Clarissa Campo Dall'Orto

Avaliação das interações das células endoteliais e das células musculares lisas arteriais com os inibidores do *mammalian target of rapamycin* (mTOR) na presença de soro rico em plaquetas

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

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Dall'Orto, Clarissa Campo
Avaliação das interações das células endoteliais e das células musculares lisas arteriais com os inibidores do mammalian target of rapamycin (mTOR) na presença de soro rico em plaquetas / Clarissa Campo Dall'Orto -- São Paulo, 2018.
Tese (doutorado) --Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.
Orientador: Durvanei Augusto Maria.

Descritores: 1. Doença das coronárias 2. Intervenção coronária percutânea 3. Stents farmacológicos 4. Sirolimo 5. Reestenose 6. Proliferação celular 7. Ciclo celular

USP/FM/DBD-306/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

Candidata: Clarissa Campo Dall'Orto

Título da Tese: Avaliação das interações das células endoteliais e das células musculares lisas arteriais com os inibidores do *mammalian target of rapamycin* (mTOR) na presença de soro rico em plaquetas

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a _____/_____/_____ considerou

( ) Aprovada ( ) Reprovada

Examinador(a): Nome: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Examinador(a): Nome: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Examinador(a): Nome: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Examinador(a): Nome: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

INSTITUTO BUTANTAN

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB)
Av. Dr. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brasil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

São Paulo, 20 de fevereiro de 2014

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação das interações endotélio-plaqueta via mammalian target of rapamycin (mTOR)", protocolo nº. **I-1198/14**, sob a responsabilidade de Durvanei Augusto Maria e Clarissa Campo Dall' Orto, não envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica.

This is to certify that the proposal "Evaluated endothelial-plaquelet interation pathway mammalian target of rapamycin (mTOR)", protocol nº **1198/14,** under the responsibility of Durvanei Augusto Maria and Clarissa Campo Dall' Orto, has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee, and that it does not involve breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata, in scientific research.

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

Dedicatória

Ao Rubens Pierry, amado esposo e amigo, exemplo de retidão e caráter, meu grande incentivador desde o começo dessa jornada, mantendo-se ao meu lado incondicionalmente me ajudando a enfrentar os desafios com otimismo e confiança.

À minha amada filha Helena, cuja gestação coincidiu com a gestação desta tese, e que me fez conhecer o maior amor que eu pude sentir, e o real e único sentido da minha vida.

Aos meus pais, Valmir por todo o esforço em minha formação profissional e Celina cujo amor abnegado me conduziu por toda a vida, minha bússola de integridade, perseverança e amor irrestrito.

Aos meus irmãos, Éttore, Valmir Júnior e João Paulo, pela amizade e apoio constante.

À minhas cunhadas, Fernanda, Patrícia e Danielle, por tornarem minha vida mais leve.

Aos meus sobrinhos Clara e Bernardo que sempre me trouxeram carinho e amor nos momentos juntos e são para mim motivo de muita alegria.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Durvanei Augusto Maria, incansável no seu trabalho, meus afetuosos agradecimentos pela orientação, permanente dedicação e revisão minuciosa desse trabalho.

Aos meus mestres Prof. Dr. José Armando mangione, Dr. Adnan Ali Salman, Dr. Salvador André Bavaresco Cristóvão e Dra. Fernanda Zulliani Mauro, exemplos cujos atos fundamentam a minha prática médica. Agradeço intensamente por guiarem meu desenvolvimento profissional.

Aos meus amigos Dr. Guilherme Lapa, Dra. Cristiana Marques, Dra. Valeska Leite e Dra. Quézia Mendes, amigos pessoais e profissionais que sempre acreditaram no meu trabalho.

Ao Dr. Gilvan Vilella Pinto Filho, pela convivência harmoniosa e por ter tolerado minha ausência para concretização desse sonho.

À Dra. Juliana Pereira, pelas grandes contribuições para este trabalho.

À Dra. Luciana Rodrigues Lisboa Faucz pelo incentivo à realização desse projeto.

Ao Daniel Rabelo, exemplo de honradez e comprometimento, obrigada pelo criterioso trabalho na confecção dessa tese.

Aos colegas do laboratório, Angelina, Arthur, Manuela, Rosely Poliana e Reginaldo, por terem me acolhido com ajuda inestimável e compartilhamento de conhecimentos. De igual maneira, estendo os meus agradecimentos a todos os funcionários do laboratório de Biologia Molecular do Instituto Butantan.

Aos enfermeiros, técnicos de enfermagem e funcionários do Centro Avançado de Terapia Hemodinâmica (CATHE), que com profunda dedicação, tornam possível nossa prática diária.

Ao sr. Alaeste Pereira de Oliveira, que sempre me ajudou a superar a distância que me separava dos meus sonhos.

À Camila Soares Silva, solícita e companheira, mesmo nas situações mais difíceis e repentinas.

Aos pacientes que confiam à nossa equipe sua vida, nos ensinando valores, nos tornando mais humanos, mais humildes e mais profissionais. Em um instante, entramos em suas histórias e de suas famílias, e desde então nos permitem seguir com os cuidados e os acompanhar muito além dos problemas de saúde.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”. (Leonardo da Vinci)

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1 Introdução 35
1.1 Impacto da doença cardiovascular no Brasil e no mundo 36
1.2 A necessidade de *stents* coronarianos 37
1.3 Reparação endotelial após intervenções percutâneas nas artérias coronárias 40
1.3.1 Processo de reparo após angioplastia com balão 40
1.3.2 Processo de reparo após angioplastia com *stent* 42
1.3.2.1 Resposta endotelial aguda pós-*stent*: mecanismos celulares e moleculares 43
1.3.2.2 Formação de trombo 43
1.3.2.3 Inflamação 44
1.3.2.4 Proliferação das Células Musculares Lisas 45
1.3.2.5 Matriz Extracelular 45
1.4 Reestenose intra*stent* 47
1.4.1 Alterações agudas e crônicas na geometria do vaso 49
1.4.2 Migração de células musculares lisas e produção excessiva de matriz extracelular (hiperplasia neointimal) 49
1.5 Neoaterosclerose 50
1.6 Trombose de *stents* 52
1.7 A via de sinalização do mTOR 54
1.7.1 Inibidores do mTOR: sirolimo (rapamicina) e seus análogos 58
1.8 Hipótese 60
2 Objetivos 61
2.1 Objetivo primário 62

2.2 Objetivos secundários 62
3 Métodos 63
3.1 Delineamento do estudo 64
3.2 Monocultura celular 67
3.3 Cocultura celular 71
3.4 Curva de crescimento 76
3.5 Soro rico em plaquetas (PRP) à 10% 78
3.6 *Stents* utilizados e seu manuseio 79
3.7 Concentração de sirolimo ajustada pelo número de células por poço de cultura 84
3.8 Avaliação da citotoxicidade pelo método colorimétrico do MTT e determinação da IC_5 87
3.9 Determinação de produtos da peroxidação de lipídios polissaturados 88
3.10 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo 90
3.11 Análise da expressão de marcadores celulares envolvidos nas vias de apoptose e controle de proliferação celular por citometria de fluxo 91
3.11.1 Marcadores celulares utilizados 91
3.11.1.1 Caspase 3 92
3.11.1.2 PCNA 92
3.11.1.3 p27 93
3.11.1.4 Ciclina D1 94
3.11.1.5 ICAM-1 94
3.11.1.6 IL-1 e IL-6 95
3.11.1.7 TNF-DR4 95
3.11.1.8 VEGF-R1 96
3.11.1.9 MCP-1 96
3.11.2 Descrição da técnica laboratorial para análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo 97
3.12 Análise estatística 98
4 Resultados 99
4.1 Avaliação dos aspectos morfológicos das culturas de células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana tratadas com *stents* convencional e farmacológico 100

