UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CRISTINA TONIN BENELI

Estudo da participação das metaloproteinases 2 e 9 no desenvolvimento da hiperplasia intimal decorrente de modelo experimental de estenose intrínseca da aorta

Ribeirão Preto
2009

CRISTINA TONIN BENELI

Estudo da participação das metaloproteinases 2 e 9 no desenvolvimento da hiperplasia intimal decorrente de modelo experimental de estenose intrínseca da aorta

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Área de concentração: Patologia Experimental.
Orientadora: Prof^a Dr^a Simone G. Ramos

Ribeirão Preto
2009

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Beneli, Cristina Tonin

Estudo da participação das metaloproteinases 2 e 9 no desenvolvimento da hiperplasia intimal decorrente de modelo experimental de estenose intrínseca da aorta.

Ribeirão Preto, 2009.

154p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Patologia Experimental.

Orientadora: Ramos, Simone Gusmão.

1. Hiperplasia intimal. 2. Estenose intrínseca da aorta. 3. Metaloproteinase-2. 4. Metaloproteinase-9.

FOLHA DE APROVAÇÃO

CRISTINA TONIN BENELI

ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DAS METALOPROTEINASES 2 E 9 NO
DESENVOLVIMENTO DA HIPERPLASIA INTIMAL DECORRENTE DE MODELO
EXPERIMENTAL DE ESTENOSE INTRÍNSECA DA AORTA

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Doutor
em Patologia.

Área de concentração: Patologia Experimental.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP sob a orientação da Profª Drª Simone G. Ramos, com apoio financeiro da CNPq (Proc. 141252/2005-7).

DEDICATÓRIAS

“Deus é meu refúgio e minha força...” (SL 45:2)

*“Dê-me, Senhor,
Agudeza para entender,
capacidade para reter,
método e faculdade para aprender,
sutileza para interpretar,
graça e abundância para falar.
Dê-me, Senhor,
acerto ao começar,
direção ao progredir
e perfeição ao concluir.”*

São Tomás de Aquino

Aos meus queridos pais **Jorge** e **Odilma** e minha irmã **Carlene**, que sempre tentaram entender os períodos difíceis e orgulharam-se das minhas conquistas... Vocês são meus exemplos de vida! Nos momentos em que mais precisei tive todo o apoio necessário. Muito obrigada sempre!

"Os primeiros passos de nossas vidas são amparados por nossos pais... e os passos seguintes... por seus ensinamentos."

Ao meu amado **Gustavo**, que em momento algum deixou de me apoiar, sofrendo com a minha ausência e mesmo à distância, nunca saiu do meu lado... Obrigada por não me deixar desanimar, mostrar-me o caminho e me amar tanto!

"O amor é um sentimento sublime; supera os problemas e diferenças, resiste ao tempo e se fortalece com a distância. Difícil fugir, impossível esquecer."

Barbosa Filho

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora **Profa. Dra. Simone G. Ramos**, a quem dedico a mais sincera e efusiva admiração! Que sempre indicou a direção a ser tomada nos momentos de maior dificuldade. Obrigada por oferecer-me esta oportunidade dentro do seu laboratório, para que eu pudesse amadurecer científica e profissionalmente. Após quase uma década, tornei-me uma pessoa melhor.

“O que a lagarta chama de fim do mundo, o Mestre chama de borboleta.”

Richard Bach

“A perplexidade é o início do conhecimento.”
Kahlil Gibran

Ao **Prof. Dr. Marcos A. Rossi**, por ser sempre solícito na solução de minhas dúvidas, por dispor seu laboratório para a realização das diversas técnicas de microscopia e por ser minha grande referência intelectual.

Aos professores **Dr. Carlos Augusto Pasqualucci**, **Dr. Carlos Eli Piccinato**, **Dr. José Alberto M. de Oliveira** e **Dr. Konradin Metze**, pelas preciosas sugestões, disponibilidade e por aceitarem fazer parte desta banca. Muito obrigada!

À **Profa. Dra. Raquel F. Gerlach**, por abrir as portas de seu laboratório para a realização das técnicas de zimografia convencional e *in situ*, por sua atenção e colaboração.

Às amigas e técnicas do Laboratório de Microscopia Eletrônica **Mônica A. Abreu** e **Lígia G.V.B. Santoro**, pela atenção, momentos de descontração, apoio, caronas, auxílio no processamento e microtomia dos materiais para microscopia óptica de alta resolução, além da descrição das técnicas utilizadas nesse trabalho.

À **Elaine Medeiros Floriano**, amiga e técnica do Laboratório de Patologia Pulmonar, por sua incomensurável ajuda, atenção, companheirismo, auxílio nos mais diversos assuntos e pelo excelente processamento e microtomia de meus materiais para a realização desse trabalho.

“A perplexidade é o início do conhecimento.”
Kahlil Gibran

À **Maria Elena Riul**, técnica do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular, pelo convívio harmonioso e auxílio sempre que necessário.

Às secretárias do Departamento de Patologia **Neide T. Gonçalves**, **Rosângela M.C. de Paiva**, **Regina Mara C.F. Bueno**, **Luciara**, **Edna Pio** (in memorian) e **Camila Zambonini** pela prestabilidade e amizade em todos os momentos.

Aos amigos **Toninho** e **Daniel Barcellini**, pela amizade e disponibilidade!

Aos funcionários e ex-funcionários do Biotério do Departamento de Patologia: **D. Ivone**, **Cida**, **Luciana**, **Paulo Henrique**, **Jeferson** e **Henrique** por cuidarem tão bem dos animais.

Às auxiliares de limpeza: **Rose**, **D. Eunice**, **Karina**, **Bia** e **Dira**, pela amizade, atenção, carinho e pelo convívio harmonioso.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Patologia.

“A amizade não se busca, não se sonha, não se deseja; ela exerce-se (é uma virtude).”

Simone Weil

À minha eterna amiga Cristiane Tefé, que me ajudou muito, não só nos experimentos, mas em todos os assuntos... Sempre com uma palavra de incentivo nos momentos de maior desalento. Sei que sempre será assim, porque amizade de mais de 20 anos não é para qualquer um! Amigos feitos na infância são eternos, são como irmãos! Obrigada pelo apoio incondicional e auxílio incansável!

*À minha querida amiga **Cibele M. Prado**, que me acompanhou desde o início do mestrado, ajudando de diversas formas (cientificamente, caronas, conselhos, pernoites, etc...), que mesmo quando estava longe, esteve sempre perto em nossas conversas via internet! Obrigada por poder contar sempre com você! Espero poder retribuir um dia tudo o que você fez por mim! Agradeço imensamente!*

*Às amigas e companheiras de laboratório **Karina M.A. Mata** e **Marcela S. Oliveira** por todos os cafés animados e outros nem tanto, pelo apoio “pisciano” quando necessário e pela amizade. “Todas as riquezas do mundo não valem um bom amigo” (Voltaire).*

*Aos amigos **Érica** e **João**, pela amizade, caronas e conversas animadíssimas! Além de me ajudar em vários experimentos!*

*À amiga **Mara Rúbia Nunes Celes**, que tanto contribuiu na execução desse trabalho com opiniões, ombro amigo e conversas animadíssimas. Meu muito obrigado especial pela ajuda no Western Blot! Sem sua colaboração eu não teria conseguido!*

“A amizade não se busca, não se sonha, não se deseja; ela exerce-se (é uma virtude).”

Simone Weil

À amiga **Gisele Faria**, pela amizade, paciência, caronas, conversas (científicas ou não), além da imensa ajuda em diversos assuntos.

À “escravinha” Anelise B. Assalin, pela imensa ajuda em experimentos até de final de semana, amizade e boas gargalhadas!

Aos “novos” companheiros de laboratório Paula Prudente e Fábio Senra, pelas conversas animadas e pelo companheirismo.

Aos amigos **Lenaldo Branco Rocha, Andiará De Rossi, Luís B. Bispo da Silva, Valdecir Blefari e Cleverson Fernandes**, pela amizade, disponibilidade, atenção e auxílio sempre que necessários.

À amiga e “prima” **Tassiana Marini**, pela amizade, apoio e acolhida sempre que precisei! Muito obrigada!

Aos amigos do Laboratório de Oncologia Pediátrica: **Angélica, Vanessa, Rosane, Cristina, Malu, Sol, Priscilla, Larissa, Thaís, Sabrina, Daniel, Elvis, Kleiton, Marcus Vinícius e Maurício**, por ajudarem e me acolherem tão bem.

Aos colegas do Laboratório da Profa. Dra. Raquel Gerlach: **Ellen, Tiago, Bárbara e César**, por colaborarem na realização das técnicas de zimografia e zimografia *in situ*, além da solução de dúvidas.

“A amizade não se busca, não se sonha, não se deseja; ela exerce-se (é uma virtude).”

Simone Weil

*Aos amigos da Casa de Pós-Graduação II (Casa 13): **Andréa, Antônio, Carlo, Cláudia, Ernando, Gesline, Mirko, Rodrigo, Rogério, Virgílio, Yolanda e Zé Wilson**, mesmo não morando mais juntos, formamos uma grande família!*

Aos meus amigos e colegas pós-graduandos do Departamento de Patologia, pela harmoniosa convivência e divertidas festas do Curso de Inverno e Final de Ano. Sentirei saudades!

*Aos **amigos e familiares de Franca e de Fortaleza**, pelo apoio, respeito, compreensão e paciência.*

*Ao **Sr. Vicente Junqueira**, pelo apoio e prestabilidade em liberar meu pai nos momentos necessários.*

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

RESUMO

Beneli, C.T. **Estudo da participação das metaloproteinases 2 e 9 no desenvolvimento da hiperplasia intimal decorrente de modelo experimental de estenose intrínseca da aorta.** 2009. 154 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (SP), 2009.

As metaloproteinases têm sido implicadas no desenvolvimento de hiperplasias intimais em diferentes situações. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a participação das metaloproteinases 2 e 9 no desenvolvimento da hiperplasia intimal decorrente de modelo experimental de estenose intrínseca da aorta. Este modelo consiste na inserção de um pino acrílico na aorta de ratos. Foram utilizados 288 ratos Wistar machos, com peso médio de 250 g, os quais foram separados em quatro grupos: (1) controle sham-operado, (2) controle sham-operado tratado com doxiciclina, (3) estenosado e (4) estenosado tratado com doxiciclina. Estes animais foram tratados com doxiciclina (inibidor não-seletivo de metaloproteinases) 30 mg/Kg/dia e sacrificados nos períodos de 1, 7, e 15 dias após a cirurgia. O segmento da aorta envolvendo o pino foi retirado e estudado com diferentes protocolos para: microscopia óptica de alta resolução e convencional, imunoistoquímica, Western blot para eNOS e iNOS, zimografia convencional e *in situ*. Um trombo se formou ao redor do pino 24 horas após a cirurgia, mostrando sinais de organização com 7 dias. Com 15 dias, uma hiperplasia intimal adjacente à base do pino foi visualizada. Este espessamento foi caracterizado principalmente por células musculares lisas provenientes da camada muscular média. Apesar das metaloproteinases 2 e 9 estarem inibidas pela doxiciclina (comprovado pela imunoistoquímica, zimografia convencional e *in situ*), não observamos alterações importantes na composição e desenvolvimento da hiperplasia intimal decorrente deste modelo experimental de estenose intrínseca da aorta.

Palavras chaves: Hiperplasia intimal, estenose intrínseca da aorta, metaloproteinase-2, metaloproteinase-9.

ABSTRACT

Beneli, C.T. **Study of the participation of metalloproteinases 2 and 9 in development of intimal hyperplasia due to experimental model of intrinsic aorta stenosis.** 2009. 154 f. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (SP), 2009.

Metalloproteinases has been implied in the development of intimal hyperplasia in different situations. We have used an experimental model of aorta stenosis, with a mushroom plug that promotes local turbulence and thrombosis. Methods: 288 Wistar male rats, weighing an average of 250g, were allocated into four groups: control groups, sham-operated and sham-operated treated with doxycycline, and experimental groups, operated and operates treated with doxycycline. The animals were killed on days 1, 7, and 15 after surgery. The fragments of aorta implicating the plug were harvested and studied using high resolution light microscopy, immunohistochemistry, Western Blot to eNOS and iNOS, conventional and in situ zymography. With animal survival of more than 24 h, we followed the partial fibrinolysis of the thrombus as well as its posterior organization and incorporation to the arterial wall as a neointima for up to 15 days. The intimal thickening detected was mainly composed of smooth muscle cells migrated from the medial layer of the aorta intermixed with extracellular matrix. Although, the MMP-2 and 9 were inhibiting, the intimal hyperplasia did not show difference in your composition and development.

Keywords: Intimal hyperplasia, intrinsic aorta stenosis, metalloproteinases-2, metalloproteinases-9.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema da ativação das metaloproteinases	30
Figura 2	Molécula de doxiciclina	33
Figura 3	Pino acrílico	39
Figura 4	Procedimento cirúrgico	42
Figura 5	Esquema representativo das regiões da aorta para morfometria	46
Figura 6	Morfologia das aortas dos animais dos grupos E1 e ED1	56
Figura 7	Morfologia das aortas dos animais dos grupos E7 e ED7	58
Figura 8	Morfologia das aortas dos animais dos grupos E15 e ED15	60
Figura 9	Imunoistoquímica das aortas dos animais dos grupos E1 e ED1	63
Figura 10	Imunoistoquímica das aortas dos animais dos grupos E7 e ED7	66
Figura 11	Imunoistoquímica das aortas dos animais dos grupos E15 e ED15	69
Figura 12	Gel de zimografia e gráficos representativos das pró-MMP-2 e MMP-2 ativa	78
Figura 13	Gel de zimografia e gráficos representativos das pró-MMP-9 e MMP-9 ativa	81
Figura 14	Zimografia <i>in situ</i> e gráfico representativos das metaloproteinases	84
Figura 15	Gel de Western Blot e gráfico representativos da eNOS	86
Figura 16	Gel de Western Blot e gráfico representativos da iNOS	88
Figura 17	Gráficos representativos da deposição de colágeno e elastina	119

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Estimativa de ganho de peso dos animais após o procedimento cirúrgico	54
Gráfico 2	Área da camada íntima região I2 dos grupos E15 e ED15	73
Gráfico 3	Área da camada íntima região I3 dos grupos E15 e ED15	73
Gráfico 4	Intensidade de fluorescência da camada média abaixo da neoíntima dos grupos E15 e ED15	75
Gráfico 5	Intensidade de fluorescência da neoíntima dos grupos E15 e ED15	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos primários e diluições utilizados na imunoistoquímica	48
Tabela 2	Anticorpos primários e diluições utilizados no Western Blot	52
Tabela 3	Resultados das reações imunoistoquímicas	70
Tabela 4	Resultado da morfometria da espessura da camada íntima	115
Tabela 5	Resultado da morfometria da espessura da camada média	115
Tabela 6	Resultado da morfometria da densidade da neoíntima	116
Tabela 7	Resultado da morfometria da densidade da camada média	116
Tabela 8	Resultado da morfometria da área da neoíntima	117
Tabela 9	Resultado da morfometria da extensão da neoíntima	117
Tabela 10	Resultado da deposição do colágeno e elastina nas aortas	118

LISTA DE ABREVIATURAS

bFGF	Fator de Crescimento Básico de Fibroblastos
DAB	Diaminobenzidina
E	Grupo Estenosado
ED	Grupo Estenosado Tratado com Doxíciclina
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
H&E	Hematoxilina e Eosina
IFN-γ	Interferon-gama
IL-1β	Interleucina-1 beta
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
kDa	quiloDalton
MMP	Metaloproteinase (MMP 1-28)
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
NO	Óxido Nítrico
PA	Ativador do Plasminogênio
PAI-1	Inibidor Endógeno do Ativador do Plasminogênio-1
PBS	Tampão Salina Fosfato
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
S	Grupo Sham-Operado
SD	Grupo Sham-Operado Tratado com Doxíciclina
TGF-β	Fator de Crescimento e Transformação beta
TIMP	Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMP-1-4)
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
t-PA	Ativador do Plasminogênio tipo Tecidual
u-PA	Ativador do Plasminogênio tipo Uroquinase
V	Volts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 HIPERPLASIA INTIMAL	26
1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS	27
1.3 METALOPROTEINASES DE MATRIZ EXTRACELULAR	29
1.4 DOXICICLINA	33
2 OBJETIVOS	35
3 MATERIAL E MÉTODO	38
3.1 ANIMAIS	39
3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE ESTENOSE ÍNTRINSECA	39
3.2.1 PINO PARA ESTENOSE	39
3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	40
3.3.1 CIRURGIA DE ANIMAIS ESTENOSADOS	40
3.3.2 CIRURGIA DE ANIMAIS SHAM-OPERADOS	41
3.4 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS	43
3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	43
3.5.1 MICROSCOPIA ÓPTICA DE ALTA RESOLUÇÃO	44
3.5.2 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA	45
3.5.3 MICROSCOPIA ÓPTICA CONVENCIONAL	46
3.5.4 IMUNOISTOQUÍMICA	47
3.5.5 AVALIAÇÃO DO COLÁGENO E DA ELASTINA	48
3.5.6 ZIMOGRFIA CONVENCIONAL	49
3.5.7 ZIMOGRFIA <i>IN SITU</i>	50
3.5.8 WESTERN BLOT	50

3.6 ESTATÍSTICA	52
4 RESULTADOS	53
4.1 OBSERVAÇÕES GERAIS	54
4.2 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA	55
4.2.1 - 1 dia	55
4.2.2 - 7 dias	57
4.2.3 - 15 dias	59
4.3 IMUNOISTOQUÍMICA	61
4.3.1 - 1 dia	61
4.3.2 - 7 dias	64
4.3.3 - 15 dias	67
4.4 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA	71
4.4.1 - 7 dias	71
4.4.2 - 15 dias	72
4.5 AVALIAÇÃO DO COLÁGENO E DA ELASTINA	74
4.5.1 - 7 dias	74
4.5.2 - 15 dias	74
4.6 ZIMOGRAFIA CONVENCIONAL	76
4.6.1 pró-MMP-2	76
4.6.2 MMP-2	77
4.6.3 pró-MMP-9	79
4.6.4 MMP-9	80
4.7 ZIMOGRAFIA <i>IN SITU</i>	82
4.7.1 - 1 dia	82
4.7.2 - 7 dias	82

4.7.3 - 15 dias	82
4.8 <i>WESTERN BLOT</i>	85
4.8.1 eNOS	85
4.8.2 iNOS	87
5 DISCUSSÃO	89
6 CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS	101
APÊNDICE	114
ANEXO	120

1. INTRODUÇÃO

1.1 HIPERPLASIA INTIMAL

A lesão na parede arterial, seja com desnudamento endotelial ou não, pode levar a formação de uma hiperplasia intimal, fenômeno conhecido com diferentes nomes dependendo da sua provável origem. No caso de traumatismos, há reparação celular; nos casos de revascularização, seja por colocação de *stents* ou balões intra-arteriais, há formação de “neoíntima”; no caso de envolver alterações adaptativas na parede arterial - remodelamento arterial e com deposição de gordura: aterosclerose. Embora deva haver muitos pontos em comum em todas essas situações, os mecanismos envolvidos ainda não estão completamente esclarecidos, portanto, a literatura pertinente as separa de acordo com o modelo proposto no estudo.

