT. These findings may be relevant for clinical APT.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Acute pulmonary embolism; Markers; Matrix metalloproteinases; Troponin; Zymography

1. Introduction

doi:10.1016/j.cca.2007.11.001

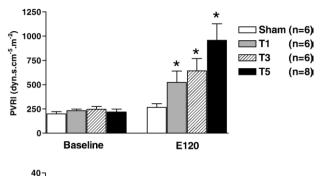
Acute pulmonary thromboembolism (APT) is an important disease and a major cause of acute pulmonary hypertension leading to high cardiovascular morbidity and mortality [1,2]. This condition most commonly results from the migration of deep venous thrombi to the lungs, thus obstructing the pulmonary vessels and leading to acute right heart failure and circulatory shock [3]. 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

0009-8981/\$ - see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

[2], this examination in inconvenient and risky. Therefore a number of studies have been carried out to identify additional tools (markers) to aid clinical assessment, especially of high-risk patients [4]. In this regard, it is usually expected that an ideal biomarker improves the ability of the clinician to optimally manage the patient. To accomplish this, one of the desirable features for a biomarker is a linear relation between change in biomarker and disease severity [4].

Troponin concentration has emerged as a very promising biomarker for the risk stratification of patients with APT [5]. Indeed, the serum concentrations of cardiac troponin I increase in up to 50% of patients with moderate to large APE [6–11]. Importantly, increased troponin I concentration is a reliable marker of right ventricular dysfunction associated with adverse prognosis and increased risk of all-cause death [9], even in patients with submassive APT [12]. However, no previous experimental

^{*} Corresponding author. Tel.: +55 16 3602 3163; fax: +55 16 3633 2301. *E-mail address*: tanus@fmrp.usp.br (J.E. Tanus- Santos).



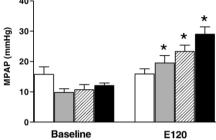


Fig. 1. Pulmonary vascular resistance index (PVRI) and mean pulmonary arterial pressure (MPAP) at baseline and 120 min after acute pulmonary thromboembolism (E120) in Sham, T1, T3, and T5 groups. Values are the means ± S.E.M. *P<0.05 versus measurements at baseline.

study has examined whether there is a linear relation between the increases in troponin concentrations and the severity of APT.

Matrix metalloproteinases (MMPs) form a group of enzymes involved in the degradation of components of the extracellular matrix. It has been shown that MMPs play a role in the path-

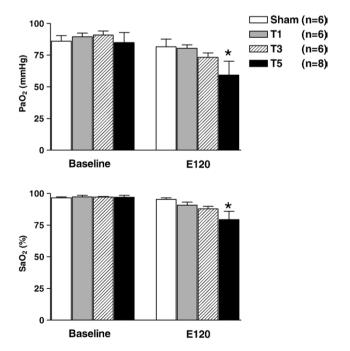


Fig. 2. Arterial O_2 pressure (PaO_2) and arterial O_2 saturation (SaO_2) at baseline and 120 min after acute pulmonary thromboembolism (E120) in Sham, T1, T3, and T5 groups. Values are the means \pm S.E.M. *P<0.05 versus measurements at baseline.

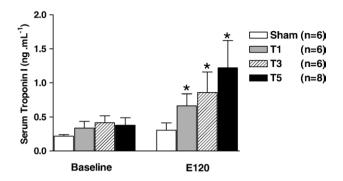


Fig. 3. Serum troponin I concentrations at baseline and 120 min after acute pulmonary thromboembolism (E120) in Sham, T1, T3, and T5 groups. Values are the means \pm S.E.M. *P<0.05 versus measurements at baseline.

ophysiology of chronic pulmonary hypertension [13]. Moreover, recent studies suggest that MMPs (especially MMP-2 and -9) are also involved in the development of acute pulmonary hypertension associated with APT [14–17]. However, there is no information regarding the possible relation between the increases in the circulating concentrations of MMPs after APT and the severity of APT-induced pulmonary hypertension. We hypothesized that the increases in serum cTnI and plasma MMP-9 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.