4.1.1 Avaliação dos aspectos morfológicos das monoculturas de células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana tratadas com *stents* convencional e farmacológico 100
4.1.2 Avaliação dos aspectos morfológicos das coculturas de células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana tratadas com *stents* convencional e farmacológico 103
4.1.3 Avaliação dos aspectos morfológicos das coculturas de células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana com PRP à 10% tratadas com *stents* convencional e farmacológico 108
4.2 Avaliação da viabilidade celular e determinação da IC_{50} após o tratamento com o sirolimo em células endoteliais humanas e células musculares lisas arteriais de aorta humana. 111
4.2.1 Avaliação da viabilidade celular e determinação da IC_{50} após o tratamento com o everolimo em células endoteliais humanas 111
4.2.2 Avaliação da viabilidade celular e determinação da IC_{50} após o tratamento com o everolimo em células musculares lisas de aorta humana 116
4.3 Determinação da formação de peróxidos lipídicos 121
4.3.1 Determinação da formação de peróxidos lipídicos no teste colorimétrico do MTT 121
4.3.1.1 Células endoteliais humanas tratadas com sirolimo no teste colorimétrico do MTT 121
4.3.1.2 Células musculares lisas de aorta humana tratadas com sirolimo no teste colorimétrico do MTT 125
4.3.2 Determinação da formação de peróxidos lipídicos na monocultura com células endoteliais humanas (Grupo 1) 130
4.3.3 Determinação da formação de peróxidos lipídicos na monocultura com células musculares lisas de aorta humana (Grupo 2) 133
4.3.4 Determinação da formação de peróxidos lipídicos na cocultura de células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana no Grupo 3 (Modelo-II) 137
4.3.5 Determinação da formação de peróxidos lipídicos na cocultura de células musculares lisas de aorta humana células endoteliais humanas no Grupo 4 (Modelo-I) 139

4.3.6 Determinação da formação de peróxidos lipídicos na cocultura de células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana no Grupo 5 com soro rico em plaquetas à 10% (Modelo-II) 142
4.3.7 Determinação da formação de peróxidos lipídicos na cocultura celular de células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana no Grupo 6 com soro rico em plaquetas (Modelo-I) 144
4.3.8 Comparação da determinação da formação de peróxidos lipídicos na cocultura celular intergrupos de cocultura com a mesma base celular com ou sem adição do soro rico em plaquetas à 10% 147
4.3.8.1 Comparação da determinação da formação de peróxidos lipídicos na cocultura celular entre os Grupo 3 e 5 (Modelo-II) 147
4.3.8.2 Comparação da determinação da formação de peróxidos lipídicos na cocultura celular entre os Grupo 4 e 6 (Modelo-I) 149
4.4 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo 151
4.4.1 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo na monocultura celular de células endoteliais humanas (Grupo 1) 153
4.4.2 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo na monocultura células musculares lisas de aorta humana (Grupo 2) 155
4.4.3 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo na cocultura celular Grupo 3 (Modelo-II) 157
4.4.4 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo na cocultura Grupo 4 (Modelo-I) 159
4.4.4.1 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo na cocultura celular Grupo 5 (Modelo-II) 161
4.4.4.2 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo na cocultura celular Grupo 6 (Modelo-I) 163
4.5. Análise da expressão de marcadores celulares 165
4.5.1 Análise da expressão de marcadores celulares envolvidos nas vias de apoptose e controle de proliferação celular 165
4.5.2 Análise da expressão de marcadores celulares envolvidos processo inflamatório 170
5 Discussão 181

6 Conclusão.....188
7 Referências Bibliográficas.....191

Listas

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	adenosina monofosfato
ARC	*Academic Research Consortium*
ATCC	*American Type Culture Collection*
Atg13	gene 13 relacionado a autofagia
ATP	adenosina trifosfato
Bcl-2	proteína 2 da leucemia/linfoma de célula B
*BMS**	*stent convencional (bare metal stent)*
	**será aplicada a mesma nomenclatura para o singular e o plural*
BSA	albumina do soro bovino
Cdk	ciclina dependente de quinase
CKI	inibidor de ciclina dependente de quinase
CML*	célula muscular lisa
	**será aplicada a mesma nomenclatura para o singular e o plural*
CO2	gás carbônico
CSF	fator estimulante de colônia
DAC	doença arterial coronária
DAP1	proteína 1 associada à morte
DCV	doença cardiovascular
DEPTOR	proteína de interação a mTOR
DES*	*stent* eluidor de fármaco (*drug-eluting stent*)
	**será aplicada a mesma nomenclatura para o singular e o plural*
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etileno diaminotetracético
EGF	fator de crescimento epitelial
EIF4EBP (4E-BP)	proteína ligante do fator de iniciação da translação eucariótica
EIF4EBP1 (4E-BP1)	proteína ligante 1 do fator de iniciação da translação eucariótica
eIF4E	fator de iniciação da translação eucariótica
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EUA	Estados Unidos da América
FACScalibur	*Fluorescence activated cell analyser*
FKBP-12	proteína ligante do tacrolimo de 12 quilodalton
FK506	tacrolimo
FRB	domínio FKBP-12 ligante da rapamicina
GβL-G	proteína do tipo subunidade da proteína beta
HIF1	fator 1 induzido por hipóxia
HUVEC*	célula endotelial humana
	**será aplicada a mesma nomenclatura para o singular e o plural*
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC_{50}	concentração inibitória de 50%
ICAM-1	molécula de adesão intercelular-1
ICP*	intervenção coronária percutânea
	**será aplicada a mesma nomenclatura para o singular e o plural*
IFN	interferon
IFN-γ	interferon-gama
IL	interleucina
IL-1	interleucina-1
IL-8	interleucina-8
KCl	cloreto de sódio
KH2PO4	fosfato monopotássico ou dihidrogenofosfato de potássio
LDL	lipoproteína de baixa densidade
MCP-1	proteína quimiotática de monócitos-1
M-CSF	fator estimulante de colônias de macrófagos
mSIN1	proteína quinase dos maníferos ativada pelo estresse
mSLT8	mamífero letal com Sec13 proteína 8
mTOR	proteína alvo da rapamicina nos mamíferos
mTORC1	complexo do mTOR1
mTORC2	complexo do mTOR2
MTT	brometo [3-(4,5-dimetiltiazol-2-1)2,5-difeniltetrazólio]
p15	proteína 15

p16	proteína 16
p18	proteína 18
p19	proteína 19
p27	proteína 27
p57	proteína 57
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
PDCD4	proteína programadora da morte celular
PDGF	fator de crescimento derivado das plaquetas
PDK1	proteína 3-fosfoinositida
PF-4	fator plaquetário 4
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinase
PIP_2	fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PIP_3	fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PKB	proteína quinase B
PKC	proteína quinase C
Na2HPO4	fosfato dissódico ou hidrogenofosfato dissódico
NaCl	cloreto de sódio
RAPTOR	proteína regulatória associada ao mTOR
Rb	proteína supressora do tumor de retinoblastoma
Rictor:	proteína companheira do mTOR insensível à rapamicina
RIS	reestenose intra*stent*
RNA	ácido ribonucleico
RNaseA	ribonuclease A
rpm	rotações por minuto
S6 quinase	proteína quinase 6
SDF-1	*stromal cell-derived fator-1*
SFB	soro fetal bovino
SGK1	proteína quinase 1 soro- e glicocorticoide-induzida
Sin1	proteína de interação com a proteína-quinase ativada por estresse 1
SP	São Paulo
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA	ácido tricloroacético
TFIIIC	fator de transcrição 3C
TGF	fator transformador de crescimento
TIF-IA	fator de iniciação da transcrição dependente do crescimento
TIMI	*Thrombolysis In Myocardial Infarction Study Group*
TNF	fator de necrose tumoral
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
TNF-DR4	receptor de morte 4 do fator de necrose tumoral
TSC1	complexo esclerose tuberosa 1
TSC2	complexo esclerose tuberosa 2
ULK1	fator promotor de autofagia unc-51-like quinase 1
VCAM-1	molécula de adesão celular vascular 1
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VEGF-R	receptor do fator de crescimento endotelial vascular
VSMC*	célula muscular lisa arterial de aorta humana