Vários fatores estão envolvidos na resposta à lesão vascular, todavia, os mediadores inflamatórios desenvolvem um papel crucial na iniciação e progressão dos fenômenos secundários a essas lesões (IP et al., 1990). Entre os mediadores inflamatórios estão incluídos: moléculas de adesão celular, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, os quais controlam o recrutamento de células inflamatórias (monócitos/macrófagos, neutrófilos e linfócitos T), células musculares lisas e proteínas envolvidas na síntese e degradação de matriz extracelular (DAVIS et al., 2003). A participação destes fatores tem sido invariavelmente relatada na maioria dos artigos que envolvem o desenvolvimento de hiperplasias intimaais, seja qual for o seu desencadeante. Esses mediadores possuem múltiplos e variados efeitos sobre os constituintes da parede do vaso, incluindo as células endoteliais, as células musculares lisas e as proteínas da matriz extracelular (DAVIS et al., 2003). Quando há formação de trombo, os seus componentes podem apresentar uma participação ativa no desenvolvimento dessas lesões.

A hiperplasia intimal tem sido caracterizada como um espessamento subendotelial formado, essencialmente, por células musculares lisas, algumas células inflamatórias e matriz extracelular (NEWBY; ZALTSMAN, 2000). A migração e proliferação de células musculares lisas contribuem para a formação da neoíntima. Entre os mediadores responsáveis por facilitar esta migração, as metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) parecem ter papel relevante durante esse processo (FRANCO et al., 2006). Entretanto, os mecanismos ainda não foram totalmente elucidados.

1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS

Vários modelos experimentais têm sido desenvolvidos para estudar as respostas proliferativas após uma lesão vascular (IP et al., 1990). Dentre estes, estão relacionados modelos provocando alterações dos efeitos do cisalhamento, turbulência e distúrbios de fluxo em diferentes situações, tais como: modelos animais (estenose arterial por meio de ligadura ou por clip metálico em forma de U) (JORIS; ZAND; MAJNO, 1982; ZAND et al., 1988; ZAND et al., 1991), modelos *in vitro* e modelos físicos auxiliados por simulações matemático-computacionais (ZAND et al., 1999). A grande crítica em relação aos modelos *in vivo* tem sido a possível interferência de forças atuantes nas paredes dos vasos, especialmente nos modelos de obstrução extrínseca (tipo clip, anel ou ligadura externa). Em 1999, Zand et al. sugeriram um modelo experimental de estenose intrínseca da aorta, através da inserção de um pino de acrílico semi-hemisférico no orifício da artéria renal esquerda de ratos Wistar adultos, criando assim, um distúrbio de fluxo importante. A novidade seria a produção de uma obstrução importante (em torno de 50%) sem, no entanto, afetar de forma significativa as forças que atuam na parede arterial. Neste modelo,

os autores estudaram a deposição lipídica sobre as áreas de lesão ao redor do pino, após quatro meses de dieta hipercolesterolêmica. Microscopicamente, estas áreas correspondiam a focos definidos de espessamento intimal e deposição lipídica. Utilizando modelos físicos em maior escala para fins de comparação, observaram que havia coincidência entre estas áreas e as de baixo cisalhamento, separação de fluxo e recirculação, relacionando-as, finalmente, ao possível desenvolvimento de aterosclerose (ZAND et al., 1999).

Este modelo experimental foi utilizado com êxito em nosso laboratório na obtenção da hiperplasia intimal e no conhecimento de seu desenvolvimento (BENELI et al., *in press*). Após 1 dia da cirurgia, observamos a formação de um trombo de grandes proporções, resultante do turbilhonamento gerado a partir da inserção do pino acrílico na aorta, em provável associação à ruptura da lâmina elástica interna. Decorridos 7 dias da cirurgia, os trombos estavam parcialmente organizados, ocorrendo migração das células musculares lisas provenientes da camada média. Quinze dias após a cirurgia, os trombos já estavam totalmente organizados; as células musculares lisas que migraram da camada média estavam embebidas em matriz extracelular, sendo denominada de neoíntima (ou hiperplasia intimal). Dentre os fatores estudados, PDGF-B (fator de crescimento derivado de plaquetas-B), iNOS (óxido nítrico sintase induzível) e fibrinogênio mostraram-se além de potentes quimiotáticos, ativadores de enzimas proteolíticas, que liberadas pelas células musculares lisas degradaram as proteínas da matriz extracelular, facilitando sua migração (BENELI et al., *in press*). As metaloproteinases da matriz extracelular, principais enzimas proteolíticas com desempenho importante no processo de degradação e migração das células musculares lisas da camada média para a íntima, não foram analisadas neste 1º estudo.

1.3 METALOPROTEINASES DE MATRIZ EXTRACELULAR

Em 1962, Gross e Lapiere descreveram uma atividade colagenolítica liberada durante o processo de degradação de proteínas da matriz extracelular requeridas na morfogênese da cauda de girinos, denominada posteriormente de metaloproteinasas da matriz extracelular (MMPs). As MMPs são endopeptidases cálcio-dependente, contendo zinco, expressas em várias células e tecidos, incluindo células da musculatura vascular lisa, endotélio, fibroblastos e células inflamatórias. A família das MMPs apresenta 28 enzimas, as quais são responsáveis pela degradação de vários componentes da matriz extracelular, incluindo componentes da membrana basal, colágeno, fibronectina e proteoglicanos (OHBAYASHI et al., 2002). As MMPs apresentam alguns domínios estruturais semelhantes. Diferentes metaloproteinasas são produzidas por diferentes tipos celulares e se diferem em relação a especificidade de substratos (BRINCKERHOFF; MATRISIAN, 2002). A classificação foi baseada na proteólise, estrutura primária e localização subcelular: (1) Colagenases intersticiais (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18); (2) Gelatinases (MMP-2 ou Gelatinase A e MMP-9 ou Gelatinase B); (3) Estromelinas (Estromelina 1 ou MMP-3 e Estromelina 2 ou MMP-10); (4) Matrilisinas (Matrilisina 1 ou MMP-7 e Matrilisina 2 ou MMP-26); (5) MMPs de membranas (MT1-MMP (MMP-14), MT2-MMP (MMP-15), MT3-MMP (MMP-16), MT4-MMP, MT5-MMP e MT6-MMP (MMP-25)) e (6) outras MMPs (MMP-12, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27 e MMP-28) que não se enquadram nesses grupos principais (DONNELLY; COLLINSON; MANNING, 2003; VISSE; NAGASE, 2003). Estas MMPs são sintetizadas e secretadas como pró-forma latente (zimogênios ou pró-MMPs). Podem ser reguladas por mecanismos de transcrição ou mecanismos pós-tradução. A regulação na transcrição acontece por vários fatores incluindo fatores de

crescimento, hormônios e citocinas (MAUVIEL, 1993; LOFTUS; THOMPSON, 2002; DONNELLY; COLLINSON; MANNING, 2003; TSURUDA et al., 2004). Com relação aos mecanismos de pós-tradução, a pró-forma da enzima, latente na matriz extracelular dos tecidos, pode ser ativada por fatores como tensão de cisalhamento, tensão mecânica e estresse oxidativo (Figura 1). O pró-peptídeo também é removido resultando na ativação da MMP, por outras proteases da matriz, como por exemplo, a trombina e plasmina (DONNELLY; COLLINSON; MANNING, 2003; NELSON; MELENDEZ, 2004).

Schulz R. 2007.

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 47:211-42

Figura 1. Esquema representativo dos mecanismos de ativação da MMP-2. Existem duas vias para a ativação da MMP-2. A ativação direta ocorre a partir da remoção do domínio pró-peptídeo auto-inibitório do zimogênio de 72kDa resultando na forma ativa de 64kDa (seta horizontal superior) ou indiretamente por modificações pós-tradução causadas pelo estresse oxidativo (ONOO⁻; GSH) (Pró-MMP ativa) seguida pela ação de proteínases, tornando assim a MMP ativa. MMP, matrix metaloproteinase; ONOO⁻, peroxinitrito; GSH, glutatona celular. Modificado de SCHULZ R., 2007 Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 47: 211-42.

As MMPs têm mostrado um papel significativo em vários processos fisiológicos no remodelamento da matriz extracelular através da degradação de proteínas em suas ligações peptídicas específicas (VISSE; NAGASE, 2003), como

embriogênese (VU; WERB, 2000) e angiogênese (ROY et al., 2006), mas também contribui em processos patológicos como metástases tumorais (DERYUGINA; QUIGLEY, 2006), inflamação e artrite (MOHAMMED; SMOOKLER; KHOKHA, 2003). Dentre as MMPs, as gelatinases A e B (MMP-2 e MMP-9, respectivamente), vêm sendo descritas com um papel importante em várias doenças cardiovasculares, como aterosclerose, acidente vascular cerebral, falência cardíaca e aneurisma, além de evidências recentes da resposta aumentada ao estresse oxidativo, principalmente a MMP-2 (CHOW; CENA; SCHULZ, 2007). A MMP-2 se caracteriza em sua forma latente por uma massa molecular de 72 kDa e é encontrada na musculatura vascular lisa, endotélio e glomérulos (CAROME et al., 1994). Vários estudos sugerem que a MMP-2 está envolvida no remodelamento vascular associado a doenças cardiovasculares por promover tanto a degradação excessiva das proteínas da matriz extracelular, como por acentuar a migração de células musculares lisas (LI et al., 1996; BENDECK et al., 1994; JENKINS et al., 1998). A MMP-9 apresenta uma massa molecular de 92 kDa em sua forma latente e 82 kDa em sua forma ativa (GALIS et al., 1994) e está presente em macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, células mesangiais, células endoteliais e células da musculatura lisa vascular (VAN den STEEN et al., 2002). Há evidências de que ocorra grande expressão da MMP-9 em regiões de placas ateroscleróticas e vários estudos sugerem que a MMP-9 pode ser um biomarcador de doenças cardiovasculares (ALTIERI et al., 2003; BLANKENBERG et al., 2003; LYNCH et al., 2004) e de doenças neoplásicas (FARIAS et al., 2000; RANUNCOLO et al., 2003).

Alguns trabalhos clínicos e experimentais mostraram o aumento da concentração e atividade dessas enzimas tanto em plasma como em vasos sanguíneos. Estes estudos sugerem que o estiramento e tensão mecânica que

acontece nos vasos sanguíneos durante um processo de hipertensão aumentam a expressão e a atividade das MMP-2 e MMP-9 nas células da musculatura vascular lisa (ASANUMA et al., 2003; MENG et al., 1999; CHESLER et al., 1999), e MMP-9 nas células endoteliais (MAGID; MURPHY; GALIS, 2003), e que a expressão e a atividade destas enzimas também aumentam em resposta a uma lesão tecidual (JENKINS et al., 1998; COURTMAN et al., 2004). A deleção gênica (*knockout*) em animais para MMP-2 e 9, demonstrou a inibição da migração das células musculares lisas da camada média para a íntima e posterior formação da hiperplasia intimal em modelo experimental de lesão arterial (KUZUYA et al., 2003; JOHNSON; GALIS 2004). Estes dados sugerem a participação destas duas gelatinases neste processo.

A atividade das MMPs pode ser modulada tanto por inibidores endógenos (inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs)) como exógenos (sintéticos). Os TIMPs são pequenas proteínas (aproximadamente 23 kDa) que inibem a atividade das MMPs por estarem ligados a elas, sendo que já foram descritos quatro TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4) (DONNELLY; COLLINSON; MANNING, 2003). Em geral, os TIMPs não apresentam especificidade por nenhuma MMP em particular (BREW; DINAKARPANDIAN; NAGASE, 2000), embora a TIMP-2 mostre uma preferência pela MMP-2 e a TIMP-1 pela MMP-9 (LI et al., 1998; CHOW; CENA; SCHULZ, 2007).

Além dos TIMPs, vários inibidores sintéticos das MMPs têm sido usados, não apenas experimentalmente, mas como potenciais agentes terapêuticos no tratamento do câncer, inflamação e doenças cardiovasculares (PETERSON, 2004; CHOW; CENA; SCHULZ, 2007). Existem vários inibidores, mas em particular os peptídeos sintéticos (batimastat e marimastat), o-fenantrolina, GM-6001 (*Galardin*), PD-166793 e as tetraciclina (minociclina e doxiciclina). As tetraciclina pertencem a

uma classe de antibióticos inibidores de amplo espectro das MMPs de significativa utilidade clínica. Golub et al. (1983, 1998) observaram enquanto estudavam a inflamação da gengiva e a periodontite em modelo animal, que as tetraciclina possuem atividade inibitória de MMPs independente de suas propriedades antimicrobianas (CHOW; CENA; SCHULZ, 2007). Dentre as tetraciclina, a de maior importância seria a doxíciclina.

1.4 DOXICICLINA

A doxiciclina é um antibiótico pertencente ao grupo das tetraciclinas que age no metabolismo de bactérias impedindo sua nutrição, desenvolvimento e reprodução. Além disso, é um inibidor não-seletivo de MMPs e a sua principal forma de ação é através da ligação ao sítio de zinco ativo, além de também se ligar ao sítio de cálcio não-ativo, resultando na alteração conformacional da estrutura da enzima e perda de atividade (GREENWALD et al., 1998; LOFTUS; THOMPSON, 2002; PETERSON, 2004).

Figura 2. Esquema representativo da molécula de doxiciclina [$C_{22}H_{24}N_2O_8$ - HCl - $1/2(H_2O)$ - $1/2(C_2H_6O)$]. Retirado de Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=D9891|SIGMA&N5=SEARCH CONCAT PNOIBRAND KEY&F=SPEC>)

Vários estudos *in vitro* têm proposto a influência das tetraciclinas nas funções celulares, como: inibir a proliferação de células endoteliais e de osteossarcomas; induzir apoptose de macrófagos, de osteossarcoma e de células de carcinoma mamário; inibir migração de células tumorais e reduzir a síntese de matriz pelos condrócitos. Além disso, diminuiriam a expressão de mRNA (RNA mensageiro) em macrófagos e células mesangiais e a produção de TNF- α (fator de necrose tumoral- α) e de espécies reativas do oxigênio (BENDECK et al., 2002).

Experimentalmente, a doxíciclina tem sido usada como inibidora da degradação da matriz extracelular durante a formação (CURCI et al., 1998; PRALL et al., 2002; MANNING; CASSIS; DAUGHERTY, 2003) e crescimento (FRANKLIN et al., 1999; CURCI et al., 2000; BAXTER et al., 2002) de aneurismas da aorta abdominal, limitando a atividade das MMPs. Além de utilizada como tratamento profilático de síndromes coronarianas agudas (AXISA et al., 2002; BROWN et al., 2004; FRANCO et al., 2006). Sua ação na hiperplasia intimal é bastante controversa. Alguns autores sugerem que esta inibiria a migração e proliferação de células musculares lisas da camada média para a íntima, atenuando o espessamento intimal pós-angioplastia (FRANCO et al., 2006) e outros autores não observaram diferença efetiva na inibição da hiperplasia intimal (PETRIK et al., 1996; BENDECK et al., 2002; PYO; 2004).

A partir desses dados, decidimos estudar a participação das metaloproteinases 2 e 9 no desenvolvimento da hiperplasia intimal decorrente deste modelo experimental de estenose intrínseca da aorta usando a doxíciclina como inibidor sintético não-seletivo.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo é:

- Avaliar a participação das metaloproteinases 2 e 9 no desenvolvimento da hiperplasia intimal observada no modelo experimental de estenose intrínseca da aorta nos períodos de 1, 7, e 15 dias nos animais tratados e não-tratados com a doxíciclina.

Os objetivos específicos do presente estudo são:

- Avaliar morfolologicamente o desenvolvimento da hiperplasia intimal observado no modelo experimental de estenose intrínseca da aorta nos períodos de 1, 7, e 15 dias, através da microscopia óptica de alta resolução nos animais tratados e não-tratados com a doxíciclina;
- Avaliar morfometricamente a hiperplasia intimal e a camada média nas regiões adjacentes ao pino acrílico nos animais tratados e não-tratados com a doxíciclina;
- Avaliar morfometricamente possíveis variações nas espessuras da íntima e da camada média nas regiões a montante e a jusante da hiperplasia intimal nos animais tratados e não-tratados com a doxíciclina;

- Avaliar a deposição de colágeno e elastina na hiperplasia intimal e a camada média nas regiões adjacentes nos períodos de 1, 7, e 15 dias nos animais tratados e não-tratados com a doxíciclina;
- Avaliar através da zimografia convencional, zimografia in situ e imunoistoquímica a participação das metaloproteinases 2 e 9 no desenvolvimento da hiperplasia intimal nos períodos de 1, 7, e 15 dias nos animais tratados e não-tratados com a doxíciclina;
- Analisar a expressão de eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) e iNOS pelo Western Blot nos períodos de 1, 7, e 15 dias nos animais tratados e não-tratados com a doxíciclina.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados efetivamente 288 ratos Wistar, machos, com peso médio de 250 g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Os animais foram alocados individualmente no Biotério do Departamento de Patologia, em gaiolas de polipropileno com tampas de aço inoxidável perfuradas, mantidos com dieta sólida normal e água de torneira *ad libitum*. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Protocolo 067/2004 – ANEXO).

3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE ESTENOSE INTRÍNSECA

3.2.1 PINO PARA A ESTENOSE

O pino hemisférico de acrílico foi confeccionado pela Oficina de Precisão do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, tendo as seguintes medidas: capa semi-esférica $\cong 0,9 \times 1,5$ mm e a haste 3×1 mm (Figura 3).

Estas dimensões foram determinadas com base no diâmetro médio da aorta dos animais estudados, a fim de se obter aproximadamente 50-60% de obstrução intraluminal em torno do 15º dia de experimento.

Figura 3. Pino hemisférico de acrílico. Barra 2mm.

3.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

3.3.1 CIRURGIA DE ANIMAIS ESTENOSADOS

Os animais foram anestesiados com a associação de xilazina (Coopazine®, Coopers Brasil, São Paulo, SP, Brasil) na dose de 8 mg/Kg e cloridrato de cetamina (Agener, União Química, Embu-Guaçu, SP, Brasil) na dose de 74 mg/Kg, administrados via intraperitoneal. Após tricotomia abdominal e assepsia com álcool iodado, os animais foram fixados em decúbito dorsal numa mesa cirúrgica adaptada sendo feita então, uma incisão mediana com 4 cm de extensão. Com auxílio de um afastador, as vísceras foram deslocadas para a direita do animal possibilitando a exposição da aorta e do rim esquerdo. Após dissecação do pedículo renal, os vasos foram ligados na região adjacente ao hilo utilizando fio de algodão 3-0 (Figura 4A). Imediatamente então, procedeu-se a nefrectomia, deixando um coto arterial com fio de reparo para posterior inserção do pino acrílico. Em seguida ao isolamento da aorta, dois *clips* cirúrgicos foram colocados, um acima e outro abaixo, da origem da artéria renal esquerda, obliterando temporariamente o fluxo sanguíneo aórtico (o *clip* proximal deve permanecer abaixo da origem da artéria renal direita, de forma a não induzir isquemia renal) (Figura 4B). Após a arteriotomia do coto da artéria renal esquerda (Figura 4C), o pino foi inserido e fixado por três ligaduras com fio de nylon 7-0 (Paramed Suturas, São Paulo, SP, Brasil) e então, os *clips* foram retirados (Figura 4D). Após revisão da cavidade abdominal (Figura 4E), procedeu-se a lavagem da mesma com solução salina a 0,9% e sutura dos planos abdominais utilizando pontos contínuos com fio de algodão 3-0. A pele foi suturada utilizando o mesmo fio, com pontos em U. O procedimento durou cerca de 45 minutos e então, os animais foram alocados em gaiolas com maravalha, recebendo dieta sólida normal e água *ad libitum*.