2. Materials and methods

2.1. Animal model and hemodynamic measurements

All animals received humane care and study protocols complied with the guidelines of the ethics committee for the use of experimental animals at the Faculty of Medicine of Ribeirao Preto. We used a whole animal model of APT [18] to study whether biochemical markers serve as indicators of the severity of APT. Twenty-six mongrel dogs (10.5 to 15.5 kg) of either sex 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 [19]. 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 7.5 F 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 [20]. 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) [21]. 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 20-min stabilization, baseline hemodynamics were 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 randomly 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, 6, 6) and 8, respectively) were embolized with

J.A. Uzuelli et al. / Clinica Chimica Acta xx (2007) xxx-xxx

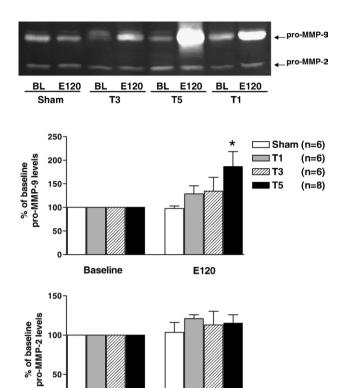


Fig. 4. A representative zymogram of plasma samples (baseline and 120 min after acute pulmonary thromboembolism) showing the pro forms of both MMP-2 and MMP-9, which were identified as bands at 67 kDa and 92 kDa, respectively, in Sham, T1, T3, and T5 groups. The bar figures show the percentages of baseline pro-MMP-9 and pro-MMP-2 concentrations in Sham, T1, T3, and T5 groups. Values are the means±S.E.M. *P<0.05 versus measurements at baseline.

F120

Baseline

clots produced from 1, 3, and 5 ml/kg autologous blood respectively. Thereafter, hemodynamic evaluations were performed every 30 min after APT for up to 120 min (E120 time point). The cardiac index and pulmonary vascular resistance

index (PVRI) were calculated by standard formulae. Arterial blood samples were drawn at baseline and at E120 time points for blood gas analysis with a blood gas analyser (Stat Profile 5 Analyser; Biomedical, Waltham, MA). Venous blood samples were collected into tubes containing EDTA at baseline and at E120 time points, and serum and plasma samples were stored at $-70~^{\circ}$ C until assayed for the biochemical markers as detailed below.

2.2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gelatin zymography of MMP-2 and MMP-9

Gelatin zymography of MMP-2 and MMP-9 from plasma was performed as previously described [22–24]. Briefly, plasma samples were subjected to electrophoresis on 7% SDS-PAGE co-polymerized with gelatin (1%) as the substrate. After electrophoresis was complete, the gel was incubated for 1 h at room temperature in a 2% Triton X-100 solution, and incubated at 37 °C for 16 h in Tris—HCl buffer, pH 7.4, containing 10 mmol/l CaCl₂. The gels were stained with 0.05% Coomassie Brilliant Blue G-250, and then destained with 30% methanol and 10% acetic acid. Gelatinolytic activities were detected as unstained bands against the background of Coomassie blue-stained gelatin. Enzyme activity was assayed by densitometry using a Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290 (Kodak, Rochester, NY). The pro-MMP-2 and pro-MMP-9 forms were identified as bands at 72 kDa and 92 kDa, respectively, by the relation of log Mr to the relative mobility of Sigma SDS-PAGE LMW marker proteins.

2.3. Measurement of serum troponin I concentrations

Cardiac troponin I was measured in serum samples by the Stratus II fluorometric enzyme immunoassay (DPC Immulite, Dade, Miami, USA) [25]. This assay is a sandwich immunoassay that uses a monoclonal antibody immobilized on beads and a goat polyclonal antibody labeled with alkaline phosphatase as a tracer. Both antibodies recognize epitopes localized in the N-terminal part (residues 33–110) of the protein. The chemiluminescent substrate used for the enzymatic reaction is an ester of adamantyl dioxetane phosphate. The minimal concentration detectable by the assay was 0.35 ng/ml of cardiac troponin I and the interassay imprecision was <10%.