**será aplicada a mesma nomenclatura para o singular e o plural*

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetros
g/dL	grama por decilitro
L	litro
log[x] μM	concentração molar na função logarítmica
M	molar
mL	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
nm	nanômetro
nM	nanomolar
nmol/L	nanomol/litro
μg	micrograma
$\mu g/mm^2$	micrograma/milimetro quadrado
μL	microlitro
μM	micromolar
^{o}C	Celsius
®	marca registrada
≥	maior ou igual
±	mais ou menos
<	menor
%	porcentagem
“	polegadas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Apresentação dos diferentes tipos, quantidades e concentrações celulares nos modelos de cultura celular e a dose relacionada de sirolimo por poço de cultura celular ajustada para a quantidade célula 86

Tabela 2- Anticorpos primários específicos para proteínas e receptores utilizados na etapa de análise da expressão de marcadores celulares envolvidos nas vias de apoptose e necrose por citometria de fluxo..... 97

Tabela 3- Valores de MDA evidenciando a formação de peróxidos lipídicos poli-insaturados para células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana tratadas com sirolimo no teste colorimétrico do MTT comparadas ao experimento controle nos períodos de tratamento de 24 e 48horas..... 129

Tabela 4- Cálculo da média da taxa da formação de peróxidos lipídicos poli-insaturados no experimento com as células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura com *stent* convencional ou *stent* farmacológico após os períodos de tratamento de 24 e 48 horas..... 136

Tabela 5- Cálculo da média da taxa da formação de peróxidos lipídicos poli-insaturados no experimento com as células na cocultura celular no Grupo 3 (Modelo-II) e Grupo 4 (Modelo-I) com *stent* convencional ou *stent* farmacológico após os períodos de tratamento de 24 e 48 horas..... 141

Tabela 6- Cálculo da média da taxa da formação de peróxidos lipídicos poli-insaturados no experimento com as células na cocultura celular no Grupo 5 (Modelo-II) e Grupo 6 (Modelo-I) com *stent* convencional ou *stent* farmacológico após os períodos de tratamento de 24 e 48 horas..... 145

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Processos que contribuem para redução da área luminal após angioplastia 42
Figura 2- Eventos sucessivos no desenvolvimento da reestenose..... 46
Figura 3- Vias de sinalização do mTOR..... 57
Figura 4- Mecanismo de ação do sirolimo..... 59
Figura 5- Delineamento do estudo..... 65
Figura 6- Desenho esquemático da monocultura de células endoteliais humanas em experimento de 24 horas..... 69
Figura 7- Desenho esquemático da monocultura de células endoteliais humanas em experimento de 48 horas..... 69
Figura 8- Monocultura de células musculares lisas de aorta humana em experimento de 24 horas..... 70
Figura 9- Monocultura de células musculares lisas de aorta humana em experimento de 48 horas..... 70
Figura 10- Cocultura Modelo-I Grupo 4..... 72
Figura 11- Cocultura Modelo-II Grupo 3..... 73
Figura 12- Cocultura com PRP à 10% Modelos-I e II, Grupos 4 e 5..... 74
Figura 13- Foto da placa de cultura das coculturas Modelo-I e II, Grupos 3 e 4..... 75
Figura 14- Foto da placa de cultura das coculturas Modelo-I e II, Grupos 5 e 6..... 75
Figura 15- Curva de crescimento celular..... 77
Figura 16- Ilustração da fórmula do cálculo da área do *stent*..... 81
Figura 17- Manuseio dos *stents* utilizados nos experimentos..... 83
Figura 18- Fotomicrografia representativa das alterações celulares na monocultura com HUVEC e VSMC 24h..... 101
Figura 19- Fotomicrografia representativa das alterações celulares na monocultura com HUVEC e VSMC 48h..... 102
Figura 20- Fotomicrografia representativa das alterações celulares na cocultura Modelo II na presença de BMS ou DES no período 24 horas..... 104
Figura 21- Fotomicrografia representativa das alterações celulares na cocultura Modelo-I na presença de BMS ou DES no período 24 horas..... 105

Figura 22- Fotomicrografia representativa das alterações celulares na cocultura Modelo II na presença de BMS ou DES no período 48 horas..... 106
Figura 23- Fotomicrografia representativa das alterações celulares na cocultura Modelo I na presença de BMS ou DES no período 48 horas..... 107
Figura 24- Fotomicrografia representativa das alterações celulares nas coculturas Modelos I e II com PRP na presença de BMS ou DES no período de 24 horas..... 109
Figura 25- Fotomicrografia representativa das alterações celulares na cocultura Modelos I e II com PRP na presença de BMS ou DES no período de 48 horas..... 110
Figura 26- Determinação da IC_{50} após o tratamento com o everolimo por 24 horas em células endoteliais humanas. 112
Figura 27- Fotomicrografia representativa das alterações celulares em células endoteliais humanas, após 24 horas de tratamento com everolimo..... 113
Figura 28- Determinação da IC_{50} após o tratamento com o everolimo por 48 horas em células endoteliais humanas..... 114
Figura 29- Fotomicrografia representativa das alterações celulares em células endoteliais humanas, após 48 horas de tratamento com everolimo..... 115
Figura 30- Determinação da IC_{50} após o tratamento com o sirolimo por 24 horas em células musculares lisas arteriais de aorta humana..... 117
Figura 31- Fotomicrografia representativa das alterações celulares em células musculares lisas de aorta humana, após 24 horas de tratamento com everolimo..... 118
Figura 32- Determinação da IC50% após o tratamento com o everolimo por 48 horas em células musculares lisas arteriais de aorta humana..... 119
Figura 33- Fotomicrografia representativa das alterações celulares em células musculares lisas de aorta humana, após 48 horas de tratamento com everolimo..... 120
Figura 34- Produção de peróxidos lipídicos por células endoteliais humanas em monocultura tratadas com diferentes concentrações de everolimo durante ensaio colorimétrico do MTT nos períodos de 24 (A) e 48 horas (B)..... 122

Figura 35- Correlação da produção de peróxidos lipídicos por células endoteliais humanas em monocultura tratadas com diferentes concentrações de everolimo durante ensaio colorimétrico de viabilidade celular (MTT)..... 123

Figura 36- Correlação da produção de peróxidos lipídicos por células endoteliais humanas em monocultura tratadas com diferentes concentrações de everolimo durante ensaio colorimétrico de viabilidade celular (MTT) x produção de peróxidos lipídicos..... 124

Figura 37- Produção de peróxidos lipídicos por células musculares lisas de aorta humana em monocultura tratadas com diferentes concentrações de everolimo durante ensaio colorimétrico do MTT, nos períodos de 24 (A) e 48 horas (B). MDA: malondialdeido..... 126

Figura 38- Correlação da produção de peróxidos lipídicos por células musculares lisas de aorta humana em monocultura tratadas com diferentes concentrações de everolimo durante ensaio colorimétrico de viabilidade celular (MTT).... 127

Figura 39- Correlação da produção de peróxidos lipídicos por células musculares lisas de aorta humana em monocultura tratadas com diferentes concentrações de everolimo durante ensaio colorimétrico de viabilidade celular (MTT) x produção de peróxidos lipídicos..... 128

Figura 40- Produção de peróxidos lipídicos por células endoteliais humanas em monocultura (grupo 1) tratadas com *stent* convencional ou *stent* farmacológico nos períodos de 24 (A) e 48 (B) horas..... 131

Figura 41- Produção de comparativa de peróxidos lipídicos por células endoteliais humanas em monocultura (Grupo 1) tratadas com *stent* convencional ou *stent* farmacológico nos períodos de 24 e 48 horas..... 132

Figura 42- Produção de peróxidos lipídicos por células musculares lisas de aorta humana em monocultura (grupo 2) tratadas com *stent* convencional ou *stent* farmacológico nos períodos de 24 (A) e 48 (B) horas..... 135

Figura 43- Produção de comparativa de peróxidos lipídicos por células musculares lisas de aorta humana em monocultura (grupo 2) tratadas com *stent* convencional ou *stent* farmacológico nos períodos de 24 e 48 horas..... 135