3.3.2 CIRURGIA DE ANIMAIS SHAM-OPERADOS

Os animais foram anestesiados com a associação de xilazina (Coopazine®, Coopers Brasil, São Paulo, SP, Brasil) na dose de 8 mg/Kg e cloridrato de cetamina (Agener, União Química, Embu-Guaçu, SP, Brasil) na dose de 74 mg/Kg, administrados via intraperitoneal. Após tricotomia abdominal e assepsia com álcool iodado, os animais foram fixados em decúbito dorsal numa mesa cirúrgica adaptada sendo feita então, uma incisão mediana com 4 cm de extensão. Com auxílio de um afastador, as vísceras foram deslocadas para a direita do animal possibilitando a exposição da aorta e do rim esquerdo. Após dissecação do pedículo renal, os vasos foram ligados na região adjacente ao hilo utilizando fio de algodão 3-0. Imediatamente então, procedeu-se a nefrectomia. Após revisão da cavidade abdominal, procedeu-se a lavagem da mesma com solução salina a 0,9% e sutura dos planos abdominais utilizando pontos contínuos com fio de algodão 3-0. A pele foi fechada utilizando o mesmo fio, com pontos em U. O procedimento durou cerca de 30 minutos e então, os animais foram alocados em gaiolas com maravalha, recebendo dieta sólida normal e água *ad libitum*.

Figura 4. Seqüência do procedimento cirúrgico para inserção de um pino de acrílico no orifício da artéria renal esquerda, visando a estenose da aorta neste segmento: (A) Ligadura dos vasos do hilo renal esquerdo para posterior nefrectomia; (B) Interrupção temporária do fluxo por *clips* cirúrgicos. Notar o coto arterial ligado ao fio de reparo; (C) Arteriotomia do coto da artéria renal esquerda para a inserção do pino de acrílico na aorta; (D) Ligaduras com fio de nylon 7-0 após a inserção do pino; (E) revisão da cavidade abdominal; (F) Visão macroscópica do segmento de aorta com o pino já inserido no orifício da artéria renal esquerda. A seta (→) indica o orifício da artéria renal direita; (p) proximal, (d) distal. Barra = 2 mm.

3.4 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Os animais, depois de pesados, foram anestesiados com a associação de cloridrato de cetamina e xilazina, fixados em decúbito dorsal numa mesa cirúrgica adaptada. Após incisão abdominal mediana, as vísceras foram afastadas para a dissecação da aorta e localização do pino de acrílico. Foi aberta então, a cavidade torácica e realizada a secção da aorta supra-diafragmática. Após a exsanguinação, o segmento da aorta abdominal foi seccionado aproximadamente 3 cm proximal e distal da origem da artéria renal esquerda. Logo após, uma cânula foi inserida na extremidade proximal da aorta para a perfusão de líquidos, de acordo com o delineamento experimental de cada grupo.

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram separados em quatro grupos:

- Grupo sham-operado (S):
 - ⇒ S1: animais sham-operados e sacrificados 1 dia após a cirurgia;
 - ⇒ S7: animais sham-operados e sacrificados 7 dias após a cirurgia;
 - ⇒ S15: animais sham-operados e sacrificados 15 dias após a cirurgia;
- Grupo sham-operado tratado com doxiciclina (SD):
 - ⇒ SD1: animais sham-operados tratados, sacrificados 1 dia após a cirurgia;
 - ⇒ SD7: animais sham-operados tratados, sacrificados 7 dias após a cirurgia;
 - ⇒ SD15: animais sham-operados tratados, sacrificados 15 dias após a cirurgia;

- Grupo estenosado (E):
 - ⇒ E1: animais estenosados e sacrificados 1 dia após a cirurgia;
 - ⇒ E7: animais estenosados e sacrificados 7 dias após a cirurgia;
 - ⇒ E15: animais estenosados e sacrificados 15 dias após a cirurgia;
- Grupo estenosado tratado com doxiciclina (ED):
 - ⇒ ED1: animais estenosados tratados, sacrificados 1 dia após a cirurgia;
 - ⇒ ED7: animais estenosados tratados, sacrificados 7 dias após a cirurgia;
 - ⇒ ED15: animais estenosados tratados, sacrificados 15 dias após a cirurgia;

Os animais tratados (SD e ED) receberam uma dose de 30mg/Kg/dia de doxiciclina por gavagem 48 horas antes da cirurgia e até o dia do sacrifício.

3.5.1 MICROSCOPIA ÓPTICA DE ALTA RESOLUÇÃO

Após a lavagem com solução salina a 0,9% gelada (4°C), as aortas (n=5 para cada grupo/dia) foram perfundidas com formol a 10% tamponado, limpas dos tecidos adjacentes sob lupa Leica L2 (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha) e imersas no mesmo fixador por um período de 24 horas. Em seguida, as aortas foram recortadas longitudinalmente, separadas nas porções proximal e distal em relação ao pino e processadas segundo o protocolo descrito na sequência: desidratação em série crescente de álcool nas concentrações 50, 70 e 95% (três trocas de 15 minutos cada) e 100% (três trocas de 20 minutos cada); infiltração em resina com soluções pré-infiltradora e infiltradora (ANEXO), ambas *overnight* e inclusão em Historesin®

(Leica Instruments GmbH, Heidelberg, Alemanha). Cortes de 2,5 μm foram obtidos em micrótomo Sorvall JB4-A (DuPont Company, Newtown, CT, EUA), estirados em banho-maria à temperatura ambiente, colocados em lâminas de vidro e secos em platina aquecedora a uma temperatura de 55-60°C por aproximadamente 24 horas. Logo após, os cortes foram corados com azul de toluidina e fucsina básica (HE-like) (ANEXO) (ABREU; BAROZA; ROSSI, 1993) e resorcina-fucsina (ANEXO) (CANNON; STUTH, 1993) para evidenciar fibras elásticas.

3.5.2 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA

As imagens obtidas a partir das lâminas de microscopia óptica de alta resolução foram analisadas morfometricamente com auxílio do programa Leica QWin® (Leica Microsystems Cambridge Ltda, Cambridge, Reino Unido), instalado em um microcomputador acoplado a uma câmara digital. A aorta foi dividida em quatro regiões assim definidas: I1 – região da parede arterial a montante da neoíntima proximal; M1 - Camada média muscular subjacente à região I1; I2 - Segmento da aorta na região da neoíntima proximal propriamente dito; M2 - Camada média muscular subjacente à região I2; I3 - Segmento de aorta na região da neoíntima distal propriamente dito; M3 - Camada média muscular subjacente à região I3; I4 - Região da parede arterial a jusante da neoíntima distal; M4 - Camada média muscular subjacente à região I4. Uma representação esquemática dessas regiões é ilustrada na figura 5.

Na íntima foi mensurada a espessura. Na camada média foram avaliadas: espessura, quantidade de lâminas elásticas e densidade celular em uma área padrão de 0,015 mm². Na neoíntima foram avaliados: espessura da lesão, extensão

a partir do pino, área total e densidade celular da lesão nas regiões proximal e distal em uma área padrão de 0,015 mm².

As regiões I1 e I4 foram definidas na dependência da extensão das regiões I2 e I3, considerando caso a caso. Com relação aos controles, as divisões das regiões foram baseadas na localização da artéria renal esquerda.

Figura 5. Esquema ilustrando as regiões da aorta onde foram feitas as mensurações. I1 = Segmento da aorta a montante da neoíntima proximal; M1 = Camada média muscular subjacente à região I1; I2 = Segmento da aorta na região da neoíntima proximal propriamente dito; M2 = Camada média muscular subjacente à região I2; I3 = Segmento de aorta na região da neoíntima distal propriamente dito; M3 = Camada média muscular subjacente à região I3; I4 = Segmento da aorta a jusante da neoíntima distal; M4=Camada média muscular subjacente à região I4. (p) proximal; (d) distal; A seta indica a direção do fluxo.

3.5.3 MICROSCOPIA ÓPTICA CONVENCIONAL

Após a coleta, os fragmentos (n=6 para cada grupo/dia) foram processados como descrito na sequência: desidratação em série crescente de álcoois 80, 90 e 95% (um banho de 20 minutos cada) e 100% (três banhos de 20 minutos); diafanização com xilol (três banhos de 15 minutos cada), infiltração de parafina (três banhos de 30 minutos cada) e inclusão. A partir dos blocos, foram feitos cortes histológicos de 4µm de espessura em micrótomo automático Leica RM 2155 (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha). Estes cortes foram dispostos em lâminas com poli-L-Lisina (P8920, Sigma, St. Louis, MO, EUA) e levados à estufa a 60°C por aproximadamente 12 horas. Para a coloração de hematoxilina-eosina

(H&E) foi realizada a desparafinização em três banhos de xilol por 15 minutos cada e quatro passagens em alcoóis de concentrações decrescentes desde 100% até 70%. Posteriormente os cortes foram lavados em água corrente e corados pela hematoxilina de Harris por 5 minutos. Em seguida, o excesso de corante foi removido em água corrente e feita a diferenciação em álcool ácido 70% e posterior lavagem em água corrente. Os cortes foram azulados em solução Scott por 30 segundos e depois lavados em água corrente, passados pelo álcool 80%, 90%, 100% e corados por eosina alcoólica por 30 segundos. Logo após, foram passados em alcoóis de concentrações crescentes a partir de 70% até absoluto, seguido de três banhos de xilol e montagem com lamínula. Cortes adicionais foram separados para a imunoistoquímica.

3.5.4 IMUNOISTOQUÍMICA

As lâminas parafinadas (n=6 para cada grupo/dia) obtidas como descrito anteriormente, foram utilizadas nas reações de imunoistoquímica pelo método avidina-biotina-peroxidase. Os anticorpos primários utilizados, suas origens e diluições estão listados na tabela 1. Os anticorpos secundários utilizados foram: *Biotinylated anti-rabbit IgG* (H+L) BA-1000, *Biotinylated anti-goat IgG* (H+L) BA-9500 e *Biotinylated anti-mouse IgG* (H+L) BA-2000, todos obtidos da Vector Laboratories (Burlingame, CA, EUA). O controle negativo das reações foi realizado através da substituição dos anticorpos primários por PBS. Os protocolos das reações e preparo das soluções estão descritos no anexo.

Após a leitura das lâminas, os resultados foram analisados de forma semi-quantitativa por dois observadores de acordo com o seguinte critério: (ϕ) sem lesão; (-) negativo; (+) leve; (++) moderado e (+++) intenso.

Tabela 1. Anticorpos primários e diluições utilizadas nas reações de imunoistoquímica.

Anticorpo	Clone	Espécie	Origem	Diluição
α -actina	1A4	Camundongo	RDI	1/800
Fibrinogênio		Coelho	Dako	1/1000
PCNA	PC10	Camundongo	Novo Castra Laboratories	1/200
PDGF-B	H-55	Coelho	Santa Cruz Biotechnology	1/100
MMP-2	K-20	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	1/100
MMP-9	C-20	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	1/100

RDI (Flanders, NJ, Estados Unidos); Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, Estados Unidos); Dako (Carpinteria, CA, Estados Unidos); Novo Castra Laboratories (Newcastle-upon-Tyne, UK).

3.5.5 AVALIAÇÃO DO COLÁGENO E DA ELASTINA ATRAVÉS DA AUTOFLUORESCÊNCIA

A autofluorescência foi obtida a partir das lâminas de microscopia óptica convencional coradas com H&E. A morfometria foi efetuada com auxílio do programa Leica QWin® (Leica Microsystems Cambridge Ltda, Cambridge, Reino Unido), instalado em um microcomputador acoplado a uma câmara digital utilizando filtro FITC. A aorta foi separada iterativamente em três regiões (Figura 5): camada média (média das regiões M1 e M4), camada média abaixo do trombo/neoíntima (média das regiões M2 e M3) e trombo/neoíntima (média das regiões I2 e I3) e estas foram analisadas a partir da fluorescência obtida em pixels. A autofluorescência foi gerada pela eosina (fluorocromo) presente na coloração de H&E, a qual tem afinidade pelo colágeno e elastina presentes na parede da aorta (DE CARVALHO; TABOGA, 1996; ANDREASSON; ABT; JÖNSSON-RYLANDER et al., 2005)

3.5.6 ZIMOGRAFIA CONVENCIONAL

Após a coleta, as aortas (n=4 para cada grupo/dia) foram perfundidas com solução salina a 0,9% gelada (4°C), limpas de tecidos adjacentes, secas em papel de filtro, pesadas em balança de precisão, colocadas em *eppendorf* e congeladas em nitrogênio líquido. No momento da extração das proteínas, foi adicionado de acordo com a quantidade de tecido (0,08g) tampão Tris CaCl₂ 50 mM pH 7,4 juntamente com os inibidores de proteases PMSF 0,2M, NEM 0,2M e fenantrolina 0,2M. As amostras foram homogeneizadas com o auxílio do equipamento Polytron (Nova Técnica Ind., Piracicaba, SP, Brasil) (Lab. Prof. José Eduardo Tanus – Departamento de Farmacologia FMRP/USP), centrifugadas, retirado o sobrenadante e deixadas *overnight* no gelo dentro do refrigerador (4°C). A seguir, foi realizada a dosagem de proteínas pelo método de Bradford (ANEXO) em espectrofotômetro. Posteriormente, as amostras foram preparadas, aplicadas nos géis de poliacrilamida a 12 % contendo 1 % gelatina e a eletroforese foi realizada em refrigerador a 15 mA. Terminada a corrida, os géis foram retirados das placas e deixados *overnight* em tampão Tris CaCl₂ 50 mM pH 7,4 para a degradação da gelatina contida no gel pelas metaloproteinases. Em seguida, os géis foram corados, descorados, fotografados em equipamento Kodak *Electrophoresis Documentation and Analysis System* (EDAS) 290 (Kodak, Rochester, NY, EUA) (Lab. Prof. José Eduardo Tanus – Departamento de Farmacologia FMRP/USP), colocados em solução de contração e secos envoltos por papel celofane. O preparo das soluções está descrito no anexo. As formas pró e ativa das MMP-2 e MMP-9 eram identificadas através de suas massas moleculares 72 KDa, 64 KDa, 92 KDa e 88 KDa, respectivamente (GERLACH et al., 2005; 2007).

3.5.7 ZIMOGRAFIA *IN SITU*

Após a coleta, as aortas (n=4 para cada grupo/dia) foram perfundidas com solução salina a 0,9% gelada (4°C), limpas de tecido adjacente, secas em papel de filtro, inclusas em Tissue Tek® O.C.T. *Compound* (Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA, EUA) e congeladas em isopentano e nitrogênio líquido. Foram obtidos cortes de 4µm de espessura em criostato Microm 505E (Microm International GmbH, Walldorf, Alemanha), dispostas em lâminas com poli-L-Lisina (P8920, Sigma, St. Louis, MO, EUA) e mantidas em freezer (-20°C) até o momento da realização da técnica. Após o preparo da câmara úmida, foi colocado sobre as lâminas 20µl da solução de DQ™ *Gelatin* de pele de porco conjugada com fluoresceína (Invitrogen - Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) na proporção de 2µl de DQ™ *Gelatin* em 18 µl de tampão Tris CaCl₂ 50 mM pH 7,4 e incubadas por uma hora no escuro. Logo após esse período, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS (solução salina tamponada) e fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4% por 10 minutos (GALIS et al., 1994; LINDSEY et al., 1998). As imagens foram capturadas com o auxílio de uma câmera digital (Leica DC300F; Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Suíça) acoplada a um microscópio (Leica DMR; Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemanha) e analisadas com o programa Leica QWin® (Leica Microsystems Cambridge Ltda, Cambridge, Reino Unido) instalado em um microcomputador.

3.5.8 WESTERN BLOT

Coleta e Extração de Proteínas

Após a coleta, as aortas (n=5 para cada grupo/dia) foram perfundidas com solução salina a 0,9% gelada (4°C), limpas de tecidos adjacentes, secas em papel

de filtro, pesadas em balança de precisão, colocadas em *ependorfs* e congeladas em nitrogênio líquido. As proteínas foram extraídas com tampão contendo Tris-HCl 0,01M pH 7,6, EDTA 0,001M pH 8,0, SDS 0,1%, NaCl 0,1M e inibidores aprotinina e PMSF (ANEXO). As amostras foram homogeneizadas com o auxílio do equipamento Polytron (Nova Técnica Ind., Piracicaba, SP, Brasil) e centrifugadas em 13000G (5810R, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). Logo após, foi coletado o sobrenadante e feita a dosagem protéica utilizando o kit Quant-iT™ *Protein Assay* em fluorômetro Quant-iT™ (Invitrogen - Molecular Probes, Eugene, OR, EUA).

Eletroforese e Transferência

Para a eletroforese (LAEMMLI, 1970), foram utilizados géis de acrilamida a 10% (eNOS e iNOS) e 12% (α -tubulina) (ANEXO). As amostras foram preparadas na proporção de 40 mg de proteína para X de tampão de amostra (dependente da concentração protéica) para aplicação de 20 μ l em cada poço. Posterior ao preparo e aplicação, a corrida foi realizada a 100V por aproximadamente uma hora em geladeira. Após esse período, o gel foi retirado e montado em um “sanduíche” na seguinte ordem: esponja, filtro de papel, gel, membrana de nitrocelulose (*Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane* - Amersham Place, Little Chalfont, Reino Unido), filtro de papel e esponja, todos embebidos em tampão de transferência pH 8,3 (ANEXO). A voltagem utilizada foi de 100V por uma hora em geladeira. Posteriormente, as membranas foram colocadas em cubetas e coradas com Ponceau a 0,5% para verificar se houve a transferência.

Imunodeteção

Após a transferência, as membranas foram incubadas *overnight* em solução de leite Molico a 5% diluído em TBS-T pH 7,6 (ANEXO) para o bloqueio de ligações

inespecíficas. Após a lavagem com TBS-T pH 7,6 (três trocas de 10 minutos cada), as membranas foram incubadas com o anticorpo primário (Tabela 2) *overnight*, lavadas com TBS-T pH 7,6 (três trocas de 10 minutos cada) e incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário (Tabela 2) conjugado com peroxidase (Abcam Inc., Cambridge, MA, EUA). Posteriormente, as membranas foram lavadas com TBS-T pH 7,6 e reveladas em câmara escura com Amersham ECL™ (Amersham Pharmacia, Little Chalfont, Reino Unido). Todos os passos da imunodeteção foram realizados com as membranas em agitação constante. Após a revelação, as membranas foram digitalizadas e analisadas com auxílio do programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Os valores foram obtidos em densidade óptica.

Tabela 2. Anticorpos primários e diluições utilizadas no *Western Blot*.

Anticorpo	Clone	Peso Molecular	Espécie	Origem	Diluição
α -tubulina	TU-02	55 kDa	Camundongo	Santa Cruz Biotechnology	1/200*
eNOS	H-159	140 kDa	Coelho	Santa Cruz Biotechnology	1/200**
iNOS	H-174	130 kDa	Coelho	Santa Cruz Biotechnology	1/200**

Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, Estados Unidos).

* Diluição do anticorpo secundário (cabra anti-camundongo IgM - HRP): 1/10.000;

** Diluição do anticorpo secundário (cabra anti-coelho IgG - HRP): 1/15.000.

3.6 ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste *t* de Student para comparação entre dois grupos e análise de variância (ANOVA) e *post hoc* de Newman-Keuls para múltiplas comparações com auxílio do programa estatístico GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Diferenças entre os resultados menores que 5% ($p < 0.05$) foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1 OBSERVAÇÕES GERAIS

Com a introdução do pino na aorta, foi observado um índice de obstrução maior no início do experimento, chegando até 80%. Após 15 dias, esse índice de estenose diminuía, atingindo aproximadamente 60%. Dos 320 animais operados, 288 (90%) foram utilizados, pois o pino estava corretamente inserido nas aortas. Os animais que apresentavam expulsão parcial ou completa não foram utilizados.