2.4. Statistical analysis

The results are expressed as means±S.E.M. Comparisons among groups were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student-Newman-Keuls test (StatView for Windows, Cary, NC). ANOVA on

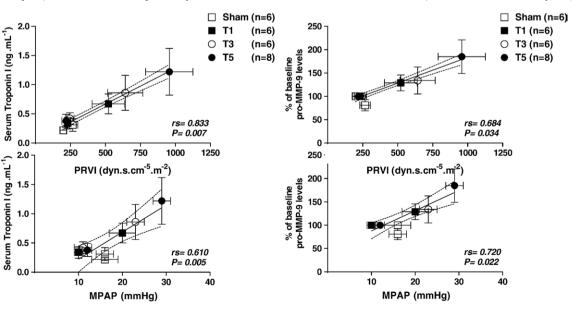


Fig. 5. Positive correlations between serum troponin I or plasma pro-MMP-9 concentrations and pulmonary vascular resistance index (PVRI) or mean pulmonary arterial pressure (MPAP). The regression lines and the 95% confidence intervals were plotted; rs: Spearman's correlation coefficient.

4

ranks was used when normality test failed. Wilcoxon matched pairs test was used to determine the changes in the biochemical markers. The Spearman's correlation (rs, P) was calculated for associations between hemodynamic parameters and biochemical markers. A P<0.05 was considered the minimum concentration of statistical significance.

3. Results

Baseline hemodynamic and respiratory parameters were similar in all experimental groups (Figs. 1 and 2). Although baseline MPAP is apparently higher in Sham group, the difference is not statistically significant and we have no clear explanation for this statistically non-significant difference.

We found no significant hemodynamic and respiratory in Sham operated animals throughout the study period (Figs. 1 and 2). Conversely, lung embolization increased MPAP and PVRI proportionally to the severity of APT (all P < 0.05; Fig. 1). In pilot studies, we found that lung embolization with clots produced from 7 ml/kg autologous blood led to death 100% of dogs (n=3). Therefore we decided to limit lung embolization to 5 ml/kg autologous blood. APT-induced pulmonary hypertension was associated with significant hypoxemia only in T5 group (P < 0.05; Fig. 2). While troponin I concentrations showed no significant changes in Sham operated animals, lung embolization was associated with significant increases in serum troponin I concentrations in T1, T3, and T5 groups (all P < 0.05; Fig. 3).

Fig. 4 shows a representative zymogram of plasma samples. While no significant increases in pro-MMP-2 concentrations were found after APT, pro-MMP-9 increased by approximately 80% in T5 group (Fig. 4; P<0.05), even though no significant increases in pro-MMP-9 were found in T1 and T3 groups (Fig. 4). Interestingly, both serum troponin I and plasma pro-MMP-9 concentrations correlated positively with PVRI (Fig. 5; P=0.007 and rs=0.833 for troponin I, and P=0.034 and rs=0.684 for pro-MMP-9) and with MPAP (Fig. 5; P=0.005 and rs=0.610 for troponin I, and P=0.022 and rs=0.720 for pro-MMP-9).

4. Discussion

The main findings of this study were that (i) serum cardiac troponin I increases in proportion to the severity of APT; (ii) plasma pro-MMP-9 concentrations increase significantly in severe APT; (iii) there is positive correlation between these biomarkers and the severity of APT, although the increases in plasma pro-MMP-9 are less clear with less severe APT.