Figura 44- Produção de peróxidos lipídicos pelo Grupo 3..... 138

Figura 45- Produção de peróxidos lipídicos pelo grupo 4..... 140

Figura 46- Comparação da produção de peróxidos lipídicos pelos grupos 3 e 4 tratados com *stent* farmacológico ou *stent* convencional em comparação ao grupo controle..... 141
Figura 47- Produção de peróxidos lipídicos pelo Grupo 5..... 143
Figura 48- Produção de peróxidos lipídicos pelo Grupo 6..... 146
Figura 49- Comparação da produção de peróxidos lipídicos pelos grupos 3 e 5..... 148
Figura 50- Comparação da produção de peróxidos lipídicos pelos grupos 4 e 6..... 150
Figura 51- Histograma representativo das fases do ciclo celular..... 152
Figura 52- Exemplos de histogramas representativos das fases do ciclo celular obtido pelo citômetro de fluxo FACSCalibur..... 152
Figura 53- Distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular do Grupo 1..... 154
Figura 54- Distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular do Grupo 2..... 156
Figura 55- Distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular da cocultura Grupo 3..... 158
Figura 56- Distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular da cocultura Grupo 4..... 160
Figura 57- Distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular da cocultura Grupo 5..... 162
Figura 58- Distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular da cocultura Grupo 6..... 164
Figura 59- Expressão do marcador celular envolvido nas vias de apoptose e controle de proliferação celular caspase-3 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura e cocultura celular na ausência e na presença de soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas..... 166
Figura 60- Expressão do marcador celular envolvido nas vias de controle de proliferação celular PCNA nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura e cocultura celular na ausência e na presença de soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent*

convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas..... 167

Figura 61- Expressão do marcador celular envolvido nas vias de controle de proliferação celular p-27 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura e cocultura celular na ausência e na presença de soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas..... 168

Figura 62- Expressão do marcador celular envolvido nas vias de controle de proliferação celular ciclina-D1 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura e cocultura celular na ausência e na presença de soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas..... 169

Figura 63- Expressão do marcador celular envolvido nas vias de processo inflamatório ICAM-1 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura e cocultura celular na ausência e na presença de soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas..... 172

Figura 64- Comparação da expressão do marcador celular envolvido nas vias de processo inflamatório ICAM-4 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em cocultura celular tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas: Grupos 3 e 5 (Modelo-II sem e com soro rico em plaquetas à 10%) e Grupos 4 e 6 (Modelo-I sem e com soro rico em plaquetas à 10%)..... 173

Figura 65- Expressão do marcador celular envolvido nas vias de processo inflamatório TNF-DR4 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura (A e B) e cocultura celular na ausência (C e D) e na presença (E e F) de soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas..... 174

Figura 66- Comparação da expressão do marcador celular envolvido nas vias de processo inflamatório TNF-DR4 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em cocultura celular tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas: Grupos 3 e 5 (Modelo-II sem e com soro rico em plaquetas à 10%) e Grupos 4 e 6 (Modelo-I sem e com soro rico em plaquetas à 10%)..... 175

Figura 67- Expressão do marcador celular envolvido nas vias de processo inflamatório IL-6 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura e cocultura celular na ausência e na presença de soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas..... 176

Figura 68- Comparação da expressão do marcador celular envolvido nas vias de processo inflamatório IL-6 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em cocultura celular tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas: Grupos 3 e 5 (Modelo-II sem e com soro rico em plaquetas à 10%) e Grupos 4 e 6 (Modelo-I sem e com soro rico em plaquetas à 10%)..... 177

Figura 69- Expressão do marcador celular envolvido nas vias de processo inflamatório MCP-1 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura e cocultura celular na ausência e na presença de soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas..... 178

Figura 70- Expressão do marcador celular envolvido nas vias de processo inflamatório IL-1 beta nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura e cocultura celular na ausência e na presença de soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas..... 179

Figura 71- Expressão do marcador celular envolvido nas vias de processo inflamatório VEGF-R1 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura (A e B) e cocultura celular na ausência (C e D) e na presença (E e F) de soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent*

convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas..... 180

Resumo

Dall'Orto CC. *Avaliação das interações das células endoteliais e das células musculares lisas arteriais com os inibidores do mammalian target of rapamycin (mTOR) na presença de soro rico em plaquetas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: O sucesso a longo prazo da intervenção coronária percutânea, inicialmente realizada apenas com balão, era limitado pelo recolhimento elástico da artéria e pela hiperplasia neointimal. Com o advento dos *stents* convencionais (BMS) houve melhora nesse cenário e diminuição da reestenose, que é resultante de uma complexa cadeia de eventos iniciada após a injúria causada na parede vascular pela insuflação de balões e da aposição das hastes do *stent*. A proliferação excessiva de células musculares lisas (VSMC) tem papel fundamental na formação da neoíntima no contexto da reestenose intra-*stent* com a consequente redução da luz arterial. Com o advento dos *stents* farmacológicos (DES) houve diminuição importante da hiperplasia neointimal e um dos fármacos que se mostrou efetivo nesse papel é o sirolimo, que atua se ligando à proteína de ligação 12 e o heterodímero resultante se liga à mTOR impedindo sua ativação e causando parada do ciclo celular entre as fases G1 e S, desse modo inibindo a proliferação e migração de VSMC e das células endoteliais (HUVEC). Portanto a intervenção coronária acaba interferindo diretamente no endotélio, interferindo na produção das HUVEC não apenas no aspecto quantitativo, mas também na função das mesmas, e a qualidade funcional do endotélio é tão fundamental quanto à sua presença. Após o implante dos DES, principalmente os de primeira geração, ocorre disfunção endotelial cujo principal marcador é a perda da capacidade do relaxamento do vaso. Há correlação também entre cobertura das hastes incompleta e ocorrência de trombose dos *stents*. Consequentemente há espaço para o aprimoramento dos DES, para que se tornem dispositivos com eficácia já alcançada na prevenção da reestenose porém com um perfil de segurança maior. O presente trabalho tem como objetivo avaliar as alterações causadas pelos DES nas HUVEC e nas VSMC em cocultura na presença e na ausência do soro rico em plaquetas. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Utilizamos células HUVEC e VSMC em modelos de monocultura e cocultura, na presença e na ausência de soro rico em plaquetas, tratadas com BMS ou DES. Realizamos a determinação da IC_{50} do inibidor da mTOR, avaliação da citotoxicidade pelo método colorimétrico do MTT, determinação da formação de peróxidos lipídicos, avaliação das fases do ciclo celular e da expressão de marcadores de controle de proliferação e inflamação. **RESULTADOS:** Na avaliação da citotoxicidade pelo método colorimétrico do MTT e determinação da IC_{50} as VSMC foram menos sensíveis ao sirolimo que as HUVEC (IC_{50} em 24/48 horas 14,85/10,47µM e 9,48/22,24 µM, respectivamente para HUVEC e VSMC). As plaquetas e fatores solúveis potencializam o estresse oxidativo gerado pela presença dos *stents* possivelmente por ampliar o ambiente inflamatório. Houve parada do ciclo celular na fase G0/G1 causada pelos DES somente com adição das plaquetas ao meio de cultura. Nos modelos de cultura celular sem as plaquetas a parada do ciclo celular foi em G2/M. Não houveaumento das células na fase DNA fragmentado (sub-G0) evidenciando que não houve indução de morte celular. **CONCLUSÃO:** As VSMC foram menos sensíveis ao sirolimo que as HUVEC. Nos modelos de cocultura com adição das plaquetas os DES eluídores de sirolimo causaram parada do ciclo celular na fase G0/G1 sem indução de morte celular, sugerindo que o sirolimo exerce seus efeitos anti-inflamatórios nessas populações celulares e consequentemente reduz a hiperplasia neointimal por um mecanismo citostático.

Descritores: doença das coronárias; intervenção coronária percutânea; *stents* farmacológicos; sirolimo; reestenose; proliferação celular; ciclo celular.