Todos os animais (estenosados e sham-operados tratados ou não) sofreram uma discreta diminuição do peso corporal nas primeiras 24 horas após a cirurgia, recuperando-se em torno do 7º dia (Gráfico 1). Após este período mais crítico, os animais apresentavam-se dispostos e com bom estado geral até o fim do experimento (15 dias).

Gráfico 1. Estimativa de ganho de peso dos animais após o procedimento cirúrgico nos grupos estenosado (E), sham-operado (S), estenosado tratado com doxiciclina (ED) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD) ao longo do experimento (1, 7 e 15 dias).

4.2 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

4.2.1 - 1 DIA

ANIMAIS ESTENOSADOS (E1)

Após 1 dia da introdução do pino, houve a ocorrência de trombose justaposta bilateralmente ao mesmo, sendo de maiores proporções na região distal.

Microscopicamente, os trombos estavam aderidos à parede do vaso e intimamente relacionados ao pino. Sua composição era basicamente de hemácias, plaquetas, fibrina e células inflamatórias, especialmente polimorfonucleares, evidenciando-se inclusive linhas de Zahn. A porção da parede muscular comprometida pelos trombos mostrava irregularidade, inclusive com ruptura das fibras elásticas da lâmina elástica interna. As alterações morfológicas estão apresentadas na Figura 6.

ANIMAIS ESTENOSADOS TRATADOS COM DOXICICLINA (ED1)

Foi observada a formação de um trombo de grandes proporções, semelhante ao grupo não-tratado (E1). Microscopicamente, os trombos estavam bem aderidos à parede do vaso e eram compostos por hemácias, células inflamatórias (polimorfonucleares), fibrina e plaquetas. Visualizavam-se linhas de Zahn. Foi observada a ruptura das fibras elásticas na camada média. As alterações morfológicas estão apresentadas na Figura 6.

Figura 6. Estudo morfológico com microscopia óptica de alta resolução dos animais estenosados e estenosados tratados com doxiciclina, sacrificados 1 dia após a cirurgia. **(A-B)** Corte longitudinal da aorta respeitando as proporções do pino mostrando trombo recente, com características semelhantes nas porções proximal e distal dos grupos estenosado (A) e estenosado tratado com doxiciclina (B). Azul de toluidina e fucsina básica; Aumento original 100x, barra = 1mm. A seta (→) indica a direção do fluxo. **(C-D)** Detalhes da composição do trombo contendo hemácias (h), fibrina e polimorfonucleares. Camada média (m) subjacente ao trombo mostrando lesão da lâmina elástica interna (lei) e hemácias (h). Azul de toluidina e fucsina básica; Aumento original 400x.

4.2.2 - 7 DIAS

ANIMAIS ESTENOSADOS (E7)

Este grupo foi o que apresentou maior variação dos achados. Macroscopicamente, os trombos estavam mais fibrinosos e com proporções reduzidas em relação ao subgrupo anterior (E1). Microscopicamente, os trombos apresentavam hemácias, fibrina e células inflamatórias, na maioria, macrófagos. As fibras elásticas da lâmina elástica interna abaixo do trombo continuavam irregulares e rotas. Alguns casos apresentavam sinais mais nítidos de organização com grande migração de células musculares lisas para o trombo e endotelização iniciada pela base do trombo. Nestes, as fibras elásticas estavam recompostas e foram observadas células fusiformes contendo vesículas justanucleares abaixo da região em estado mais adiantado de organização, consideradas daqui em diante, como células musculares lisas. Na adventícia, iniciou-se a formação de tecido de granulação. Na gordura adventicial, foram visualizados granulomas tipo corpo estranho envolvendo pêlos ou fios de sutura. Estas alterações eram independentes da parede arterial propriamente dita. As alterações morfológicas estão apresentadas na Figura 7.

ANIMAIS ESTENOSADOS TRATADOS COM DOXICICLINA (ED7)

COMO NO GRUPO ANTERIOR (E7), OS NÍVEIS DE ORGANIZAÇÃO DO TROMBO VARIARAM. MICROSCOPICAMENTE, OBSERVARAM-SE TANTO TROMBOS POUCO ORGANIZADOS QUANTO UMA GRANDE QUANTIDADE DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS E INÍCIO DA ENDOTELIZAÇÃO. OS PADRÕES CELULARES FORAM SEMELHANTES AO GRUPO ANTERIOR (E7). AS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ESTÃO APRESENTADAS NA FIGURA 7.

Figura 7. Estudo morfológico com microscopia óptica de alta resolução dos animais estenosados e estenosados tratados com doxiciclina, sacrificados 7 dias após a cirurgia. **(A-B)** Corte longitudinal da aorta respeitando as proporções do pino ilustrando o início da organização do trombo nas regiões proximal e distal dos grupos estenosado (A) e estenosado tratado com doxiciclina (B). Detalhes C e D. Azul de toluidina e fucsina básica; Aumento original 100x, barra = 1mm. A seta (→) indica a direção do fluxo. **(C-D)** Detalhes dos trombos amplamente permeados por células musculares lisas (cabeça de seta) e início da endotelização (e) nos grupos estenosado (C) e estenosado tratado (D). Notar em D áreas não organizadas e resquícios trombóticos (*). Azul de toluidina e fucsina básica; Aumento original 400x.

4.2.3 - 15 DIAS

ANIMAIS ESTENOSADOS (E15)

Macroscopicamente, após secção longitudinal da aorta, foi observado um espessamento intimal, brancacento, em forma triangular com base adjacente ao pino. Este espessamento era mais evidente na região distal, embora fosse também visível na região proximal. Não havia evidências macroscópicas de trombos ou dilatações na aorta. O pino estava revestido por uma delgada película de tecido em continuidade ao espessamento descrito. Microscopicamente, a porção distal estava mais espessa do que na proximal. O espessamento na área próxima ao pino era exclusivamente intimal (neoíntima), recoberto por uma camada endotelial bem definida e caracterizado pela presença abundante de células musculares lisas, poucas células inflamatórias (macrófagos e linfócitos) e raros macrófagos xantomatosos nas porções proximal e distal. As células estavam embebidas em uma matriz extracelular, envoltas por delicadas fibras elásticas jovens (resorcina-fucsina). A camada adventícia apresentava tecido de granulação. Em alguns animais, foram observados próximo ao pino, resquícios trombóticos caracterizados pela presença de fibrina. As alterações morfológicas estão apresentadas na Figura 8.

ANIMAIS ESTENOSADOS TRATADOS COM DOXICICLINA (ED15)

Os achados macroscópicos e microscópicos foram semelhantes ao observados no grupo E15. Resumidamente, microscopicamente este espessamento intimal (neoíntima) estava totalmente endotelizado, composto por quantidade abundante de células musculares lisas, embebidas na matriz extracelular e envoltas por fibrilas elásticas (resorcina-fucsina). As alterações morfológicas estão apresentadas na Figura 8.

Figura 8. Estudo morfológico com microscopia óptica de alta resolução dos animais estenosados e estenosados tratados com doxiciclina, sacrificados 15 dias após a cirurgia. **(A-B)** Corte longitudinal da aorta respeitando as proporções do pino ilustrando o espessamento intimal nas porções proximal e distal dos grupos estenosado (A) e estenosado tratado com doxiciclina (B). Detalhes C e D. Azul de toluidina e fucsina básica; Aumento original 100x, barra = 1mm. A seta (→) indica a direção do fluxo. **(C-D)** Detalhes do espessamento intimal permeado por células musculares lisas (cabeça de seta) e já endotelizado (e) nos grupos estenosado (C) e estenosado tratado com doxiciclina (D). Azul de toluidina e fucsina básica; Aumento original 400x.

4.3 IMUNOISTOQUÍMICA

A avaliação imunoistoquímica foi realizada separadamente nas seguintes regiões: trombo/neoíntima, endotélio e camada média. A adventícia por apresentar reações contra a haste do pino não foi incluída neste estudo. Os resultados estão resumidos na tabela 3.

4.3.1 - 1 DIA

ANIMAIS ESTENOSADOS (E1)

A marcação de fibrinogênio foi intensa no trombo, moderada no endotélio e leve na média. O PDGF-B não mostrou marcação no trombo, mas foi intenso no endotélio e moderado na média. O PCNA foi leve no trombo, endotélio e nas células musculares lisas da camada média. A expressão de MMP-2 foi moderada no trombo, endotélio e camada média. A MMP-9 foi leve em todas as regiões analisadas (trombo, endotélio e camada média). Foi observada a intensa expressão de α -actina somente na camada média (Figura 9).

ANIMAIS ESTENOSADOS TRATADOS COM DOXICICLINA (ED1)

A marcação de fibrinogênio foi intensa no trombo, moderada no endotélio e leve na média. O PDGF-B não mostrou marcação no trombo e camada média, mas foi leve no endotélio. O PCNA foi semelhante ao grupo anterior (E1) leve no trombo, endotélio e nas células musculares lisas da camada média. As marcações de MMP-2 e MMP-9 foram leves no trombo, endotélio e camada média. A intensa expressão de α -actina foi observada somente na camada média (Figura 9).

ANIMAIS SHAM-OPERADOS (S1) E SHAM-OPERADOS TRATADOS COM DOXICICLINA (SD1)

Todos os resultados se referem aos grupos S1 e SD1. A marcação para fibrinogênio foi leve no endotélio e não houve marcação na média. O PDGF-B foi moderado no endotélio e na média não houve expressão no grupo S1, mas no grupo SD1 a marcação foi leve no endotélio. Não houve marcação para PCNA em nenhuma região da aorta nos animais sham-operados (S1), mas foi leve no endotélio dos animais sham-operados tratados com doxíciclina (SD1). A expressão de MMP-2 foi leve no endotélio e camada média de ambos os grupos S1 e SD1. A expressão de MMP-9 foi leve no endotélio e ausente na camada média de ambos os grupos. A marcação para α -actina foi intensa somente na camada média.

Figura 9. Imunistoquímica para fibrinogênio, PDGF-B, MMP-2 e MMP-9 realizada nas aortas dos animais estenosados e estenosados tratados com doxiciclina, sacrificados 1 dia após a cirurgia. A marcação para fibrinogênio foi intensa no trombo de ambos os grupos; Anticorpo anti-fibrinogênio; Aumento original 400x. Marcação intensa de PDGF-B no endotélio e moderada na camada muscular média no grupo estenosado; no grupo estenosado e tratado a marcação foi leve no endotélio e negativa na camada média; Anticorpo anti-PDGF-B; Aumento original 1.000x (estenosado) e 400x (estenosado tratado). Marcação moderada para MMP-2 no trombo, endotélio e camada média no grupo estenosado; no grupo estenosado tratado: leve no trombo, endotélio e camada média; Anticorpo anti-MMP-2; Aumento original 400x. Marcação moderada para MMP-9 no trombo e leve no endotélio e na camada média no grupo estenosado; no grupo estenosado tratado: leve no trombo, endotélio e camada média; Anticorpo anti-MMP-9; Aumento original 400x. (t) trombo, (e) endotélio, (m) camada média.

4.3.2 - 7 DIAS

ANIMAIS ESTENOSADOS (ED7)

A marcação de fibrinogênio foi moderada no trombo e endotélio, enquanto na camada média não apresentou marcação. O PDGF-B não apresentou expressão no trombo e na camada média, entretanto foi moderado no endotélio. O PCNA foi leve no trombo e endotélio, no entanto foi moderado nas células musculares lisas da média. A expressão de MMP-2 foi moderada no trombo e endotélio, mas leve na camada média. A MMP-9 foi moderada tanto no trombo quanto na camada média, mas leve no endotélio. Foi observada expressão leve de α -actina no trombo e intensa na camada média (Figura 10).

ANIMAIS ESTENOSADOS TRATADOS COM DOXICICLINA (ED7)

A expressão de fibrinogênio foi moderada no trombo e leve no endotélio, enquanto a camada média não apresentou marcação. O PDGF-B não apresentou expressão no trombo e na camada média, entretanto foi leve no endotélio. O PCNA foi moderado no trombo e na camada média, mas leve no endotélio. As marcações de MMP-2 e MMP-9 foram leves no trombo, endotélio e camada média. A marcação para α -actina foi de leve a moderada no trombo (dependendo do grau de organização), mostrando a migração das células musculares lisas (Figura 10).

ANIMAIS SHAM-OPERADOS (S7) E SHAM-OPERADOS TRATADOS COM DOXICICLINA (SD7)

A marcação para fibrinogênio foi leve no endotélio e não houve marcação na média. O PDGF-B foi moderado no endotélio e na média não houve expressão no grupo S7, enquanto no grupo SD7 a marcação foi leve no endotélio. Não houve marcação para PCNA em nenhuma região da aorta nos animais sham-operados (S7), entretanto foi

leve no endotélio dos animais sham-operados tratados com doxiciclina (SD7). A expressão de MMP-2 foi leve tanto no endotélio quanto na camada média. A expressão de MMP-9 foi leve no endotélio, mas ausente na camada média dos grupos S7 e SD7. A marcação para α -actina foi intensa na média de ambos os grupos (S7 e SD7).

Figura 10. Imunistoquímica para PCNA, PDGF-B, MMP-2 e MMP-9 realizada nas aortas dos animais estenosados e estenosados tratados com doxíciclina, sacrificados 7 dias após a cirurgia. A marcação para PCNA foi moderada na média de ambos os grupos e no trombo do grupo estenosado tratado; Anticorpo anti-PCNA; Aumento original 400x. Marcação moderada de PDGF-B no endotélio do grupo estenosado e leve no grupo estenosado tratado; Anticorpo anti-PDGF-B; Aumento original 400x. Marcação leve para MMP-2 no endotélio e moderada na camada média no grupo estenosado; no grupo estenosado tratado: leve no endotélio e na camada média; Anticorpo anti-MMP-2; Aumento original 400x. Marcação leve para MMP-9 no endotélio e moderada na camada média no grupo estenosado; no grupo estenosado tratado: leve no trombo, endotélio e camada média; Anticorpo anti-MMP-9; Aumento original 400x. (t) trombo, (e) endotélio, (m) camada média.

4.3.3 - 15 DIAS

ANIMAIS ESTENOSADOS (E15)

O fibrinogênio foi leve na neoíntima, moderado no endotélio e não houve marcação na média. O PDGF-B foi leve na neoíntima e endotélio, enquanto na média não houve expressão. O PCNA foi leve na neoíntima, entretanto na camada média e no endotélio não houve marcação. A expressão de MMP-2 foi moderada na neoíntima, endotélio e camada média. A MMP-9 foi leve no neoíntima, endotélio e camada média. A marcação para α -actina foi moderada na neoíntima, demonstrando grande quantidade de células musculares lisas no subendotélio e intensa na camada média (Figura 11).

ANIMAIS ESTENOSADOS TRATADOS COM DOXICICLINA (ED15)

O fibrinogênio foi leve na neoíntima e no endotélio, mas não houve marcação na camada média. O PDGF-B foi leve na neoíntima e endotélio, entretanto na camada média não houve expressão. O PCNA foi moderado na neoíntima e leve no endotélio e na camada média. A expressão de MMP-2 foi leve na neoíntima, endotélio e camada média. A MMP-9 foi leve no neoíntima e camada média, contudo não apresentou marcação no endotélio. A marcação para α -actina foi moderada na neoíntima e intensa na camada média. (Figura 11).

ANIMAIS SHAM-OPERADOS (S15) E SHAM-OPERADOS TRATADOS COM DOXICICLINA (SD15)

A marcação para fibrinogênio foi leve no endotélio e não houve marcação na camada média. O PDGF-B foi leve no endotélio, mas ausente na camada média de ambos os grupos. Não houve marcação para PCNA em nenhuma região da aorta

nos animais sham (S15), mas foi leve no endotélio dos animais sham-operados tratados com doxiciclina (SD15). A expressão de MMP-2 foi leve tanto no endotélio quanto na camada média de ambos os grupos (S15 e SD15). A expressão de MMP-9 foi leve no endotélio, mas ausente na camada média dos grupos S15 e SD15. A marcação para α -actina foi negativa no endotélio e intensa na camada média de ambos os grupos (S15 e SD15).

Figura 11. Imunistoquímica para MMP-2, MMP-9 e α -actina realizada nas aortas dos animais estenosados e estenosados tratados com doxiciclina, sacrificados 15 dias após a cirurgia. Marcação moderada para MMP-2 na neoíntima, endotélio e camada média no grupo estenosado; no grupo estenosado tratado: leve na neoíntima, endotélio e camada média; Anticorpo anti-MMP-2; Aumento original 400x. Marcação leve para MMP-9 na neoíntima, endotélio e camada média no grupo estenosado; no grupo estenosado tratado: leve na neoíntima, endotélio e camada média; Anticorpo anti-MMP-9; Aumento original 400x. A marcação para α -actina foi moderada na neoíntima e intensa na camada média de ambos os grupos; Anticorpo anti- α -actina; Aumento original 400x. (n) neoíntima, (e) endotélio, (m) camada média.

Tabela 3. Resultado das reações de imunoistoquímica realizadas nos animais estenosados (E), estenosados tratados com doxíciclina (ED), sham-operados (S) e sham-operados tratados com doxíciclina (SD) nos dias 1, 7 e 15, subdivididas em trombo/neoíntima, endotélio e camada média.

		Fibrinogênio				PDGF-B				PCNA				MMP-2				MMP-9				α-actina				
		S	SD	E	ED	S	SD	E	ED	S	SD	E	ED	S	SD	E	ED	S	SD	E	ED	S	SD	E	ED	
1 dia	Trombo	Ø	Ø	+++	+++	Ø	Ø	-	-	Ø	Ø	+	+	Ø	Ø	++	+	Ø	Ø	++	+	Ø	Ø	-	-	
	Endotélio	+	+	++	++	++	-	+++	+	-	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	Média	-	-	+	+	-	-	++	-	-	-	+	+	+	+	++	+	-	-	+	+	+++	+++	+++	+++	
7 dias	Trombo	Ø	Ø	++	++	Ø	Ø	-	-	Ø	Ø	+	++	Ø	Ø	++	+	Ø	Ø	++	+	Ø	Ø	+	+	
	Endotélio	+	+	++	+	++	-	++	+	-	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	Média	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+	-	-	++	+	+++	+++	+++	+++	
15 dias	Neointima	Ø	Ø	+	+	Ø	Ø	+	+	Ø	Ø	+	++	Ø	Ø	++	+	Ø	Ø	+	+	Ø	Ø	++	++	
	Endotélio	+	+	++	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	Média	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++	+	-	-	+	+	+++	+++	+++	+++	

(-) a (+++): avaliação semi-quantitativa da intensidade de marcação imunistoquímica;

Ø: Ausência de trombo ou neoíntima.

4.4 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA

Neste item, são apresentados somente os dados mais relevantes. Todas as medidas estão dispostas em tabelas no apêndice (Tabelas 4, 5, 6, 7, 8 e 9).

4.4.1 - 7 DIAS

A espessura média da íntima das regiões I1 e I4 dos animais estenosados (E7) ($5,8 \pm 1,3 \mu\text{m}$; $6,2 \pm 0,6 \mu\text{m}$, respectivamente) e estenosados tratados com doxiciclina ($5,4 \pm 0,7 \mu\text{m}$; $5,8 \pm 1,1 \mu\text{m}$, respectivamente) foi maior significativamente quando comparado com os grupos controles sham-operado (S7) ($4,7 \pm 1,3 \mu\text{m}$) e sham-operado tratado com doxiciclina ($4,8 \pm 0,5 \mu\text{m}$) (SD7).