The increases in serum troponin I that we found in the present study may be explained by APT-induced microscopic myocardial injury leading to myocardial cell damage and degradation of myofibrils [26]. In fact, although the increases in troponin concentrations after APT are milder than those found in patients with acute coronary syndromes [27], they predict adverse outcomes and reflect APT-induced right ventricular dysfunction, even in patients with submassive APT [9,12,25,28]. Consistent with these previous clinical findings showing that troponin I offers important risk

stratification information, we found that serum troponin I concentrations correlated positively with PVRI and MPAP. To our knowledge, this is the first study showing that serum troponin I increases after APT in proportion to MPAP and PVRI, which is a major determinant of right ventricle workload. It remains to be elucidated, however, whether pharmacologic approaches designed to improve right ventricular performance [29] or to provide pulmonary vasodilatory support [30,31] could attenuate the increases in serum troponin I after APT.

Recent studies have implicated MMPs (especially MMP-9 and MMP-2) in the development of acute pulmonary hypertension associated with APT [14–17]. The precise mechanisms involved in the increases in circulating MMPs after APT, however, remain obscure. An inflammatory response with an early influx of neutrophils and macrophages within the pulmonary artery wall has been demonstrated in experimental APT [32]. Therefore, it is possible that these inflammatory cells can rapidly release granules containing large amounts of MMP-9 [33], thus explaining the increases in circulating pro-MMP-9 that we found in the present study.

Curiously, the increases in pro-MMP-9 that we found in T1 and T3 groups were not statistically different from those found in non-embolized dogs, although significant increases were found in the group with severe lung embolization (T5 group). These findings suggest that pro-MMP-9 concentrations probably do not accurately reflect the severity of APT, at least in the experimental conditions reported in the present study. It is possible that significant biological variability may limit the performance of circulating pro-MMP-9 as a biomarker of severity in APT or other diseases. In this case, sampling patients on more than one occasion may improve the probability of obtaining a true estimate of this biomarker [4].

The present study has some limitations that should be taken into consideration. For example, patients with acute pulmonary embolism are sometimes managed several hours after the onset of symptoms [25]. In the present study, we focused on the very early effects of APT on the circulating concentrations of troponin I and MMPs. Different results could be found if these biochemical markers were assessed many hours after APT. It would also be interesting to examine whether pharmacologic interventions associated with improved hemodynamics after APT produce any effects on these biomarkers. In conclusion, we found that circulating cTnI and pro-MMP-9 increase in proportion to the severity of APT, although the increases in plasma pro-MMP-9 are less clear with less severe APT. These findings may be relevant for patients with APT.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sao Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors would like to acknowledge the assistance of Dr. Milton C. Foss and Sebastiao Lazaro Brandao in measuring troponin I concentrations.

J.A. Uzuelli et al. / Clinica Chimica Acta xx (2007) xxx-xxx

References

- 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] Layish DT, Tapson VF. Pharmacologic hemodynamic support in massive pulmonary embolism. Chest 1997;111:218–24.
- [4] Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. Circulation 2006;113:2335–62.
- [5] Goldhaber SZ. Cardiac biomarkers in pulmonary embolism. Chest 2003;123: 1782–4.
- [6] Harrison A, Amundson S. Evaluation and management of the acutely dyspneic patient: the role of biomarkers. Am J Emerg Med 2005;23: 371–8
- [7] Meyer T, Binder L, Hruska N, Luthe H, Buchwald AB. Cardiac troponin I elevation in acute pulmonary embolism is associated with right ventricular dysfunction. J Am Coll Cardiol 2000;36:1632–6.
- [8] Pruszczyk P, Bochowicz A, Torbicki A, et al. Cardiac troponin T monitoring identifies high-risk group of normotensive patients with acute pulmonary embolism. Chest 2003;123:1947–52.
- [9] Konstantinides S, Geibel A, Olschewski M, et al. Importance of cardiac troponins I and T in risk stratification of patients with acute pulmonary embolism. Circulation 2002;106:1263–8.
- [10] Douketis JD, Crowther MA, Stanton EB, Ginsberg JS. Elevated cardiac troponin concentrations in patients with submassive pulmonary embolism. Arch Intern Med 2002;162:79–81.
- [11] Douketis JD, Leeuwenkamp O, Grobara P, et al. The incidence and prognostic significance of elevated cardiac troponins in patients with submassive pulmonary embolism. J Thromb Haemost 2005;3:508–13.
- [12] Horlander KT, Leeper KV. Troponin concentrations as a guide to treatment of pulmonary embolism. Curr Opin Pulm Med 2003;9:374–7.
- [13] Frisdal E, Gest V, Vieillard-Baron A, et al. Gelatinase expression in pulmonary arteries during experimental pulmonary hypertension. Eur Respir J 2001;18:838–45.
- [14] Palei ACT, Zaneti RAG, Fortuna GM, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Hemodynamic benefits of matrix metalloproteinase-9 inhibition by doxycycline during experimental acute pulmonary embolism. Angiology 2005;5:611-7.
- [15] Souza-Costa DC, Zerbini T, Palei AC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. L-arginine attenuates acute pulmonary embolism-induced increases in lung matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9. Chest 2005;128: 3705-10.
- [16] Fortuna GM, Figueiredo-Lopes L, Dias-Junior CAC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. A role for matrix metalloproteinase-9 in the hemodynamic changes following acute pulmonary embolism. Int J Cardiol 2007;114: 22–7.
- [17] Souza-Costa DC, Figueiredo-Lopes L, Alves-Filho JC, et al. Protective effects of atorvastatin in rat models of acute pulmonary embolism: involvement of matrix metalloproteinase-9. Crit Care Med 2007;35: 239-45.

- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] Dias-Junior CA, Souza-Costa DC, Zerbini T, Rocha JBT, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Effect of sildenafil on pulmonary embolism-induced oxidative stress and pulmonary hypertension. Anesth Analg 2005;101: 115-20.
- [22] Souza-Tarla CD, Uzuelli JA, Machado AA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. Clin Biochem 2005;38: 410–4.
- [23] Gerlach RF, Uzuelli JA, Souza-Tarla CD, Tanus-Santos JE. Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. Anal Biochem 2005;344:147–9.
- [24] Gerlach RF, Demacq C, Jung K, Tanus-Santos JE. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 concentrations in serum versus plasma. Clin Biochem 2007;40:119–23.
- [25] Punukollu G, Khan IA, Gowda RM, Lakhanpal G, Vasavada BC, Sacchi TJ. Cardiac troponin I release in acute pulmonary embolism in relation to the duration of symptoms. Int J Cardiol 2005;99:207–11.
- [26] Kucher N, Goldhaber SZ. Cardiac biomarkers for risk stratification of patients with acute pulmonary embolism. Circulation 2003;108:2191–4.
- [27] Muller-Bardorff M, Weidtmann B, Giannitsis E, Kurowski V, Katus HA. Release kinetics of cardiac troponin T in survivors of confirmed severe pulmonary embolism. Clin Chem 2002;48:673–5.
- [28] Pacouret G, Schellenberg F, Hamel E, Charbonnier B, Mouray H. Troponin I in massive acute pulmonary embolism: results of a prospective series. Presse Med 1998;27:1627.
- [29] Kerbaul F, Gariboldi V, Giorgi R, et al. Effects of levosimendan on acute pulmonary embolism-induced right ventricular failure*. Crit Care Med 2007; Jun 12; (Electronic publication ahead of print).
- [30] Souza-Costa DC, Zerbini T, Metzger IF, Rocha JB, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. I-Arginine attenuates acute pulmonary embolism-induced oxidative stress and pulmonary hypertension. Nitric Oxide 2005;12:9–14.
- [31] Tanus-Santos JE, Gordo WM, Udelsmann A, Cittadino MH, Moreno Jr H. Nonselective endothelin-receptor antagonism attenuates hemodynamic changes after massive pulmonary air embolism in dogs. Chest 2000;118: 175–9
- [32] Eagleton MJ, Henke PK, Luke CE, et al. Inflammation and intimal hyperplasia associated with experimental pulmonary embolism. J Vasc Surg 2002;36:581–8.
- [33] Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). Crit Rev Biochem Mol Biol 2002;37: 375–536.