Abstract

Dall'Orto CC. *Evaluation of the interactions of endothelial cells and arterial smooth muscle cells with mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors in the presence of platelet rich serum* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

INTRODUCTION: The long-term success of percutaneous coronary intervention, initially performed only with a balloon, was limited by the elastic recoil of the artery and by neointimal hyperplasia. There was improvement in this scenario with the advent of bare metal *stents* (BMS), because they decrease in restenosis, that resulting from a complex network of events initiated after the injury caused in the vascular wall by insufflation of balloons and apposition of the *stent* struts. Excessive proliferation of smooth muscle cells (VSMC) plays a key role in neointimal hyperplasia in the context of intrastent restenosis with consequent reduction of arterial lumen. With the advent of drug-eluting stents (DES) there was a significant decrease in neointimal hyperplasia and one of the drugs that proved effective in this role is sirolimus, which acts by binding to the binding protein 12 and the resulting heterodimer binds to mTOR preventing its activation and causing cell cycle arrest between G1 and S phases and thereby inhibiting the proliferation and migration of VSMC and also inhibiting endothelial cells (HUVEC). Therefore, coronary intervention interferes directly in the endothelium, interfering in the production of endothelial cells, not only in the quantitative aspect, but also in their function, and the functional quality of the endothelium is as fundamental as its presence. After the implantation of DES, especially those of the first generation, endothelial dysfunction occurs, whose main marker is the loss of the capacity of the vessel relaxation. There is also correlation between incomplete stem coverage and stent thrombosis. Consequently, it is possible to improve of the DES, so that they become devices with already achieved effectiveness in the prevention of restenosis but with a greater safety profile. The present study aims to evaluate the changes caused by DES in human HUVEC and VSMC in co-culture in the presence and absence of platelet-rich serum. **MATERIALS AND METHODS:** We used HUVEC and VSMC in monoculture and co-culture models in the presence and absence of platelet rich serum treated with BMS or DES. We performed the determination of IC_{50} for mTOR inhibitor, cytotoxicity evaluation by the colorimetric method of MTT, determination of lipid peroxide formation, cell cycle and expression of necrosis and inflammation markers. **RESULTS:** In the assessment of cytotoxicity by the MTT colorimetric method and determination of the IC_{50}, VSMC were less sensitive to sirolimus than HUVEC (IC_{50} in 24/48 hours 14.85 µM/10.47µM and 9.48 µM/ 22.24 µM, respectively for HUVEC and VSMC). Platelets potentiate the oxidative stress generated by the presence of stents, possibly by increasing the inflammatory environment. Drug-eluting *stents* arrested VSMC and HUVEC in the G0/G1 phase of the cell cycle only with the addition of platelets to the culture medium. In cell culture models without platelets the cell cycle arrest was in G2/M. There was no increase of the cells in the fragmented DNA phase (sub-G0) evidencing that there was no induction of apoptosis. **CONCLUSION:** Human aorta smooth muscle cells of the were less sensitive to sirolimus than HUVEC. In coculture models with platelet addition, DES with sirolimus caused cell cycle arrest in the G0/G1 phase without induction of apoptosis, suggesting that sirolimus exerts its antiinflammatory effects in these cellular populations and consequently reduces neointimal hyperplasia via a cytostatic mechanism.

Descriptors: coronary disease; percutaneous coronary intervention; drug-eluting s*tents*; sirolimus; restenosis; cell proliferation; cell cycle.

1 Introdução

1.1 Impacto da doença cardiovascular no Brasil e no mundo

O século XX assistiu a aumentos expressivos na expectativa de vida e a uma grande virada nas causas das doenças e mortes por todo o mundo. Durante essa transição, a doença cardiovascular (DCV) tornou-se a causa mais comum de morte no mundo inteiro. Dirigida pela industrialização, pela urbanização e associada a mudanças em estilo de vida, esta transição está ocorrendo pelo mundo afora em todas as raças, grupos étnicos e culturas de uma forma ainda mais rápida do que no século passado. À semelhança do que ocorreu nos países de alta renda no século passado, atualmente a DCV causa a maior parte das mortes em todas as regiões de média e baixa renda (com exceção da África Subsaariana), sendo a principal causa de morte entre os indivíduos com mais de 45 anos de idade. Há um século, a DCV era responsável por menos de 10% de todas as mortes. Entre 1990 a 2013, as mortes por doenças cardiovasculares aumentaram de 26% para 32% entre todas as causas de morte, um reflexo da rapidez da transição epidemiológica, particularmente nas regiões de baixa e média renda. Em números absolutos, a DCV causa quatro a cinco vezes mais mortes nos países de baixa e média renda quando comparados aos de renda elevada.[1]

O impacto socioeconômico das doenças crônicas é crescente, sendo considerado um problema para a saúde pública mundial. Além das mortes prematuras, as DCV são responsáveis por incapacidade laboral, redução da renda familiar e redução da produtividade.[2] O custo das internações por DCV é considerado o maior dentre as causas de internações hospitalares no Brasil e dados recentes do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostram que o Brasil está mudando muito rapidamente a sua estrutura etária, aumentando a proporção de idosos e a expectativa de vida do brasileiro.[3,4] O envelhecimento tende a aumentar a incidência de DCV e, consequentemente os seus custos de forma exponencial.[5]

Entre estas afecções, destaca-se a doença arterial coronária (DAC), responsável por mais da metade dos eventos cardiovasculares em homens e mulheres acima dos 75 anos,[6] e que possui na intervenção coronária percutânea (ICP) uma das modalidades de tratamento.

Em 1964, Charles Theodore Dotter e Melvin P. Judkins descreveram a primeira angioplastia. Treze anos após Andreas Gruntzig realizou a primeira angioplastia coronária com balão, um tratamento revolucionário que levou ao nascimento de uma nova especialidade, a cardiologia intervencionista.[7] Desde o primeiro procedimento, houve amplos

desenvolvimentos e avanços que culminaram na ICP sendo um dos procedimentos médicos invasivos mais realizados na prática clínica na atualidade. O uso da ICP para tratamento da DAC aumentou drasticamente nas últimas três décadas tornando-se o método de revascularização prevalente para tratamento da maioria dos pacientes com DAC. Nos Estados Unidos da América (EUA) estima-se que são realizados 600.000 procedimentos de ICP ao ano, excedendo os números de cirurgia de revascularização.[1]

Os *stents* coronários, que foram desenvolvidos pela primeira vez em meados da década de 1980, substituíram a antiga angioplastia com balão como o método preferido de realização da ICP, após as melhorias nos desfechos angiográficos e clínicos observados com seu uso. A maioria dos procedimentos de ICP agora envolve um *stent* coronariano e, portanto, os cardiologistas intervencionistas se deparam com uma ampla escolha de *stents* coronarianos para implante. Esta escolha varia de *stents* convencionais (BMS) e *stents* farmacológicos (DES) que são amplamente utilizados na prática contemporânea para *stents* mais novos, como DES com polímeros biodegradáveis, DES que são livres de polímeros, DES com novos revestimentos, *stents* de bifurcação, *stents* autoexpansíveis e *stents* biodegradáveis.

1.2 A necessidade de *stents* coronarianos

Não há contestação de que a angioplastia por balão foi um tratamento pioneiro. Entretanto, seu sucesso foi dificultado pelos problemas de fechamento agudo do vaso e reestenose. Esses problemas levaram ao desenvolvimento de um segundo tratamento revolucionário, o *stent* coronário, que foi implantado pela primeira vez por Sousa e cols. em 1987.