A espessura da camada média da região M2 do grupo E7 ($90,0 \pm 3,4 \mu\text{m}$; $P < 0.001$) foi menor significativamente em relação a todos os grupos: sham-operado (S7) ($97,6 \pm 4,7 \mu\text{m}$), sham-operado tratado com doxiciclina (SD7) ($104,1 \pm 3,9$), estenosados (E7) regiões M1, M3 e M4 ($102,1 \pm 10,1 \mu\text{m}$; $96,6 \pm 9,8 \mu\text{m}$; $101,9 \pm 11,1 \mu\text{m}$, respectivamente) e estenosados tratados com doxiciclina (ED7) regiões M1, M2, M3 e M4 ($115,5 \pm 4,7 \mu\text{m}$; $114,4 \pm 6,9 \mu\text{m}$; $99,9 \pm 3,9 \mu\text{m}$; $108,6 \pm 8,1 \mu\text{m}$, respectivamente).

As regiões I2 e I3 não foram mensuradas devido aos diferentes estágios de organização do trombo.

4.4.2 - 15 DIAS

A área da camada íntima das regiões I2 e I3 do grupo E15 ($4.002 \pm 705,5 \mu\text{m}^2$ e $5.624 \pm 212,1 \mu\text{m}^2$, respectivamente) não foram significativas quando comparadas com o grupo ED 15 ($3.795 \pm 177,8 \mu\text{m}^2$ e $6.841 \pm 1.200 \mu\text{m}^2$, respectivamente) (Gráficos 2 e 3). Entretanto, a densidade observada nos animais tratados (ED15) nas regiões I2 e I3 ($64,8 \pm 2,3$ e $54,8 \pm 11,7$, respectivamente) eram maiores do que nos animais não-tratados (E15) ($44,2 \pm 6$ e $48,6 \pm 3,4$, respectivamente), mas somente apresentou diferença significativa na região I2, mas não na região I3.

Apesar da espessura ligeiramente menor da camada média dos animais estenosados tratados com doxiciclina (ED15) nas regiões M1, M3 e M4 ($128,2 \pm 10,8 \mu\text{m}$; $98,7 \pm 9,2 \mu\text{m}$; $83,7 \pm 9,9 \mu\text{m}$, respectivamente) ($P < 0.05$), a densidade celular observada nestas mesmas regiões ($52,9 \pm 2,5$; $48,5 \pm 2,3$; $52,3 \pm 5$, respectivamente) foi maior em relação aos outros grupos (S15, SD15 e E15).

Não houve diferença significativa na extensão das regiões I2 e I3.

Gráfico 2. Área da camada íntima (μm^2) da região I2 das aortas dos animais estenosados (E) e estenosados tratados com doxiciclina (ED) no 15º dia após a cirurgia. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Gráfico 3. Área da camada íntima (μm^2) da região I2 das I3 nas aortas dos animais estenosados (E) e estenosados tratados com doxiciclina (ED) no 15º dia após a cirurgia. Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.5 COLÁGENO E ELASTINA

Neste item, são apresentados somente os dados mais relevantes. Todas as medidas estão dispostas em tabela no apêndice (Tabela 10 e Figura 17).

4.5.1 - 7 DIAS

A fluorescência obtida em pixels na camada média foi menor e apresentou diferença significativa no grupo estenosado (E7) ($247,5 \pm 91,4$; $P < 0.01$) quando comparado ao grupo controle sham-operado tratado com doxiciclina (SD7) ($363,7 \pm 82,93$), mas não em relação aos grupos estenosado tratado com doxiciclina (ED7) ($307,7 \pm 182,5$) e controle sham-operado (S7) ($315,5 \pm 121$).

4.5.2 - 15 DIAS

A fluorescência obtida em pixels na camada média foi menor e apresentou diferença significativa no grupo sham-operado (S15) ($223,3 \pm 94,1$) quando comparado aos grupos sham-operado tratado com doxiciclina (SD15) ($309,9 \pm 39,5$), estenosado (E15) ($318,4 \pm 133,7$) e estenosado tratado com doxiciclina (ED15) ($366,4 \pm 140,1$) (Gráfico 4).

Nas regiões abaixo da neoíntima e na neoíntima, o grupo estenosado (E15) ($143,9 \pm 56,7$; $155 \pm 145,8$, respectivamente) ($P = 0.0001$; 0.0146 , respectivamente) apresentou fluorescência menor e diferença significativa quando comparado ao grupo estenosado tratado com doxiciclina (ED15) ($317,4 \pm 138,8$; $332,7 \pm 223,9$, respectivamente) (Gráfico 5).

Gráfico 4. Intensidade de fluorescência em pixels da camada média abaixo da neoíntima nas aortas dos animais estenosados (E) e estenosados tratados com doxiciclina (ED) no 15º dia após a cirurgia. *P=0.0001.

Gráfico 5. Intensidade de fluorescência em pixels da neoíntima nas aortas dos animais estenosados (E) e estenosados tratados com doxiciclina (ED) no 15º dia após a cirurgia. *P=0.0146.

4.6 ZIMOGRRAFIA

Os valores foram apresentados em unidades arbitrárias e a porcentagem se refere a inibição da MMP em questão em relação ao grupo estenosado.

4.6.1 pró-MMP-2

1 DIA

Um dia após a cirurgia, o resultado da quantificação das bandas foi maior no grupo estenosado (E1) ($1,01 \pm 0,1$; $P < 0.05$) e apresentou diferença significativa em relação ao grupo estenosado tratado com doxiciclina (ED1) ($0,8 \pm 0,2$; 20,8%) e controles sham-operado (S1) ($0,6 \pm 0,01$; 40,6%) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD1) ($0,6 \pm 0,07$; 40,6%) (Figura 12).

7 DIAS

A análise densitométrica 7 dias após a cirurgia, não apresentou diferença significativa entre os grupos: estenosado (E7) ($1,5 \pm 0,5$), estenosado tratado com doxiciclina (ED7) ($1,19 \pm 0,3$; 20,7%) e controles sham-operado (S7) ($1,1 \pm 0,1$; 26,7%) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD7) ($1,18 \pm 0,04$; 21,3%) (Figura 12), apesar do grupo E7 apresentar uma média maior do que o grupo ED7, não houve diferença significativa.

15 DIAS

Após 15 dias da cirurgia, a análise densitométrica dos grupos estenosado (E15) ($1,8 \pm 0,2$; $P < 0.01$) e estenosado tratado com doxiciclina (ED15) ($1,8 \pm 0,2$; $P < 0.01$; 0%) foi maior e significativa em relação aos grupos controles sham-operado

(S15) ($1,04 \pm 0,3$; 42,2%) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD15) ($1,2 \pm 0,2$; 33,3%) (Figura 12).

Quando todos os grupos foram comparados, as médias dos grupos E15 e ED15 ($P < 0.05$) foram maiores e significativas em relação a todos os grupos.

4.6.2 MMP-2

1 DIA

Um dia após a cirurgia, a análise densitométrica foi maior e significativa nos grupos: estenosado (E1) ($0,1 \pm 0,03$) e estenosado tratado com doxiciclina (ED1) ($0,1 \pm 0,07$; 0%) em relação aos grupos controles sham-operado (S1) ($0,05 \pm 0,005$; 50%) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD1) ($0,05 \pm 0,01$; 50%) (Figura 12).

7 DIAS

Sete dias após a cirurgia, o resultado da quantificação das bandas não apresentou diferença significativa nos grupos: estenosado (E7) ($0,6 \pm 0,4$), estenosado tratado com doxiciclina (ED7) ($0,3 \pm 0,04$; 50%) e controles sham-operado (S7) ($0,1 \pm 0,03$; 83,3%) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD7) ($0,2 \pm 0,02$; 66,7%) (Figura 12), apesar do grupo E7 apresentar uma média maior do que o grupo ED7, não houve diferença significativa.

15 DIAS

Após 15 dias da cirurgia, a análise densitométrica dos grupos estenosado (E15) ($0,9 \pm 0,1$) e estenosado tratado com doxiciclina (ED15) ($0,6 \pm 0,2$; 33,3%) foi maior e significativa entre si ($P < 0.01$) e em relação aos grupos controles sham-

operado (S15) ($0,3 \pm 0,1$; $P < 0.01$; 66,7%) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD15) ($0,3 \pm 0,04$; $P < 0.01$; 66,7%) (Figura 12).

Na análise densitométrica da MMP-2 quando todos os grupos foram comparados, as médias dos grupos E7, E15 e ED15 ($P < 0.05$) foram maiores e significativas em relação a todos os grupos.

Figura 12. Gel de zimografia representativo da pró-MMP-2 (72kDa) e MMP-2 (68 e 64kDa) dos animais controles sham-operado (S) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD), estenosados (E) e estenosados tratados com doxiciclina (ED) sacrificados no período de 1, 7 e 15 dias após a cirurgia. Observa-se nos gráficos a pró-MMP2 e a MMP-2 sofrendo um aumento com o decorrer do experimento. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão. * $P < 0.05$ vs outros grupos.

4.6.3 pró-MMP-9

1 DIA

Em relação à análise densitométrica obtida 1 dia após a cirurgia, os grupos estenosado (E1) ($0,49 \pm 0,1$) e estenosado tratado com doxiciclina (ED1) ($0,29 \pm 0,19$; 41%) foram maiores e apresentaram diferença significativa entre si ($P < 0.05$) e quando comparado aos grupos controles sham-operado (S1) ($0,05 \pm 0,02$; $P < 0.001$; 89,8%) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD1) ($0,18 \pm 0,1$; $P < 0.01$; 63,3%) (Figura 13).

7 DIAS

Após 7 dias de cirurgia, o resultado da quantificação das bandas foi maior e significativa no grupo estenosado (E7) ($0,13 \pm 0,09$; $P < 0.05$) em relação aos grupos estenosado tratado com doxiciclina (ED7) ($0,04 \pm 0,02$; 69%) e controles sham-operado (S7) ($0,002 \pm 0,002$; 98,5%) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD7) ($0,004 \pm 0,006$; 96,9%) (Figura 13).

15 DIAS

Após 15 dias da cirurgia, a análise densitométrica do grupo estenosado (E15) ($0,04 \pm 0,04$) foi maior, mas não apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos estenosado tratado com doxiciclina (ED15) ($0,01 \pm 0,008$; 75%) e controles sham-operado (S15) ($0,01 \pm 0,02$; 75%) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD15) ($0,001 \pm 0,002$; 97,5%) (Figura 13).

Quando todos os grupos foram comparados, os grupos SD1 ($P < 0.01$), E1 e ED1 ($P < 0.001$) apresentaram uma média maior e foram significativas em relação a todos os outros grupos e entre si.

4.6.4 MMP-9

1 DIA

Um dia após a cirurgia, o resultado da quantificação das bandas foi significativa nos grupos estenosado (E1) ($0,08 \pm 0,01$) e estenosado tratado com doxiciclina (ED1) ($0,06 \pm 0,02$; 25%) foi maior em relação ao grupo controle sham-operado (S1) (0; $P < 0.001$; 100%), mas somente o grupo E1 foi significativo em relação ao grupo controle sham-operado tratado com doxiciclina (SD1) ($0,03 \pm 0,04$; $P < 0.05$; 62,5%) (Figura 13).

7 DIAS

Sete dias após a cirurgia, a análise densitométrica foi maior e significativa no grupo estenosado (E7) ($0,1 \pm 0,02$; $P < 0.001$) quando comparado aos grupos estenosado tratado com doxiciclina (ED7) ($0,004 \pm 0,005$; 96%) e controles sham-operado (S7) ($0,002 \pm 0,002$; 98%) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD7) ($0,01 \pm 0,02$; 90%) (Figura 13).

15 DIAS

Após 15 dias da cirurgia, a análise densitométrica foi maior e significativa no grupo estenosado (E15) ($0,1 \pm 0,06$; $P < 0.01$) em relação aos grupos estenosado tratado com doxiciclina (ED15) ($0,03 \pm 0,01$; 70%) e controles sham-operado (S15)

($0,0003 \pm 0,0004$; 99,7%) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD15) ($0,02 \pm 0,01$; 80%) (Figura 13).

Na análise densitométrica da MMP-9, os grupos E1, E7 e E15 apresentaram uma média maior e significativa em relação a todos os grupos.

Figura 13. Gel de zimografia representativo da pró-MMP-9 (92kDa) e MMP-9 (88kDa) nos animais controles sham (S) e sham tratado com doxiciclina (SD), estenosados (E) e estenosados tratados com doxiciclina (ED) sacrificados no período de 1, 7 e 15 dias após a cirurgia. Observa-se a pró-MMP-9 sofrendo um aumento de expressão de forma abrupta (1º dia) e queda com o decorrer do experimento; * $P < 0,05$; SD1, E1 e ED1 são também diferentes entre si. Já a MMP-9 se mantém ao longo do experimento. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão. * $P < 0.05$ vs outros grupos.

4.7 ZIMOGRRAFIA *IN SITU*

Os valores foram apresentados em pixels e a porcentagem se refere a diferença em relação ao grupo estenosado.

4.7.1 - 1 DIA

Um dia após a cirurgia, a fluorescência detectada foi maior e significativa nos animais estenosados (E1) ($98,3 \pm 64,6$; $P < 0.01$) em relação aos grupos estenosado tratado com doxiciclina (ED1) ($55,6 \pm 38,9$; 43,4%) e controle sham-operado tratado com doxiciclina (SD1) ($13,4 \pm 8,7$; 86,4%), mas não quando comparado ao grupo controle sham-operado (S1) ($63,1 \pm 16,2$; 35,8%) (Figura 14).

4.7.2 - 7 DIAS

Sete dias após a cirurgia, a fluorescência detectada foi maior e significativa nos animais estenosados (E7) ($101,0 \pm 54,7$; $P < 0.001$) e estenosados tratados com doxiciclina (ED7) ($71,9 \pm 65,1$; $P < 0.01$; 28,8%) em relação aos grupos controles sham-operado (S7) ($18,2 \pm 13,7$; 82%) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD7) ($8,1 \pm 6,5$; 92%) (Figura 14).

4.7.3 - 15 DIAS

Quinze dias após a cirurgia, a fluorescência detectada foi maior e significativa nos animais estenosados (E15) ($117,2 \pm 97,1$; $P < 0.01$) em relação aos grupos estenosado tratado com doxiciclina (ED15) ($62,4 \pm 46,1$; 46,7%) e controles sham-operado (S15) ($34,8 \pm 21,5$; 70,3%) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD15) ($18,2 \pm 23,9$; 84,5%) (Figura 14).

Quando todos os grupos foram comparados, os grupos E1, E7 e E15 apresentaram uma média maior e significativa em relação a todos os outros grupos (S, SD e ED).

Figura 14. Zimografia *in situ* realizada nas aortas dos animais controles sham-operado (S) e sham-operado tratado com doxíciclina (SD), estenosados (E) e estenosados tratados com doxíciclina (ED) sacrificados no período de 1, 7 e 15 dias após a cirurgia. Notar a fluorescência aumentada nas aortas dos animais estenosados em relação aos estenosados tratados em todos os períodos (1, 7 e 15 dias), principalmente na neoíntima (n) dos animais estenosados 15 dias após a cirurgia. No gráfico, podemos verificar os valores expressos em pixels em todos os grupos experimentais. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão. *P<0.05 vs outros grupos.

4.8 WESTERN BLOT

Todos os valores foram expressos em densidade óptica.

4.8.1 eNOS

1 DIA

A densidade óptica obtida 1 dia após a cirurgia, não apresentou diferença significativa entre os grupos: estenosado (E1) (12089 ± 3152), estenosado tratado com doxiciclina (ED1) (10396 ± 1343), sham-operado (S1) (10782 ± 1746) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD1) (11798 ± 4473) (Figura 15), apesar do grupo E1 apresentar uma média maior do que o grupo ED1, não houve diferença significativa.

7 DIAS

A densidade óptica obtida 7 dias após a cirurgia, foi maior e apresentou diferença significativa entre os grupos estenosado (E7) (15511 ± 6508 ; $P=0.0473$) e estenosado tratado com doxiciclina (ED7) (7496 ± 2097), mas não quando comparado com os grupos controles sham-operado (S7) (11733 ± 6690) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD7) (12916 ± 11809) (Figura 15).

15 DIAS

A densidade óptica obtida 15 dias após a cirurgia, não apresentou diferença significativa entre os grupos: estenosado (E15) (14117 ± 6101), estenosado tratado com doxiciclina (ED15) (13605 ± 8226), sham-operado (S15) (13342 ± 4379) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD15) (13682 ± 7915) (Figura 15), apesar do

grupo E15 apresentar uma média maior do que o grupo ED15, não houve diferença significativa.

Quando todos os grupos foram comparados, também não houve diferença significativa entre os grupos E, ED, S e SD de todos os dias.

Figura 15. Gel de acrilamida representativo do Western Blot para eNOS (140 kDa) nas aortas dos animais controles sham (S) e sham tratado com doxiciclina (SD), estenosados (E) e estenosados tratados com doxiciclina (ED) sacrificados no período de 1, 7 e 15 dias após a cirurgia. No gráfico podemos observar uma tendência de diminuição nos animais estenosados e tratados (ED) em relação aos animais estenosados (E) no período de 1 e 7 dias após a cirurgia. *P=0.0473 E7 vs ED7. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão.

4.8.2 iNOS

1 DIA

A densidade óptica obtida 1 dia após a cirurgia, não apresentou diferença significativa entre os grupos: estenosado (E1) (17101 ± 3807), estenosado tratado com doxiciclina (ED1) (11403 ± 6976), sham-operado (S1) (10834 ± 7492) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD1) (11166 ± 4695) (Figura 16), apesar do grupo E1 apresentar uma média maior do que o grupo ED1, não houve diferença significativa.

7 DIAS

A densidade óptica obtida 7 dias após a cirurgia, não apresentou diferença significativa entre os grupos: estenosado (E7) (18742 ± 9803), estenosado tratado com doxiciclina (ED7) (12519 ± 2199), sham-operado (S7) (12310 ± 6709) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD7) (11352 ± 3277) (Figura 16), apesar do grupo E7 apresentar uma média maior do que o grupo ED7, não houve diferença significativa.

15 DIAS

A densidade óptica obtida 15 dias após a cirurgia, não apresentou diferença significativa entre os grupos: estenosado (E15) (16391 ± 9644), estenosado tratado com doxiciclina (ED15) (9808 ± 2525), sham-operado (S15) (12528 ± 2279) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD15) (13370 ± 1458) (Figura 16), apesar do grupo E15 apresentar uma média maior do que o grupo ED15, não houve diferença significativa.

Quando todos os grupos foram comparados, também não houve diferença significativa entre os grupos E, ED, S e SD de todos os dias.