Esse primeiro *stent* era de metal e autoexpansível, conhecido como *Wallstent*, e foi capaz de fornecer um suporte que impedia o fechamento agudo do vaso e o recolhimento elástico tardio. Embora esses *stents* iniciais tenham se mostrado eficazes como dispositivos de resgate em casos de ou ameaça de ou fechamento abrupto vasos, reduzindo assim as taxas de cirurgia de revascularização do miocárdio, o desenvolvimento foi prejudicado pelo risco de oclusão trombótica subaguda da artéria coronária que era observado em até 18% dos casos

dentro de 2 semanas após o implante. Esse novo risco específico para o *stent* estimulou o uso de esquemas complexos de anticoagulação que estavam associados a sangramento aumentado e hospitalização prolongada. No geral, as taxas de sucesso e de complicação precoces vistas com esses *stents* coronarianos nem sempre foram competitivas com as da angioplastia por balão de rotina.[7]

A ocorrência de oclusão trombótica subaguda da artéria coronária apesar de anticoagulação ótima fez Colombo e col, em 1995, teorizarem que a chave para evitá-la não era o controle da hemostasia, mas o implante ótimo da prótese, com a normalização da reologia intra*stent* e do afluxo e efluxo sanguíneo. Propuseram, então, os critérios para implante ótimo do *stent*, baseados em estudos com ultrassom intracoronário: expansão completa da prótese, aposição completa à parede vascular e cobertura completa da lesão. Defenderam para isto a técnica da hiperinsuflação, com pressões acima de 20 atmosferas, e advogaram o uso de apenas medicação antiplaquetária após o implante. Obtiveram com essa tática índices de ocorrência de oclusão trombótica de 0,9%, dados estes corroborados pelo grupo francês liderado por Morice e col e Barragan e col. Iniciava-se assim a fase de implante ótimo de *stents*, técnica ainda vigente. Reduziu-se a taxa de complicações vasculares e hemorrágicas de 10 a 15% para 2 a 3%, e a de ocorrência de oclusão trombótica do *stent* de 4 a 10% para 1 a 1,5%, com diminuição dos períodos de internação e de custos.[9]

Paralelamente a isso houve a publicação dos estudos que são marcos divisórios o BENESTENT[10] e o STRESS (*Stent Restenosis Study*),[11] juntamente com evidências indicando que o implante de *stent* era seguro na ausência de terapia anticoagulante com o uso de terapia antiplaquetária dupla (DAPT) e implantação adequada do *stent*, o implante de *stent* coronariano se tornou uma técnica amplamente aceita.

Em 1999, o implante de *stents* coronários foi realizado em 84,2% dos procedimentos de ICP. No entanto, apesar de suas vantagens óbvias, havia problemas associados. Mais notavelmente, e além do risco de trombose subaguda, ao qual já foi aludido, surgiu um problema iatrogênico na forma de hiperplasia neointimal intra*stent*, que consistia no crescimento intra*stent* de tecido cicatricial, resultado da proliferação e migração de células musculares lisas vasculares, e diretamente ligado ao implante de *stents*, resultando em taxas de reestenose de 20% a 30%.[12] Foram as tentativas de minimizar esta hiperplasia neointimal intra*stent* e, com isso, reduzir as taxas de repetição de revascularização, que finalmente levaram ao desenvolvimento de outro tratamento revolucionário: o *stent* farmacológico

(DES). A redução dramática nas taxas de reestenose vistas com o uso dos DES em comparação com BMS tem sido a principal força motriz por trás do crescimento exponencial da ICP como tratamento para pacientes com DAC.[13-17] Após o resultado dos ensaios iniciais com os DES, houve um aumento da confiança na utilização da ICP, de modo que seu uso se expandiu para subconjuntos de lesões que antes só eram considerados adequados para cirurgia de revascularização do miocárdio.[18-20] Isso propiciou uma rápida e inédita aceitação em seu uso, de modo que, até 2005, 80% a 90% de todos os procedimentos de revascularização nos Estados Unidos da América foram realizados com o uso de um DES. Em 2006, foram levantadas preocupações sobre o perfil de segurança desses *stents*, resultando em uma desaceleração mundial imediata em seu uso. Essas preocupações provaram ser um estímulo vital para focar a pesquisa e, em última análise, levar ao desenvolvimento de *stents* mais novos e maior segurança, resultando em uma nova emergência no uso dos DES: os *stents* farmacológicos de segunda geração.[7]

Os *stents* coronarianos iniciais eram compostos de aço inoxidável 316L, uma vez que este material é radiopaco e fornece uma força radial adequada para manter o arcabouço arterial com mínimo recolhimento elástico agudo. Uma alternativa ao aço inoxidável é o cromo-cobalto (CoCr), que exibe uma força radial superior e uma radiotransparência aprimorada, permitindo hastes mais finas do *stent* que podem reduzir a restenose. As hastes mais finas também podem levar a uma redução no perfil do dispositivo e, portanto, uma melhora na capacidade de entrega do *stent* para a lesão-alvo.

Os polímeros duráveis se mostraram um método eficaz de carrear e liberar o fármaco, que é o determinante-chave da eficácia dos DES na prática clínica. Entretanto, uma importante limitação dos mesmos é o efeito indeterminado na cicatrização arterial. Vários estudos identificaram o revestimento de polímero durável como um possível estímulo para reações de hipersensibilidade e inflamação crônica, que pode ter um papel importante no atraso da reestenose e na trombose muito tardia. Os *stents* farmacológicos de segunda geração possuem plataformas com hastes mais finas e polímeros mais biocompatíveis ou polímeros biodegradáveis ou sem polímero, com o objetivo de melhorar o perfil de eficácia e segurança ao diminuir principalmente a taxa de trombose tardia e muito tardia. [21,22]

1.3 Reparação endotelial após intervenções percutâneas nas artérias coronárias

A evolução da cardiologia intervencionista ao longo dos anos trouxe benefícios clínicos inquestionáveis aos pacientes submetidos a procedimentos invasivos. A recanalização de artérias ocluídas e o restabelecimento da perfusão miocárdica normal em vasos com lesões ateroscleróticas graves trazem alívio dos sintomas melhorando a qualidade de vida. No entanto, apesar de todos esses benefícios, a intervenção coronária percutânea está diretamente associada a lesão mecânica endotelial. O dano vascular pode resultar em hiperplasia neointimal, reestenose intra*stent* e trombose do *stent*, geralmente associada a eventos isquêmicos graves. Portanto, o correto entendimento do processo de disfunção endotelial, assim como sua regeneração, causado pelos dispositivos utilizados em procedimentos intervencionistas, torna-se de grande relevância tanto para prevenção quanto para o tratamento de eventos cardíacos adversos.[23]

Como consequência da insuflação em altas pressões de balões e da aposição das estruturas rígidas dos *stents* contra a parede do vaso, ocorre lesão vascular local com perda da camada endotelial, compressão e rompimento da placa aterosclerótica e lacerações que se estendem desde a membrana elástica interna até a camada externa. Ocorre o desencadeamento local e sistêmico de reações inflamatórias, levando a resposta celular com o recrutamento de monócitos e macrófagos, neutrófilos e linfócitos para a parede arterial. A liberação de citocinas e fatores de crescimento estimulam a migração e a proliferação de células musculares lisas desencadeando hiperplasia neointimal (formação da neoíntima) que quando exacerbada resulta em reestenose intra*stent*. Além da neoíntima, outro processo de reestenose após o tratamento percutâneo das lesões ateroscleróticas, é a neoaterosclerose.[23] Ambos são descritos a seguir.

1.3.1 Processo de reparo após angioplastia com balão

Após a lesão das camadas vasculares pela ICP, o processo de reparo depende fundamentalmente do dispositivo utilizado. A angioplastia com balão propicia ganho agudo

de luz modesto e ainda sofre remodelamento negativo importante (Figura 1). A entanto, a hiperplasia neointimal é relativamente pequena, por volte de 0,3 a 0,4 mm. O dano não é limitado à área de contato com o balão, ele também se estende por alguns milímetros em ambas as direções. Esses segmentos da coronária também podem ter remodelamento negativo e hiperplasia neointimal.[23]

O mecanismo da reestenose envolve ativação de células endoteliais, que começam a expressar moléculas de adesão celular como E-selectina e a molécula de adesão celular vascular (VCAM-1). As citocinas também contribuem para o processo, dentre elas a proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e a interleucina 8 (IL-8), que começam a ser expressas horas após a intervenção. Ocorre um infiltrado neutrofílico, quese inicia 30 minutos após, com pico em seis horas. Quanto mais importante esse infiltrado, maior a proliferação de células musculares lisas. Os neutrófilos se concentram principalmente na adventícia, onde promovem síntese de colágeno e contração de tecido. O bloqueio de β2-integrina da subunidade beta do CD18, relacionado ao recrutamento de neutrófilos, reduz a hiperplasia neointimal com balão.[24]