Figura 16. Gel de acrilamida representativo do Western Blot para iNOS (130 kDa) nas aortas dos animais controles sham (S) e sham tratado com doxiciclina (SD), estenosados (E) e estenosados tratados com doxiciclina (ED) sacrificados no período de 1, 7 e 15 dias após a cirurgia. No gráfico podemos observar uma tendência de diminuição nos animais estenosados e tratados (ED) em relação aos animais estenosados (E) no período de 1, 7 e 15 dias após a cirurgia. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, observamos que a hiperplasia intimal se desenvolveu a partir de remanescentes trombóticos que permaneceram ao redor da obstrução na aorta, gerada pela inserção de um pino de acrílico em forma de cogumelo no seu interior. Estudo prévio demonstrou que essas áreas são propensas a distúrbios hemodinâmicos, especialmente recirculação e estase (ZAND et al., 1999), dificultando a resolução do trombo que funciona como suporte para a infiltração de células musculares lisas e matriz extracelular, dando início a formação da neoíntima (BENELI et al., *in press*). Embora vários relatos na literatura tenham referido a efetiva participação das MMPs nesses processos, nós observamos que mesmo com a sua comprovada inibição com a utilização de doxiciclina, não houve diferenças significativas no desenvolvimento da hiperplasia intimal nesse modelo. Somente pequenas diferenças foram observadas na composição, mostrando aumento da quantidade de células musculares lisas e matriz extracelular, possivelmente colágeno e elastina. Esse resultado sugere que, ao menos nesse modelo, outros mediadores devam estar atuando no desenvolvimento da hiperplasia intimal.

A movimentação das células musculares lisas pela matriz extracelular estaria relacionada à degradação de vários componentes, incluindo membrana basal e lâmina elástica, oferecendo um passo limitante no desenvolvimento dessas lesões. Consequentemente, o aumento da expressão de enzimas proteolíticas, especialmente as MMPs, tem sido aventado como tendo papel relevante nessa migração, tanto em modelos experimentais (BENDECK et al., 1994; 2002; ISLAM et al., 2003; JOHNSON; GALIS, 2004; FRANCO et al., 2006; CHANG et al., 2008) quanto em humanos (COLOTTI et al., 2007). As MMPs degradariam a matriz extracelular e facilitariam a migração celular, mecanismo importante no desenvolvimento de re-estenoses após cateterismo para colocação de *stents* ou

dilatação das artérias coronárias por insuflação de balões intra-arteriais (BENDECK et al., 1994; 2002; ISLAM et al., 2003). Dentre as MMPs, as gelatinases A e B (MMP-2 e 9, respectivamente) têm sido as mais estudadas por estarem comprovadamente implicadas na migração de células musculares lisas para a íntima, favorecendo o desenvolvimento de hiperplasia intimal em modelos *in vivo* (JOHNSON; GALIS, 2004; WHATLING; MCPHEAT; HURT-CAMEJO, 2004; CHOW; CENA; SCHULZ, 2007). Recentemente, Johnson e Galis (2004) demonstraram, utilizando um modelo experimental *knockout* de MMP-2 e MMP-9, que estas enzimas estariam implicadas na migração das células musculares lisas e na formação da hiperplasia intimal. Portanto, vários trabalhos têm comprovado a participação das MMPs nesse processo. Por outro lado, vários inibidores das MMPs têm sido testados experimentalmente, mostrando-se capazes de inibir as MMPs e, conseqüentemente, diminuindo tanto a migração celular quanto a síntese de matriz. Dentre estes, encontram-se as tetraciclinas. Em nosso modelo, utilizamos a doxíciclina.

Vários estudos têm mostrado a ação da doxíciclina (derivada da tetraciclina) inibindo a formação de aneurismas (PETRINEC et al., 1996; BOYLE et al., 1998), lesão pós-angioplastia em artéria carótida de ratos (COURTMAN et al., 2004) e em modelos de hiperplasia venosa (LOFTUS et al., 1999). Castro et al. (2008) demonstraram a reversão ou a ausência da progressão do espessamento medial da aorta em modelo de hipertensão renovascular utilizando modelo de dois rins e um *clip* (2K1C), onde a MMP-2 foi inibida pela doxíciclina. Entretanto, mesmo mostrando que a atividade das MMPs 2 e 9 dos animais tratados com doxíciclina estava diminuída durante grande parte do nosso experimento, a hiperplasia intimal não apresentou alterações em sua área e/ou extensão. Estes dados foram confirmados por zimografia convencional, *in situ* e por imunoistoquímica. Analisando o

desenvolvimento da hiperplasia intimal nesse modelo, sabemos que a estenose abrupta da aorta após a inserção do pino acrílico gera turbilhonamento e desnudação endotelial que culminam com a formação de um grande trombo (BENELI et al., *in press*). Após fibrinólise inicial, remanescentes destes trombos ficam estagnados ao redor do pino, facilitando a migração de células musculares lisas provenientes da camada média. Vimos que as MMPs 2 e 9 têm expressão aumentada e embora tenhamos comprovado a presença de outros mediadores, entre eles, fibrinogênio, PDGF e liberação de radicais livres, acreditamos que as MMPs fossem os principais mediadores dessa migração. Com base nestas informações, sugerimos que mediadores provenientes do trombo possam ser cruciais no desenvolvimento da hiperplasia intimal nesse modelo.

Fibrinogênio, um dos principais fatores encontrados no trombo em grande quantidade no início do nosso experimento e sendo detectado imunoistoquimicamente em ambos os grupos estenosado e estenosado tratado com doxiciclina durante o decorrer do experimento, poderia ter um papel fundamental na resposta proliferativa intimal. Sabe-se que o fibrinogênio tem capacidade de induzir sozinho, *in vitro*, a migração de células musculares lisas, mesmo sem o envolvimento de outras substâncias quimiocinéticas ou quimiotáticas (NAITO et al., 1996). Além do mais, sua presença em trombos murais que, em seguida, são incorporados à parede vascular tem sido relacionada aos fenômenos de reestenose observados em alguns casos pós-angioplastia (BOSMANS et al., 1997). Em adição, o rompimento da elastina da matriz extracelular da parede vascular e a trombina produzida durante o processo de trombose também tem sido implicados na indução desta proliferação (IP et al., 1990; LI et al., 1998).

Além do fibrinogênio, fatores de crescimento como o bFGF (fator de crescimento básico de fibroblastos) e o PDGF têm sido implicados na ativação das células musculares lisas da camada média da parede arterial, convertendo-as de um fenótipo contrátil para um sintético (ROSS; RAINES; BOWEN-POPE, 1986; ROSS; BOWEN-POPE; RAINES, 1990; ROSS, 1993). Concomitante a esta alteração, haveria ativação das enzimas atuantes na matriz extracelular, tipo metaloproteinases, que degradariam o colágeno e a elastina, permitindo a passagem destas células pela lâmina elástica interna para a íntima e levando ao espessamento intimal (KIBBE et al., 1999). Estas células têm sido implicadas na migração celular e na formação da neoíntima, tanto em casos de hiperplasia causada por diferentes etiologias quanto em lesões ateroscleróticas propriamente ditas, contribuindo no desenvolvimento da matriz extracelular da neoíntima (IP et al., 1990). A presença de PDGF e IL-1 α (parte de uma resposta inflamatória aguda) aumentaria a atividade da MMP-9 e ligeiramente a expressão do TIMP, favorecendo a degradação da membrana basal e promovendo a migração e proliferação das células musculares lisas (FABUNMI et al. 1996). No trabalho anterior, valorizamos o aumento da expressão do PDGF-B, implicando esse mediador no desenvolvimento da neoíntima desse modelo experimental. Entretanto, no estudo atual, observamos diminuição da expressão de PDGF-B nos animais tratados com doxiciclina em relação aos não-tratados. Essa diminuição, mesmo significativa, não foi relevante no desenvolvimento da hiperplasia intimal. Provavelmente, a doxiciclina agiria prevenindo a liberação ou ativação de fatores de crescimento, entre eles o PDGF e TGF- β (fator de crescimento transformador- β), na matriz extracelular, (MONTESANO; ORCI, 1988; GULLBERG et al., 1990; FRANCO et al., 2006). O bFGF e o TGF- β não foram avaliados nesse estudo.

A trombina foi descrita como outro agente potencialmente mitogênico de células musculares lisas (BAR-SHAVIT et al., 1990) e seus inibidores, como heparina e hirudina, poderiam reduzir a hiperplasia intimal, quando administrados após angioplastia em coelhos hipercolesterolêmicos (SAREMBOCK et al., 1991; WALTERS; GOROG; WOOD, 1994) e em modelo de lesão arterial em babuínos (OKAZAKI et al., 1992). Além disso, a trombina tem a capacidade de induzir sozinha a MMP-9, contribuindo em seu potencial mitogênico e a sua super expressão em vasos ateroscleróticos e pós-angioplastia (FABUNMI et al. 1996). Apesar de sua relevância, a trombina não foi avaliada nesse estudo. Próximos estudos serão necessários para elucidar essa hipótese.

Fora os mediadores intra-trombóticos, outros meios de degradação da matriz extracelular podem estar implicados na formação de neoíntimas, além da digestão pelas matrixinas (SAKAMOTO; SAKAMOTO, 1988; WOESSNER, 1991). Os neutrófilos contêm várias enzimas como a elastase e a catepsina G (serina proteases) que podem degradar grande parte da matriz extracelular (WOESSNER, 1991; GARCIA-TOUCHARD et al., 2005). Dentro das cisteína proteases, as catepsinas K, S e L (por exemplo) possuem uma potente atividade elastolítica e colagenolítica (MACIEWICZ; ETHERINGTON, 1988). As catepsinas G, K, S e V têm sido identificadas em placas ateroscleróticas e as G e V foram descritas devido a sua potente atividade elastolítica dentre as proteases (BOUDIER et al., 1991; MCDONNELL et al., 1993; YASUDA et al., 2004; GARCIA-TOUCHARD et al., 2005). Recentemente, a catepsina G foi associada à formação de ateromas em artérias carótidas humanas (LEGEDZ et al., 2004). Em nosso modelo experimental, ocorreu a formação da neoíntima, apesar da inibição das MMPs 2 e 9. Nossa hipótese seria que fatores liberados pela lesão tecidual (TNF- α , IL-1, VEGF e bFGF) induziriam a

transcrição e ativação de serina proteases e cisteína proteases, levando a uma via alternativa da degradação da matriz extracelular (BENDECK et al., 2002; GARCIA-TOUCHARD et al., 2005).

Dentro das enzimas proteolíticas, outra via seria a do ativador do plasminogênio (PA), o ativador do plasminogênio tipo tecidual (t-PA) e o ativador do plasminogênio tipo uroquinase (u-PA) que clivam o plasminogênio para liberar a plasmina. Esses componentes, incluindo t-PA, u-PA e o inibidor endógeno do ativador do plasminogênio (PAI-1), têm sua expressão aumentada em vasos sanguíneos lesados (LIJNEN, 2001). Estudos recentes com deleção do gene alvo para u-PA mostraram que este pode ser um importante mediador da hiperplasia intimal (CARMELIET et al., 1997), particularmente por facilitar a migração das células musculares lisas. A plasmina poderia degradar diretamente alguns componentes da matriz extracelular e também ativar várias MMPs incluindo MMP-3, 9, 12 e 13 (GALIS; KHATRI, 2002). De fato, essa seria uma boa evidência de que os efeitos da u-PA/plasmina no remodelamento tecidual poderiam ser mediados indiretamente via ativação das MMPs (LIJNEN, 2001; BENDECK, 2002).

Células musculares lisas compuseram a principal célula da neoíntima observada neste modelo experimental. São estas as células que mais proliferam na camada média da parede arterial e, em seguida, migram através da lâmina elástica interna rompida para compor a principal célula da neoíntima neste modelo. A proliferação das células musculares lisas da neoíntima foi avaliada nesse estudo. A expressão moderada de PCNA no trombo com 7 dias e na neoíntima com 15 dias dos animais tratados com doxíciclina, corrobora com o aumento da densidade de células musculares lisas na íntima destes animais demonstrada pela morfometria. Bendeck et al. (2002) também observaram aumento na densidade de células musculares lisas

na neoíntima de artérias carótidas em modelo de lesão por balão em ratos tratados com doxíciclina, embora sem diferença estatística. A densidade celular da camada média dos animais estenosados tratados com doxíciclina 15 dias após a cirurgia foi maior quando comparado aos animais estenosados não-tratados. Esses resultados coincidem com a expressão de PCNA nas aortas destes mesmos animais, que com 7 dias estava moderada (período de proliferação e subsequente migração) e com 15 dias marcação leve (pós-migração). Alguns estudos sugerem que o tratamento com doxíciclina não afetaria a replicação das células musculares lisas da camada média (BENDECK et al., 2002), entretanto em nosso estudo ocorreu um aumento também da proliferação na camada média. Um possível mediador mitótico seria o fibrinogênio. GFATTER et al. (2000) observaram *in vitro* que bloqueando as integrinas plaquetárias GP IIb-IIIa, inibiriam a liberação de fatores de crescimento estimulados pela trombina e consequentemente, a estimulação da mitose pelo fibrinogênio.

Estudos prévios em coelhos, utilizando modelo de angioplastia, mostraram que inibindo a deposição tecidual de fibrina, ocorre atenuação na síntese de MMPs e acúmulo de colágeno, levando à diminuição do remodelamento positivo. Portanto, a doxíciclina não afetaria a deposição precoce de fibrina, mas atenuaria a deposição de colágeno (COURTMAN et al., 2004). Entretanto, em nosso estudo, observamos uma maior deposição de colágeno e elastina nos animais do grupo estenosado tratado com doxíciclina (15 dias), mostrando que a doxíciclina agiria poupando a degradação de colágeno da parede da aorta. Bendeck et al. (2002) observaram uma maior deposição de colágeno nos animais tratados com doxíciclina, corroborando com nossos resultados. Estes autores sugerem ainda que a doxíciclina poderia ter

um papel importante se usada como tratamento para prevenir a ruptura de placas ateroscleróticas devido ao aumento na deposição de colágeno.

Sabe-se que a lesão da parede arterial deve gerar uma série de estímulos quimiotáticos para leucócitos, além de um conjunto de citocinas e fatores de crescimento, que são secretados produzindo múltiplos efeitos. Estas citocinas, entre elas, IFN- γ , IL-1- β e TNF- α , induzem a formação da iNOS (óxido nítrico sintase induzível). A indução da iNOS após uma lesão arterial, ao invés de impedir, deve na verdade promover a proliferação e o crescimento celular (CHYU et al., 1999). Yamasaki et al. (1998) relataram que os processos reparativos estão diminuídos nos camundongos iNOS-*knockout* e vários trabalhos têm relatado que a expressão da iNOS estaria frequentemente associada a estados patológicos, como aterosclerose e vasculopatias do transplante (LAFOUND-WALKER et al., 1997; LUOMA et al., 1998; RUSSELL et al., 1995). Juntos estes dados corroboram com a hipótese de que a indução do iNOS após uma lesão arterial poderia favorecer o desenvolvimento de uma neoíntima, considerada como uma resposta reparativa à lesão tissular. Entretanto, o papel exato nessa modulação ainda não está completamente esclarecido.

O NO (óxido nítrico) gerado pela expressão da iNOS poderia reagir com o superóxido levando à formação do peroxinitrito (CHYU et al., 1999). Este potente oxidante poderia alterar o estado redox das células, resultando numa persistente ativação das células inflamatórias, levando, portanto, a uma maior liberação de NO pela iNOS (CHYU et al., 1999). Fora a geração de mais citocinas inflamatórias, estas substâncias oxidantes poderiam estar implicadas no aumento da expressão de proto-oncogenes, tipo o *c-fos* e o *c-myc*, o primeiro comprovadamente envolvido em áreas com intensa atividade proliferativa (LAVEZZI et al., 2003). Outro papel

conhecido do NO seria o de potencializar a degradação da matriz extracelular pela *up-regulation* da atividade das metaloproteinases (AMIN et al., 1996). Estudos *in vitro* (AMIN et al., 1996) e *in vivo* (THOMPSON; LIAO; CURCI, 1998) demonstraram que a doxíciclina, além de inibir as MMPs, agiria também inibindo a iNOS. O provável mecanismo seria a inibição da expressão do mRNA da NOS e não diretamente nos níveis enzimáticos, a qual diminuiria expressão da proteína e da atividade da NOS (AMIN et al., 1996). Em nosso estudo, tanto a eNOS quanto a iNOS estavam diminuídas nos animais tratados em relação aos não-tratados, apesar de não apresentar diferença estatística significativa (exceto o grupo dos animais tratados com doxíciclina comparado com os animais não-tratados 7 dias após a cirurgia), insinuando o efeito inibitório da doxíciclina nas NOS.

Por fim, esse modelo experimental de estenose intrínseca da aorta gera alterações abruptas no fluxo sanguíneo com formação de trombose em torno da obstrução. Esse trombo é permeado progressivamente por células musculares lisas provenientes da camada média subjacente. Há produção de matriz extracelular e reendotelização gerando uma hiperplasia intimal. O tratamento com a doxíciclina apesar de inibir as MMPs 2 e 9, não alterou o desenvolvimento dessa hiperplasia intimal neste modelo experimental de estenose intrínseca da aorta. Provavelmente, outras vias de degradação da matriz extracelular estejam agindo para facilitar a migração das células musculares lisas da camada média para a íntima. Além disso, mediadores presentes no trombo ou derivados da lesão endotelial podem agir concomitantemente na formação da hiperplasia intimal.

6. CONCLUSÃO

As conclusões do presente estudo são:

- A hiperplasia intimal decorrente desse modelo experimental de estenose intrínseca da aorta apresentou mínimas diferenças em sua composição e desenvolvimento no decorrer do experimento (1, 7 e 15 dias);
- Apesar de estarem inibidas pela doxíciclina, as metaloproteinases 2 e 9, comprovada pela zimografia convencional, *in situ* e imunoistoquímica, não alteraram a migração das células musculares lisas da camada média para a íntima;
- Houve um aumento na deposição de colágeno e elastina nas aortas dos animais estenosados e tratados com doxíciclina devido a inibição das MMPs;
- Nas aortas dos animais estenosados e tratados com doxíciclina ocorreu a diminuição na expressão de eNOS e iNOS, induzida pelo tratamento e esses achado corroboram com os dados encontrados na literatura;
- Por fim, outros fatores independentes das MMPs podem estar envolvidos na formação da hiperplasia intimal neste modelo experimental de estenose intrínseca da aorta.

REFERÊNCIAS

- Abreu MA, Baroza LGV, Rossi MA. Toluidine blue-basic fuchsin stain for glycolmetacrylate embedded tissue. *J Histotechnol* 1993;16:139-40.
- Altieri P, Brunelli C, Garibaldi S, Nicolino A, Ubaldi S, Spallarossa P, Olivotti L, Rossettin P, Barsotti A, Ghigliotti G. Metalloproteinases 2 and 9 are increased in plasma of patients with heart failure. *Eur J Clin Invest* 2003;33 (8):648-56.
- Amin AR, Attur MG, Thakker GD, Patel PD, Vyas PR, Patel RN, Patel IR, Abramson SB. A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26;93(24):14014-9.
- Andreasson AC, Abt M, Jönsson-Rylander AC. Confocal scanning laser microscopy measurements of atherosclerotic lesions in mice aorta. A fast evaluation method for volume determinations. *Atherosclerosis*. 2005 Mar;179(1):35-42.
- Asanuma K, Magid R, Johnson C, Nerem RM, Galis ZS. Uniaxial strain upregulates matrix-degrading enzymes produced by human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:1778-1784.
- Axisa B, Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, Jones L, Bell PR, Thompson MM. Prospective, randomized, double-blind trial investigating the effect of doxycycline on matrix metalloproteinase expression within atherosclerotic carotid plaques. *Stroke*. 2002 Dec;33(12):2858-64.
- Bar-Shavit R, Benezra M, Eldor A, Hy-Am E, Fenton JW 2nd, Wilner GD, Vlodavsky I. Thrombin immobilized to extracellular matrix is a potent mitogen for vascular smooth muscle cells: nonenzymatic mode of action. *Cell Regul*. 1990 May;1(6):453-63.
- Baxter BT, Pearce WH, Waltke EA, Littooy FN, Hallett JW Jr, Kent KC, Upchurch GR Jr, Chaikof EL, Mills JL, Fleckten B, Longo GM, Lee JK, Thompson RW: Prolonged administration of doxycycline in patients with small asymptomatic abdominal aortic aneurysms: report of a prospective (phase II) multicenter study. *J Vasc Surg* 2002, 36:1–12.
- Bendeck MP, Conte M, Zhang M, Nili N, Strauss BH, Farwell SM. Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration, and matrix remodeling after arterial injury. *Am J Pathol*. 2002 Mar;160(3):1089-95.

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

Bendeck MP. Targeting pericellular proteolysis in vascular disease. *Circ Res*. 2002 Nov 15;91(10):861-2.

Beneli CT, Barbosa PF, Floriano EM, Abreu MA, Ramalho FS, Elias Jr E, Rossi MA, Ramos SG. Can eccentric arterial plaques alone cause flow stagnation points and favour thrombus incorporation? *Int J Exp Pathol*. *In press*.

Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003;107 (12):1579-85.

Bosmans JM, Kockx MM, Vrints CJ, Bult H, De Meyer GR, Herman AG. Fibrin(ogen) and von Willebrand factor deposition are associated with intimal thickening after balloon angioplasty of the rabbit carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(4):634-45.

Boudier C, Godeau G, Hornebeck W, Robert L, Bieth JG. The elastolytic activity of cathepsin G: an ex vivo study with dermal elastin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991;4:497–503.

Boyle JR, McDermott E, Crowther M, Wills AD, Bell PR, Thompson MM. Doxycycline inhibits elastin degradation and reduces metalloproteinase activity in a model of aneurysmal disease. *J Vasc Surg*. 1998 Feb;27(2):354-61.

Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Mar 7;1477(1-2):267-83.

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

Brown DL, Desai KK, Vakili BA, Nouneh C, Lee HM, Golub LM. Clinical and biochemical results of the metalloproteinase inhibition with subantimicrobial doses of

doxycycline to prevent acute coronary syndromes (MIDAS) pilot trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Apr;24(4):733-8.

Cannon MS, Stuth NR. Combination hematoxylin-eosin-rose bengal and resorcin-fuchsin connective tissue stain for glycolmetacrylate embedded sections. *J Histotechnol* 1993;16:141-2.

Carmeliet P, Moons L, Herbert JM, Crawley J, Lupu F, Lijnen R, Collen D. Urokinase but not tissue plasminogen activator mediates arterial neointima formation in mice. *Circ Res.* 1997 Nov;81(5):829-39.

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

Castro MM, Rizzi E, Figueiredo-Lopes L, Fernandes K, Bendhack LM, Pitol DL, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis.* 2008 Jun;198(2):320-31.

Chang W, Lim S, Song H, Song BW, Kim HJ, Cha MJ, Sung JM, Kim TW, Hwang KC. Cordycepin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation. *Eur J Pharmacol.* 2008 Nov 12;597(1-3):64-9.

Chesler NC, Ku DN, Galis ZS. Transmural pressure induces matrix-degrading activity in porcine arteries ex vivo. *Am J Physiol* 1999;277:H2002-2009.

Chow AK, Cena J, Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol.* 2007 Sep;152(2):189-205.

Chyu KY, Dimayuga P, Zhu J, et al. Decreased neointimal thickening after arterial wall injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Circ Res* 1999; 85(12):1192-8.

Colotti C, Angeli V, Del Ry S, Maltinti M, Vittorini S, Giannessi D. Matrix metalloprotease-2 and -9 concentration and activity in serum and culture medium samples: a methodological reappraisal. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45(10):1292-8.

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

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

Curci JA, Petrinc D, Liao S, Golub LM, Thompson RW: Pharmacologic suppression of experimental abdominal aortic aneurysms: a comparison of doxycycline and four chemically modified tetracyclines. *J Vasc Surg* 1998;28:1082–1093

Davis C, Fischer J, Ley K, Sarembock IJ. The role of inflammation in vascular injury and repair. *J Thromb Haemost* 2003;1:1699-709.

De Carvalho HF, Taboga SR. Fluorescence and confocal laser scanning microscopy imaging of elastic fibers in hematoxylin-eosin stained sections, *Histochem Cell Biol*. 1996 Dec;106(6):587-92.

Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2006 Mar;25(1):9-34.

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

Fabunmi RP, Baker AH, Murray EJ, Booth RF, Newby AC. Divergent regulation by growth factors and cytokines of 95 kDa and 72 kDa gelatinases and tissue inhibitors or metalloproteinases-1, -2, and -3 in rabbit aortic smooth muscle cells. *Biochem J*. 1996 Apr 1;315 (Pt 1):335-42.

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

Franco C, Ho B, Mulholland D, Hou G, Islam M, Donaldson K, Bendeck MP. Doxycycline alters vascular smooth muscle cell adhesion, migration, and reorganization of fibrillar collagen matrices. *Am J Pathol*. 2006 May;168(5):1697-709.

Franklin IJ, Harley SL, Greenhalgh RM, Powell JT. Uptake of tetracycline by aortic aneurysm wall and its effect on inflammation and proteolysis. *Br J Surg*. 1999 Jun;86(6):771-5.

Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*. 2002 Feb 22;90(3):251-62.

Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, Amento E, Libby P. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res* 1994;75:181-189.

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

Garcia-Touchard A, Henry TD, Sangiorgi G, Spagnoli LG, Mauriello A, Conover C, Schwartz RS. Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Jun;25(6):1119-27.

Gerlach RF, Demacq C, Jung K, Tanus-Santos JE. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clin Biochem* 2007;40:119–123.

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;344:147–149.

Gfatter R, Spaengler B, Boeck A, Braun F, Cross H, Spaengler HP. The mitosis of fibroblasts in cell culture is enhanced by binding GP IIb-IIIa of activated platelets on fibrinogen. *Platelets*. 2000 Jun;11(4):204-14.

Golub LM, Lee HM, Lehrer G, Nemiroff A, McNamara TF, Kaplan R, Ramamurthy NS. Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action. *J Periodontal Res*. 1983 Sep;18(5):516-26.

Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res*. 1998 Nov;12(2):12-26.

Greenwald RA, Golub LM, Ramamurthy NS, Chowdhury M, Moak SA, Sorsa T. In vitro sensitivity of the three mammalian collagenases to tetracycline inhibition: relationship to bone and cartilage degradation. *Bone*. 1998 Jan;22(1):33-8.

Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1962 Jun 15;48:1014-22.

Gullberg, D; Tingstrom, A; Thuresson, A-C; Olsson, L; Terracio, L; Borg, TK; Rubin, K. β 1 integrin mediated collagen gel contraction is stimulated by PDGF. *Exp Cell Res*. 1990;186:264–272.

Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH. Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:1667-87.

Islam MM, Franco CD, Courtman DW, Bendeck MP. A nonantibiotic chemically modified tetracycline (CMT-3) inhibits intimal thickening. *Am J Pathol*. 2003 Oct;163(4):1557-66.

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

Johnson C, Galis ZS. Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24 (1):54-60.

Joris I, Zand T, Majno G. Hydrodynamic injury of the endothelium in acute aortic stenosis. *Am J Pathol* 1982;106:394-408

Kibbe M, Billiar T, Tzeng E. Inducible nitric oxide synthase and vascular injury. *Cardiovasc Res* 1999;43(3):650-7.

Kuzuya M, Kanda S, Sasaki T, Tamaya-Mori N, Cheng XW, Itoh T, Itohara S, Iguchi A. Deficiency of gelatinase a suppresses smooth muscle cell invasion and development of experimental intimal hyperplasia. *Circulation*. 2003 Sep 16;108(11):1375-81.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

Lafond-Walker A, Chen CL, Augustine S, Wu TC, Hruban RH, Lowenstein CJ. Inducible nitric oxide synthase expression in coronary arteries of transplanted human hearts with accelerated graft arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1997;151(4):919-25.

Lavezzi AM, Milei J, Grana DR, Flenda F, Basellini A, Matturri L. Expression of c-fos, p53 and PCNA in the unstable atherosclerotic carotid plaque. *Int J Cardiol* 2003; 92(1):59-63.

Legedz L, Randon J, Sessa C, Baguet JP, Feugier P, Cerutti C, McGregor J, Bricca G. Cathepsin G is associated with atheroma formation in human carotid artery. *J Hypertens* 2004;22:157–166.

Li DY, Brooke B, Davis EC, Mecham RP, Sorensen LK, Boak BB, et al. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature* 1998;393(6682):276-80.

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

Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost*. 2001 Jul;86(1):324-33.

Lindsey ML, Evans AJ, Keller CR, Jackson P, Funk E, Michael LH, Entman ML. MMP 9 expression and activation in myocardial reperfusion. *Circulation* 1998; I-4407, Abstract.

Loftus IM, Porter K, Peterson M, Boyle J, London NJ, Bell PR, Thompson MM. MMP inhibition reduces intimal hyperplasia in a human vein graft stenosis model. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Jun 30;878:547-50.

Loftus IM, Thompson MM. The role of matrix metalloproteinases in vascular disease. *Vasc Med*. 2002 May;7(2):117-33.

Luoma JS, Stralin P, Marklund SL, Hiltunen TP, Sarkioja T, Yla-Herttuala S. Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions: colocalization with epitopes characteristic of oxidized LDL and peroxynitrite-modified proteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(2):157-67.

Lynch JR, Blessing R, White WD, Grocott HP, Newman MF, Laskowitz DT. Novel diagnostic test for acute stroke. *Stroke* 2004;35 (1):57-63.

Maciewicz RA, Etherington DJ. A comparison of four cathepsins (B, L, N and S) with collagenolytic activity from rabbit spleen. *Biochem J*. 1988;256:433– 440.

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

Manning MW, Cassis LA, Daugherty A. Differential effects of doxycycline, a broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor, on angiotensin II-induced atherosclerosis and abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Mar 1;23(3):483-8.

Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem*. 1993 Dec;53(4):288-95.

McDonnell J, Lobner JM, Knight WB, Lark MW, Green B, Poe M, Moore VL. Comparison of the proteoglycanolytic activities of human leukocyte elastase and human cathepsin G in vitro and in vivo. *Connect Tissue Res* 1993;30:1–9.

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

Mohammed FF, Smookler DS, Khokha R. Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003 Nov;62 Suppl 2:ii43-7.

Montesano, R; Orci, L. Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:4894–4897.

Naito M, Nomura H, Iguchi A. Migration of cultured vascular smooth muscle cells into non-crosslinked fibrin gels. *Thromb Res* 1996 15;84(2):129-36.

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

Newby AC, Zaltsman AB. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol* 2000;190:300-9.

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

Okazaki H, Majesky MW, Harker LA, Schwartz SM. Regulation of platelet-derived growth factor ligand and receptor gene expression by alpha-thrombin in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1992 Dec;71(6):1285-93.

Peterson JT. Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery. *Heart Fail Rev*. 2004 Jan;9(1):63-79.

Petrik PV, Gelabert HA, Moore WS, Quinones-Baldrich W. The effect of vitamin E and doxycycline on the development of intimal hyperplasia. *J Surg Res*. 1996 Feb 1;60(2):279-83.

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

Prall AK, Longo GM, Mayhan WG, Waltke EA, Fleckten B, Thompson RW, Baxter BT. Doxycycline in patients with abdominal aortic aneurysms and in mice: comparison of serum levels and effect on aneurysm growth in mice. *J Vasc Surg*. 2002 May;35(5):923-9.

Pyo R, Jensen KK, Wiekowski MT, Manfra D, Alcamí A, Taubman MB, Lira SA. Inhibition of intimal hyperplasia in transgenic mice conditionally expressing the chemokine-binding protein M3. *Am J Pathol*. 2004 Jun;164(6):2289-97.

Ranuncolo SM, Armanasco E, Cresta C, Bal De Kier Joffe E, Puricelli L. Plasma MMP-9 (92 kDa-MMP) activity is useful in the follow-up and in the assessment of prognosis in breast cancer patients. *Int J Cancer* 2003;106(5):745-51.

Ross R, Bowen-Pope DF, Raines EW. Platelet-derived growth factor and its role in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1990 Mar 12;327(1239):155-69.

Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*. 1986 Jul 18;46(2):155-69.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993 Apr 29;362(6423):801-9.

Roy R, Zhang B, Moses MA. Making the cut: proteasemediated regulation of angiogenesis. *Exp Cell Res* 2006;312: 608–622.

Russell ME, Wallace AF, Wyner LR, Newell JB, Karnovsky MJ. Upregulation and modulation of inducible nitric oxide synthase in rat cardiac allografts with chronic rejection and transplant arteriosclerosis. *Circulation* 1995;92(3):457-64.

Sakamoto S, Sakamoto M. Degradative processes of connective tissue proteins with special emphasis on collagenolysis and bone resorption. *Mol Aspects Med*. 1988;10(4):299-428.

Sarembock IJ, Gertz SD, Gimple LW, Owen RM, Powers ER, Roberts WC. Effectiveness of recombinant desulphatohirudin in reducing restenosis after balloon angioplasty of atherosclerotic femoral arteries in rabbits. *Circulation*. 1991 Jul;84(1):232-43.

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

Sigma-Aldrich [homepage]. Molécula de doxiciclina. [citado 31 mar 2009]. Disponível em http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=D9891|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC

Thompson RW, Liao S, Curci JA. Therapeutic potential of tetracycline derivatives to suppress the growth of abdominal aortic aneurysms. *Adv Dent Res*. 1998 Nov;12(2):159-65.

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

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

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

Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev*. 2000 Sep 1;14(17):2123-33.

Walters TK, Gorog DA, Wood RF. Thrombin generation following arterial injury is a critical initiating event in the pathogenesis of the proliferative stages of the atherosclerotic process. *J Vasc Res*. 1994 May-Jun;31(3):173-7.

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

Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*. 1991 May;5(8):2145-54.

Yamasaki K, Edington HD, McClosky C, et al. Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest* 1998;101(5):967-71.

Yasuda Y, Li Z, Greenbaum D, Bogoy M, Weber E, Brömme D. Cathepsin V, a novel and potent elastolytic activity expressed in activated macrophages. *J Biol Chem*. 2004 Aug 27;279(35):36761-70.

Zand T, Hoffman AH, Savionis BJ, Underwood JM, Nunnari JJ, Majno G, et al. Lipid deposition in rat aortas with intraluminal hemispherical plug stenosis: A morphological and biophysical study. *Am J Pathol* 1999;155(1):85-92.

Zand T, Majno G, Nunnari JJ, Hoffman AH, Savionis BJ, MacWilliams B, et al. Endothelial adaptations in aortic stenosis. *Am J Pathol* 1988 Nov;133(2):407-18.

Zand T, Majno G, Nunnari JJ, Hoffman AH, Savionis BJ, MacWilliams B, et al. Lipid deposition and intimal stress and strain. A study in rats with aortic stenosis. *Am J Pathol* 1991 Jul;139(1):101-13.

APÊNDICE

Tabela 4. Resultado da espessura (μm) da camada íntima realizada nos animais estenosados (E), estenosados tratados com doxiciclina (ED), sham-operados (S) e sham-operados tratados com doxiciclina (SD) nos dias 7 e 15 nas regiões I1, I2, I3 e I4.

Dias de experimento	Espessura da camada íntima (μm)									
			I1		I2		I3		I4	
	S	SD	E	ED	E	ED	E	ED	E	ED
7	$4,7 \pm 1,3$	$4,8 \pm 0,5$	$5,8 \pm 1,3$	$5,4 \pm 0,7$					$6,2 \pm 0,6$	$5,8 \pm 1,1$
15	$5,6 \pm 1,5$	$4,7 \pm 0,7$	$6,0 \pm 1,2$	$6,9 \pm 2,1$	351 ± 144	260 ± 182	$322 \pm 77,2$	$274 \pm 51,5$	$6,2 \pm 1$	$4,7 \pm 0,7$

Tabela 5. Resultado da espessura (μm) da camada média realizada nos animais estenosados (E), estenosados tratados com doxiciclina (ED), sham-operados (S) e sham-operados tratados com doxiciclina (SD) nos dias 7 e 15 nas regiões M1, M2, M3 e M4.

Dias de experimento	Espessura da camada média (μm)									
			M1		M2		M3		M4	
	S	SD	E	ED	E	ED	E	ED	E	ED
7	$97,6 \pm 4,7$	$104,1 \pm 3,9$	$102,1 \pm 10,1$	$115,5 \pm 4,7$	$90,0 \pm 3,4$	$114,4 \pm 6,9$	$96,6 \pm 9,8$	$99,9 \pm 3,9$	$101,9 \pm 11,1$	$108,6 \pm 8,1$
15	$101,2 \pm 3,5$	$93,5 \pm 3,7$	$119,1 \pm 5,5$	$128,2 \pm 10,8$	$116,4 \pm 3,4$	$102,7 \pm 10,5$	$103 \pm 9,2$	$98,7 \pm 9,2$	$108,2 \pm 4,9$	$83,7 \pm 9,9$

Tabela 6. Resultado da densidade da neoíntima realizada nos animais estenosados (E) e estenosados tratados com doxiciclina (ED) no 15° dia após a cirurgia nas regiões I2 e I3.

Dias de experimento	Densidade da neoíntima			
	I2		I3	
	E	ED	E	ED
15	44,2 ± 6	64,8 ± 2,3	48,6 ± 3,4	54,8 ± 11,7

Tabela 7. Resultado da densidade da camada média realizada nos animais estenosados (E), estenosados tratados com doxiciclina (ED), sham-operados (S) e sham-operados tratados com doxiciclina (SD) nos dias 7 e 15 nas regiões M1, M2, M3 e M4.

Dias de experimento	Densidade da camada média									
			M1		M2		M3		M4	
	S	SD	E	ED	E	ED	E	ED	E	ED
7	47,1 ± 5,6	52 ± 7,9	48,6 ± 0,8	51,6 ± 2,2	46,9 ± 0,9	51 ± 2,8	47,2 ± 3,3	48,4 ± 4,3	52,2 ± 6,7	51,6 ± 2,5
15	42,1 ± 2,2	53,2 ± 1,7	45,9 ± 1,5	52,9 ± 2,5	44 ± 1,9	55,6 ± 1,7	47,6 ± 2,4	48,5 ± 2,3	45,1 ± 3	52,3 ± 5

Tabela 8. Resultado da área (μm^2) da neoíntima realizada nos animais estenosados (E) e estenosados tratados com doxíciclina (ED) no 15º dia após a cirurgia nas regiões I2 e I3.

Dias de experimento	Área da neoíntima (μm^2)			
	I2		I3	
	E	ED	E	ED
15	4.002 $\pm$ 705,5	3.795 $\pm$ 177,8	5.624 $\pm$ 212,1	6.841 $\pm$ 1.220

Tabela 9. Resultado da extensão (μm) da neoíntima realizada nos animais estenosados (E) e estenosados tratados com doxíciclina (ED) no 15º dia após a cirurgia nas regiões I2 e I3.

Dias de experimento	Extensão da neoíntima (μm)			
	I2		I3	
	E	ED	E	ED
15	1.175 $\pm$ 309,5	1.568 $\pm$ 510,4	1.231 $\pm$ 477	1.947 $\pm$ 291,2

Tabela 10. Resultado do colágeno e elastina obtido pela intensidade da fluorescência em pixels nos animais estenosados (E), estenosados tratados com doxíciclina (ED), sham-operados (S) e sham-operados tratados com doxíciclina (SD) nos dias 1, 7 e 15.