O endotélio se restabelece por contiguidade e pelo implante de células endoteliais progenitoras. Sinais locais como *stromal cell-derived fator-1* (SDF-1) derivados de plaquetas ativadas recrutam células endoteliais progenitoras da medula óssea para sítios com lesão vascular. Em geral, o endotélio se reestabelece em menos de trinta dias. Esse processo de reparo pode não ser completamente benigno e dependendo das condições locais o SDF-1 pode contribuir também com a inflamação local, recrutando monócitos. Além disso, também foi observado que células progenitoras têm capacidade de se diferenciar em células musculares lisas na neoíntima, contribuindo com a resposta reparatória exagerada e a reestenose.[23,24]

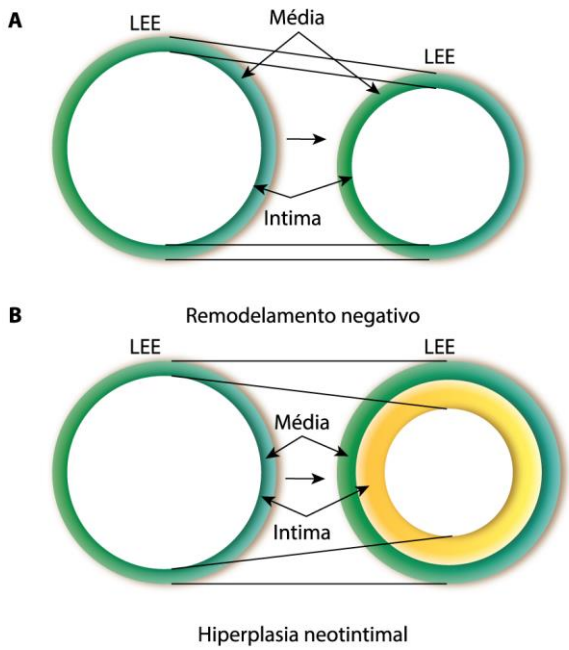


Figura 1- Processos que contribuem para a redução da área luminal após angioplastia. **(A)** Remodelamento negativo com redução da área delimitada pela lâmina elástica externa. **(B)** Hiperplasia neointimal, onde ocorre aumento da área da placa aterosclerótica somada à área da média. O remodelamento é definido pela razão da área delimitada pela lâmina elástica externa (LEE) na lesão e pela área da LEE no tecido sadio adjacente. A hiperplasia neointimal é definida pela área transversal da placa somada às médias delimitadas externamente pela LEE. Adaptado de Marchini JF 2016.[23]

1.3.2 Processo de reparo após angioplastia com *stent*

Por meio de seu arcabouço metálico, o *stent* evita a retração elástica observada com o uso de balão. Dessa forma, obtém ganho agudo superior ao obtido após angioplastia com balão simples. Somado a isso, ocorre menos remodelamento negativo. Porém, a hiperplasia neointimal é muito mais pronunciada que a observada com a angioplastia por balão, e tipicamente ocorre de seis meses a um ano do implante do *stent* convencional, enquanto que os *stents* farmacológicos podem ultrapassar 40 meses com hastes expostas, fenômeno observado principalmente nos DES de primeira geração. Consequentemente, a perda tardia do *stent* é maior que a do balão, atingindo 0,9 a 1 mm com os *stents* convencionais e 0,1 a 0,3 mm com os *stents* farmacológicos. No entanto, o saldo entre o ganho agudo inicial e a perda tardia ainda é favorável ao uso dos *stents* em comparação ao uso do balão.[25]

1.3.2.1 Resposta endotelial aguda pós-*stent*: mecanismos celulares e moleculares

O dano vascular produzido pela ação mecânica da endoprótese e a resposta da parede do vaso à presença das hastes do *stent* desencadeiam reações de acarpetamento trombótico e de inflamação aguda e crônica parietal. A liberação subsequente de citocinas e de fatores de crescimento induz a ativação das células musculares lisas, que passam a migrar e a proliferar na porção subintimal da parede do vaso e a produzir matriz extracelular. O efeito no longo prazo da migração e proliferação das células musculares lisas e da produção de matriz redunda no desenvolvimento da hiperplasia neointimal, que, em associação com a reendotelização, constitui a resposta reparadora ao dano.[25]

1.3.2.2 Formação de trombo

Os estudos em modelos animais sugerem que os eventos mais precoces do processo de reestenose são a ativação e a agregação plaquetárias, como resposta à injúria endotelial causada pelo balão e/ou *stent*. O processo de geração de trombo, no local do dano parietal, é geralmente limitado aos primeiros três dias após a intervenção nos modelos experimentais de reestenose, embora alguns investigadores tenham demonstrado deposição de trombo mural ao longo de todo o primeiro mês pós-intervenção coronária percutânea.[25]

A formação local de trombo e a ativação das plaquetas resultam na liberação de potentes mitógenos e agentes vasoativos, incluindo: fator de crescimento derivado de plaquetas, trombina e tromboxano A2. A trombina induz à produção e à secreção de fator de crescimento derivado de plaquetas (entre outros fatores de crescimento) pelas células musculares lisas, razão pela qual se acredita que a trombina possa indiretamente levar à hiperplasia neointimal.[25]

A geração de trombina *in vivo* é acompanhada pela ativação plaquetária e pela liberação de fatores de crescimento, como a serotonina. *In vitro*, a trombina e a serotonina agem sinergicamente, induzindo à proliferação de células musculares lisas. Postula-se que a

trombina ligada ao trombo possa potencializar o efeito mitogênico da serotonina e manter as células musculares lisas em estado proliferativo por período prolongado.[27]

Essa fase trombótica do reparo vascular após o dano causado pela intervenção coronária percutânea prolonga-se tanto pela aplicação de irradiação endovascular (braquiterapia) como pelas terapêuticas farmacológicas locais (*stents* farmacológicos), que retardam a endotelização e podem ser responsáveis pela trombose do local tratado, caso não sejam tomados os devidos cuidados para que essa complicação seja evitada.[25]

1.3.2.3 Inflamação

Células inflamatórias agudas e crônicas participam do processo de reparo vascular pós-intervenção coronária percutânea. Em modelos experimentais, os neutrófilos infiltram-se na parede vascular no local do dano já nas primeiras 24 horas. A essa fase aguda da inflamação seguem-se a adesão e a infiltração de monócitos. A extensão do infiltrado celular inflamatório agudo é dependente do substrato arterial e do grau do dano provocado pelo instrumental. Farb e colaboradores identificaram que a presença de um núcleo lipídico e de dano arterial profundo está significativamente mais associada à maior infiltrado agudo de células inflamatórias que a ausência de dano vascular ou uma placa apenas fibrocelular subjacente. Células inflamatórias crônicas também contribuem para a liberação de citocinas, como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), e outras substâncias parácrinas, que estimulam a migração e proliferação das células musculares lisas. Além disso, a reestenose intra*stent* é acompanhada de infiltrado de leucócitos, histiócitos e células gigantes, ao redor das hastes dos *stents*, o que contribui adicionalmente para crescimento das células musculares lisas. A presença ubíqua dessas células inflamatórias crônicas, em artérias coronárias humanas após o implante de *stent*, documenta a importância da resposta do hospedeiro ao corpo estranho.[25]

1.3.2.4 Proliferação das Células Musculares Lisas

O crescimento das células musculares lisas é um importante componente da fisiopatologia de praticamente todas as formas de doença vascular, incluindo a aterosclerose, a hipertensão arterial e a vasculopatia pós-transplante cardíaco. Cada vez mais, as terapêuticas intervencionistas, sejam percutâneas ou cirúrgicas, têm sido indicadas para o tratamento da doença vascular oclusiva. O trauma mecânico induzido pelo instrumental é um determinante importante no desencadeamento da resposta proliferativa pós-dano,[29] pois é o dano mecânico associado a esses procedimentos induz à migração das células musculares lisas da média para íntima, onde elas proliferam, transformando-se em células secretoras e sintetizando matriz extracular, o que contribui para o crescimento da lesão.[25,27]

As células musculares lisas ativadas são capazes de liberar vários fatores de crescimento (fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento de fibroblastos, angiotensina II) e agentes quimiotáticos, que participam do processo proliferativo. Adicionalmente, a perda de fatores protetores produzidos pelo endotélio (óxido nítrico e prostaciclina) pode acelerar a migração e a proliferação de células musculares lisas.[24]