Dias de experimento	Pixels							
	Camada Média				Abaixo do trombo/neoíntima		Trombo/neoíntima	
	S	SD	E	ED	E	ED	E	ED
1	273,9±147,7	261,1±49,1	261,4±105,2	320,7±65,8	192,9±79	209,7±7	693±420,9	483±37,2
7	315,5±121	363,7±82,9	247,5±91,4	307,7±182,5	186,7±90,5	190,6±206,6	291,6±224,1	350,2±498,7
15	223,3±94,1	309,9±39,5	318,4±133,7	366,4±140,1	143,9±56,7	317,4±138,8	155±145,8	332,7±223,9

Figura 17. Gráficos representativos da deposição de colágeno e elastina obtida pela fluorescência nas regiões da camada média (A-C), camada média abaixo da neoíntima (D-F) e trombo/neoíntima (G-I) das aortas dos animais controles sham-operado (S) e sham-operado tratado com doxiciclina (SD), estenosados (E) e estenosados tratados com doxiciclina (ED) sacrificados no período de 1, 7 e 15 dias após a cirurgia. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão. * $P < 0.05$.

ANEXO

COLORAÇÕES

Azul de toluidina e Fuscina básica (HE-like): Os cortes foram cobertos com algumas gotas da solução A por 3-5 minutos em platina aquecedora a 55-60°C, lavados em água corrente e secos em platina aquecedora. A seguir, os cortes foram cobertos com gotas da solução B por 1 minuto à temperatura ambiente, lavados em água corrente e secos em platina aquecedora. As lâminas foram montadas temporariamente com água.

Resorcina-Fucsina: Os cortes foram corados com a solução de resorcina-fucsina básica férrica de Weigert por 20 minutos à temperatura ambiente e verificado periodicamente no microscópio a coloração das fibras elásticas até que estejam azuis-escuras ou pretas. Logo após, as lâminas foram lavadas em álcool 95% por poucos segundos e em seguida, com água corrente por 30-60 segundos. Após, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Gill por 20 minutos à temperatura ambiente, lavados brevemente em água destilada e a seguir, as lâminas foram mergulhadas em solução Scott por 2 minutos e lavadas brevemente em água destilada. Após esse procedimento, os cortes foram corados com solução de eosina-floxina por 20 minutos, lavados rapidamente com água destilada. A seguir, os fragmentos foram desidratados rapidamente com álcool 95% (5 mergulhos), álcool 100% (2 trocas de 5 mergulhos cada) e diafanizados com xilol (2 trocas de 5 mergulhos cada). As lâminas foram montadas com Entellan (Merck S.A.).

REAGENTES E SOLUÇÕES

HCl 1%: Foi misturado 0,46 ml de ácido clorídrico p.a. a 19,54 ml de água destilada.

NaOH 1 N: Foi dissolvido 1 g de hidróxido de sódio (Merck S.A.) em 25 ml de água bidestilada.

Resorcina-Fucsina básica férrica (Weigert): Foram misturados 1 g de fucsina básica, 2 g de resorcina, 100 ml de água destilada, 12,5 ml de cloreto férrico em solução aquosa 29%, 100 ml de álcool 95% e 2 ml de ácido clorídrico.

Solução A – Azul de toluidina: Foram misturados 1 g de azul de toluidina O (Merck S.A.), 1 g de tetraborato de sódio (Merck S.A.) a 100 ml de água destilada. A solução foi estocada em frasco de vidro vedado por 6 meses à temperatura ambiente.

Solução B – Fucsina básica: Foram misturados 1 g de fucsina básica ((Merck S.A.) a 100 ml de álcool 50%. A solução foi estocada em frasco de vidro vedado por 6 meses à temperatura ambiente. A solução de trabalho foi preparada adicionando 60 ml de água destilada.

Solução de Scott (coloração resorcina-fucsina): Foi misturado 1 g de sulfato de magnésio a 100 ml de água destilada.

Solução I eosina-floxina: Foram misturados 0,57 ml de ácido acético glacial a 100 ml de água destilada.

Solução II eosina-floxina: Foram misturados 0,82 g de acetato de sódio a 100 ml de água destilada.

Solução de uso eosina-floxina: Foram misturados 295 ml de solução I, 705 ml de solução II, 5 g de eosina Y, 0,5 g de floxina e 2 cristais de timol (para evitar fungos).

Solução infiltradora: Foram misturados 100 ml de Historesin (Leica Instruments GmbH, Heidelberg, Alemanha) e 1 g de Hardner I (Leica Instruments GmbH).

Solução para inclusão: Foram misturados 15 ml de solução infiltradora e 1 ml de HARDNER II (Leica Instruments GmbH).

Solução pré-infiltradora: Foram misturadas partes iguais de solução pré-infiltradora e álcool 100%.

PROTOCOLO PARA ZIMOGRRAFIA

Gel de separação 12%

- 4,9 ml de água destilada;
- 6,0 ml da solução de Acrilamida 30% e Bisacrilamida 0,8%;
- 3,75 ml de tampão 4X Tris Cl / SDS pH 8,8;
- 375 µl de gelatina;
- 50 µl de Persulfato de Amônio (APS) 10%;
- 10 µl de TEMED.

Gel de largada 3,9%

- 3,05 ml de água destilada;
- 0,65 ml da solução de Acrilamida 30% e Bisacrilamida 0,8%;
- 1,25 ml de tampão 4X Tris Cl / SDS pH 6,8;
- 25 µl de APS 10%;
- 5 µl de TEMED.

Reagentes e Soluções:

Solução de Acrilamida 30% e Bisacrilamida 0,8%

- Pesar 30 g de Acrilamida e 0,8 g de Bisacrilamida;
- Adicionar q.s.p. 100 ml de água destilada;
- Filtrar e armazenar em refrigerador (4°C).

Solução 4X Tris Cl / SDS pH 8,8 (Tampão do gel de separação)

- Dissolver 91 g de Tris Base (1,5M) em 300 ml de água destilada;

- Ajustar o pH para 8,8 com HCl 6N;
- Filtrar a solução em papel de filtro e acrescentar 2 g de SDS 0,4% (m/v);
- Adicionar q.s.p. 500 ml de água destilada;
- Armazenar em refrigerador (4°C).

Solução 4X Tris Cl / SDS pH 6,8 (Tampão do gel de largada)

- Dissolver 6,05 g de Tris Base (0,5M) em 50 ml de água destilada;
- Ajustar o pH para 6,8 com HCl 6N;
- Filtrar a solução em papel de filtro e acrescentar 0,66 g de SDS 0,4% (m/v);
- Adicionar q.s.p. 100 ml de água destilada;
- Armazenar em refrigerador (4°C).

Persulfato de amônio (APS) 10%

- Pesar 1 g de APS;
- Dissolver em 10 ml de água destilada;
- Aliquotar 90 µl em cada *eppendorf*;
- Armazenar em freezer (-20°C).

Gelatina 40 mg/ml (m/v)

- Pesar 1 g de gelatina;
- Dissolver em 25 ml de água destilada aquecida até 60°C;
- Aliquotar 400 µl em cada *eppendorf*;
- Armazenar em freezer (-20°C).

Tampão de corrida 5X

- 15,1 g de Tris Base (0,125M);
- 72 g de Glicina (0,96M);
- 5 g de SDS [0,5 (m/v)];
- q.s.p. 1 litro de água destilada;
- Armazenar em refrigerador (4°C) e diluir para 1X quando do uso;
- Quando diluída pH 8,3 (não é necessário ajustar).

Solução Renaturante Tritox X-100 a 2% (v/v)

- Dissolver em 10 ml de Tritox X-100 em 100 ml de água destilada quente;
- q.s.p. 500 ml de água destilada.

Tris Cl 1M pH 7,4

- Pesar 121 g de Tris Base 1M;
- Adicionar 84 ml de HCl 0,1N para justar o pH para 7,4;
- Acrescentar 5 ml de azida sódica 4% (concentração final de 0,02%);
- Armazenar em frasco âmbar no refrigerador (4°C).

Tampão Tris a 50 mM com CaCl₂ a 10 mM pH 7,4

- 50 ml de solução Tris HCl 1M pH 7,4;
- Acrescentar 1,47 g CaCl₂.2H₂O;
- q.s.p. 1 litro de água destilada;
- Armazenar em frasco âmbar no refrigerador (4°C).

Corante Coomassie Blue

- 300 ml de metanol;
- 100 ml de ácido acético;
- 0,5 g Coomassie Blue G-250;
- q.s.p. 1 litro de água destilada;
- Armazenar em frasco âmbar à temperatura ambiente.

Descorante

- 300 ml de metanol;
- 80 ml de ácido acético;
- q.s.p. 1 litro de água destilada;
- Armazenar em frasco âmbar à temperatura ambiente.

Tampão de Amostra Não-Redutor 2X

- 25 ml de solução 4X de Tris Cl/SDS – pH 6,8 (0,1M);
- 20 ml de glicerol [20% (v/v)];
- 4 g SDS [4% (m/v)];
- 1 mg de azul de bromofenol [0,001% (m/v)];
- q.s.p. 100 ml de água destilada;
- Guardar em alíquotas de 1 ml em freezer (-20°C).

Tampão de Amostra Não-Redutor 6X

- 7 ml de solução 4X de Tris Cl/SDS – pH 6,8 (0,1M);
- 3 ml de glicerol [30% (v/v)] ou 3,8 g;

- 1 g SDS [1% (m/v);
- 1,2 mg de azul de bromofenol [0,0012% (m/v);
- Guardar em alíquotas de 0,5 ml em freezer (-20°C).

Agarose a 3%

- Pesar 3 g de agarose;
- 100 ml de água destilada quente;
- Armazenar em refrigerador (4°C).

Solução de Contração

- 400 ml de metanol;
- 50 ml de glicerol;
- q.s.p. 1 litro de água destilada;
- Armazenar à temperatura ambiente.

Preparo das amostras

1. Misturar uma parte da amostra com uma parte de tampão Não-Redutor 2X ou misturar cinco partes da amostra com uma parte de tampão Não-Redutor 6X, dependendo da concentração das amostras em questão;
2. Deixar por 10 minutos a 40°C;
3. Aplicar imediatamente.

PROTOCOLO PARA DOSAGEM DE PROTEÍNAS – MÉTODO DE BRADFORD

Padrão BSA 8 mg/ml

- 0,3 g de BSA (75% de pureza);
- q.s.p. 25 ml de água destilada;
- Armazenar em freezer (-20°C).

Curva Padrão

1. No eppendorf referente ao BRANCO, adicionar 100 µl de PBS (ou solução na qual as amostras estão diluídas - tampão de extração);
2. Preparar BSA 1,4 mg/ml: Em um *eppendorf* colocar 825 µl de PBS e adicionar 175 µl da solução estoque de BSA 8 mg/ml e homogeneizar;
3. Rotular os tubos dos padrões de 1 a 7: 1) 0,085 mg/ml; 2) 0,175 mg/ml; 3) 0,35 mg/ml; 4) 0,7 mg/ml; 5) 1,4 mg/ml; 6) 4 mg/ml e 7) 8 mg/ml.
4. No tubo 5 adicionar 200 µl da solução de BSA 1,4 mg/ml;
5. Adicionar 100 µl de PBS nos tubos 1 a 4;
6. Inicie a diluição seriada a partir do tubo 5 (padrão 1,4 mg/ml): pegar 100 µl do tubo 5 e adicionar ao tubo 4, homogeneizar. Repete-se este procedimento até o tubo 1.

Preparo da placa

1. Homogeneizar o Reagente de Bradford e deixá-lo atingir a temperatura ambiente;
2. Pipetar 5 µl do BRANCO, dos padrões e amostras nos pocinhos da placa de 96 wells;
3. Adicionar 250 µl do Reagente de Bradford;
4. Colocar no agitador por 30 minutos;
5. Ler a 595 nm no leitor de ELISA.

PROTOCOLOS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE IMUNOISTOQUÍMICA

Protocolo 1

- 1- Desparafinizar;
- 2- Recuperação antigênica:
 - **α -actina** e **PCNA** - tampão citrato (pH 6,0), por 40 minutos na panela a vapor;
 - **PDGF-B** - tripsina 0,25% por 15 minutos;
- 3- Lavar 3x por 5 minutos com PBS;
- 4- Bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 a 3 % por 20 minutos;
- 5- Lavar 3x por 5 minutos com PBS;
- 6- Incubar com Glicina 0,1M diluído em PBS por 5 minutos;
- 7- Incubar com leite Molico a 5% por 60 minutos;
- 8- Sem lavar incubar no anticorpo primário diluído em BSA 0,1% *overnight*;
- 9- Lavar 3x por 5 minutos com PBS;
- 10-Incubar no anticorpo secundário diluído 1/100 em BSA 0,1% por 1h a 37°C;
- 11-Lavar 3x por 5 minutos com PBS;
- 12-Incubar com reagente ABC (kit ABC Vectorstain PK 4000) por 30 minutos;
- 13-Lavar 3x por 5 minutos com PBS;
- 14-Incubar com DAB (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO,EUA);
- 15-Corar com Hematoxilina de Harris por $\pm$ 6 segundos;
- 16-Lavar em água amoniacal;
- 17-Diafanizar;
- 18-Desidratar;
- 19-Montar.

Protocolo 2

Anticorpo: **Fibrinogênio**

1. Desparafinizar;
2. Recuperação antigênica com tampão citrato pH 6,0 por 40 minutos na panela a vapor;
3. Lavar 3x por 5 minutos com PBS;
4. Bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 a 3 % por 20 minutos;
5. Lavar 3x por 5 minutos com PBS;
6. Incubar com leite Molico a 5% por 60 minutos;
7. Incubar com Glicina 0,1M diluída em PBS por 5 minutos;
8. Sem lavar incubar no anticorpo diluído em BSA 0,1% *overnight*;
9. Lavar 3x por 5 minutos com PBS;
10. Bloqueio da avidina endógena por 15 minutos (Kit Vector SP2001);
11. Lavar 3x por 5 minutos com PBS;
12. Bloqueio da biotina endógena por 15 minutos (Kit Vector SP2001);
13. Lavar 3x por 5 minutos com PBS;
14. Incubar no anticorpo secundário diluído 1/100 em BSA 0,1% por 1h;
15. Lavar 3x por 5 minutos com PBS;
16. Incubar com reagente ABC (kit ABC Vectorstain PK 4000) por 30 minutos;
17. Lavar 3x por 5 minutos com PBS;
18. Incubar com DAB (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA);
19. Corar com Hematoxilina de Harris por ± 6 segundos;
20. Lavar em água amoniacal;
21. Diafanizar;
22. Desidratar e Montar.

Protocolo 3

1. Desparafinizar;
2. Recuperação antigênica:
 - **MMP-2** e **MMP-9** - tampão citrato (pH 6,0), por 40 minutos na panela a vapor;
3. Lavar 3x por 5 minutos com PBS;
4. Bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 3 % por 20 minutos;
5. Lavar 3x por 5 minutos com PBS;
6. Incubar com Glicina 0,1M diluído em PBS por 5 minutos;
7. Lavar 3x por 5 minutos com PBS;
8. Incubar com Triton 0,5% (diluído em PBS) por 15 minutos;
9. Incubar com leite Molico a 5% por 60 minutos;
10. Sem lavar incubar no anticorpo primário diluído em BSA 0,1% *overnight*;
11. Lavar 3x por 5 minutos com PBS;
12. Incubar no anticorpo secundário diluído 1/100 em BSA 0,1% por 1h a 37°C;
13. Lavar 3x por 5 minutos com PBS;
14. Incubar com reagente ABC (kit ABC Vectorstain PK 4000) por 30 minutos;
15. Lavar 3x por 5 minutos com PBS;
16. Incubar com DAB (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA);
17. Corar com Hematoxilina de Harris por $\pm$ 6 segundos;
18. Lavar em água amoniacal;
19. Diafanizar;
20. Desidratar;
21. Montar.

Reagentes e Soluções:

Solução mãe de ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)

Diluir 2,1 g de ácido cítrico em 1000 ml de água destilada.

Tampão citrato de sódio pH 6,0

Diluir 90 ml da solução mãe de ácido cítrico em 810 ml de água destilada.

Tripsina 0,25%

Diluir 0,025 g de tripsina em 10 ml de PBS 0,1M pH 7,4.

Tampão Tris-HCl 0,05M pH 9,5

Diluir 3,0275 g de trizma base em 500 ml de água destilada. Corrigir o pH com HCl 1N.

Molico 5%

Diluir 0,25 g de leite Molico em 5 ml de PBS.

PROTOCOLO PARA *WESTERN BLOT*

Acrilamida/Bis-Acrilamida

Diluir 29,2 g de acrilamida e 2,4 g de Bis-Acrilamida em 100mL de água Milli-Q.

Agitar, filtrar e guardar em geladeira coberto com papel alumínio para evitar oxidação.

SDS 10%

Diluir 10 g de SDS em 100 ml de água Milli-Q. Agitar evitando fazer muita espuma.

Tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8

Dissolver 18,15 g de Tris base com um pouco de água Milli-Q, ajustar o pH para 8,8 com HCl 1N e completar para 100 ml. Guardar em geladeira.

Tampão Tris-HCl 0,5M pH 6,8

Dissolver 6 g de Tris base com um pouco de água Milli-Q, ajustar o pH para 6,8 com HCl 1N e completar para 100 ml. Guardar em geladeira.

Tampão de extração de proteínas

- 100 µl de Tris-HCl 0,01M pH 7,6;
- 100 µl EDTA 0,001M pH 8,0;
- 10 µl Aprotinina (1 µg/ml);
- 200 µl PMSF (100 µg/ml);

- 100 µl SDS 0,1%;
- 1000 µl 0,1M NaCl;
- q.s.p. 10 ml de água destilada Milli-Q;
- Utilizar imediatamente.

Tampão da amostra

- 4 ml de água Milli-Q;
- 1 ml de Tris-HCl 0,5M pH 6,8;
- 1,6 ml de SDS 10%;
- 0,8 ml de Glicerol;
- 0,4 ml de B-mercaptoetanol;
- 0,2 ml de Azul de Bromofenol.

Gel de acrilamida

	7,5%	10%	12%
Água Milli-Q	4,9 ml	4,1 ml	3,35 ml
1,5M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10%	100 µl	100 µl	100 µl
Acrilamida/Bis-Acrilamida	4 ml	3,3 ml	2,5 ml
APS 10%	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Deixar polimerizar por aproximadamente 30 minutos.

Stacking Gel

- 3,05 ml de água Milli-Q;
- 1,25 ml de Tris-HCl 0,5M pH 6,8;
- 50 µl de SDS 10%;
- 0,65 ml de Acrilamida/Bis-Acrilamida;
- 50 µl de APS 10%;
- 10 µl de TEMED;
- Deixar polimerizar por aproximadamente 30 minutos.

Aplicação da amostras

1. Aplicar de 20 a 30 µl de amostra diluída em tampão de amostra (Fazer os cálculos previamente);
2. Aquecer as amostras por 5 minutos no aparelho de PCR no programa *Denaturation*;
3. Preparar o padrão de peso molecular e aplicar 7 µl (Kaleidoscope Prestained Standards, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

Tampão da corrida pH 8,3 – 8,8

- 3,3 g de Tris base;
- 10 ml de SDS 10%;
- 14,46 g de Glicina;
- q.s.p. 1000 ml de água Milli-Q.

Tampão de transferência

- 2,42 g de Tris base;
- 8 ml de SDS 10%;
- 11,57 g de Glicina;
- 150 ml de Etanol Absoluto;
- q.s.p. 1000 ml de água Milli-Q.

TBS-T pH 7,6

- 2,42 g de Tris base;
- 8 g de Cloreto de Sódio (NaCl);
- 1 ml de Tween 20;
- q.s.p. 1000 ml de água Milli-Q.