1.3.2.5 Matriz Extracelular

É sabido atualmente que a matriz extracelular não tem somente papel inerte e estabilizador estrutural, mas contribui para a resposta celular vascular a vários estímulos mecânicos e bioquímicos. Muitos dos componentes extracelulares transmitem seus sinais por meio de receptores especializados da superfície celular, chamados integrinas, e controlam uma variedade de funções celulares, como a migração e a proliferação em resposta aos mitógenos.[25]

Essa compreensão atual e mais precisa da biologia vascular da reestenose, com a identificação dos eventos moleculares responsáveis pela proliferação das células musculares

lisas, mediada pelas citocinas e por fatores de crescimento, possibilitou a seleção racional dos candidatos terapêuticos potenciais e de sua associação, para um tratamento farmacológico local, tendo como plataforma de liberação o próprio *stent* coronário, que inibiria a hiperplasia neointimal pela ação antiproliferativa de um medicamento potente. A Figura 2 representa os eventos sucessivos no desenvolvimento da reestenose.[24,28]

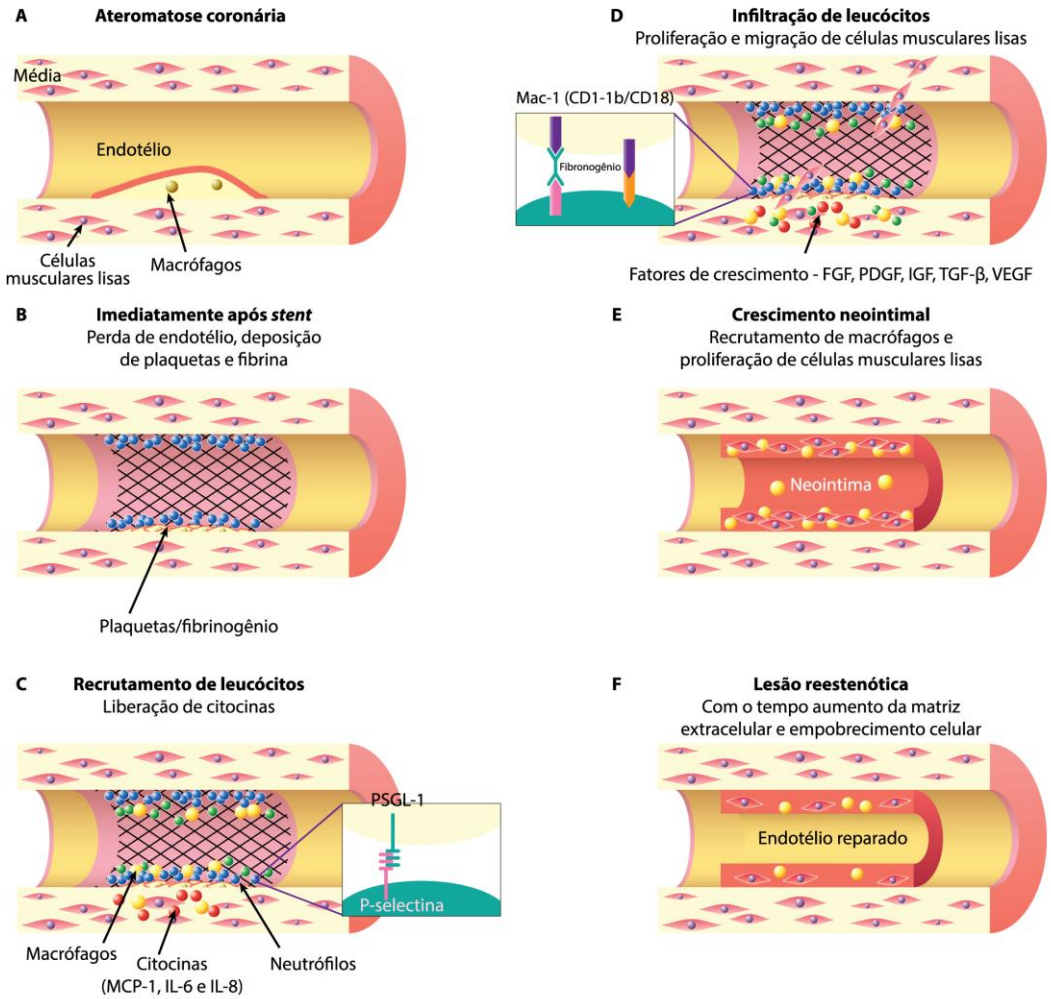


Figura 2- Eventos sucessivos no desenvolvimento da reestenose. (A) Lesão coronariana aterosclerótica pré-intervenção. (B) Resultado imediato após implante de *stent* com perda do endotélio e deposição de plaquetas e fibrina. (C e D) Recrutamento e infiltração leucocitária, proliferação e migração de CML nos dias após a lesão. (E) Espessamento neointimal nas semanas após a lesão com continuada proliferação de CML e recrutamento de monócitos. (F) A longo prazo a neoíntima se converte de uma placa rica em células para uma placa rica em matriz celular e pobre em células. CML: células musculares lisas. Adaptado de Welt FG, Rogres C. 2002.[28]

1.4 Reestenose intra*stent*

A reestenose é definida angiograficamente como a presença de obstrução coronária > 50% dentro do *stent* ou dentro do segmento que compreende 5 mm proximal ou distal nas margens do *stent*, e constitui-se na resposta vascular ao dano instrumental provocado durante a revascularização. A reestenose intra*stent* manifesta-se usualmente com a recorrência gradual dos sintomas de isquemia miocárdica, dentro dos primeiros 6 a 12 meses após a intervenção.[29]

O reinício dos sintomas muito precocemente (< 1 mês pós-*stent*) após a intervenção sugere resultados imperfeitos (má expansão da prótese, dissecção nas bordas dos *stents*, ausência de fluxo final TIMI III [*Thrombolysis In Myocardial Infarction* ou TIMI *Study Group*]) e revascularização incompleta ou, quando mais tardio (> 1 ano), sugere progressão de doença coronária.[25]

A incidência da reestenose varia de 20% a 40% nos pacientes tratados com *stents* convencionais, na dependência de fatores clínicos, angiográficos e predisposição genética. Embora a reestenose intra*stent* apresente-se mais comumente com angina estável e isquemia induzida pelo exercício, cerca de 10% dos casos de reestenose após *stents* convencionais apresentam-se como síndrome coronária aguda com ou sem supradesnivelamento do segmento ST, e até 26% dos pacientes têm como manifestação angina instável requerendo internação, denotando resposta vascular com potencial de gravidade e que necessita de prevenção efetiva.[29]

Embora tenha ocorrido significativa redução nas taxas de reestenose após a introdução de *stents* com liberação de medicamentos, esse fenômeno ainda pode ocorrer em determinados subgrupos específicos em alguma proporção. Nos *stents* farmacológicos de primeira geração as taxas de restenose descritas são aproximadamente 8% a 10%. As novas plataformas de *stents* farmacológicos, chamados de *stents* farmacológicos de segunda geração, possuem um perfil de segurança e eficácia melhorados, com taxas de revascularização da lesão alvo de 4% a 6% .[30,31]

As causas de reestenose dos *stents* após a implantação são multifatoriais. Em adição à excessiva hiperplasia neointimal tardia, a reestenose seja dos *stents* convencionais, seja dos farmacológicos, pode ser causada por subexpansão do *stents*, dissecção de bordas, doença residual não tratada, falha na cobertura total da lesão e fratura das hastes. Alguns estudos apontaram uma associação entre alergia ao níquel e reestenose após implante de *stents* convencionais ou farmacológicos. Mutações genéticas nos genes que codificam mTOR ou polimorfimos nos genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo do paclitaxel pode resultar em resistência ao sirolimo e paclitaxel, respectivamente. Inflamação excessiva aos polímeros dos *stents* de primeira geração (especificamente reação eosinofílica ao paclitaxel e reação granulomatosa ao sirolimo) também pode provocar reestenose tardia.[29]

Vários estudos demonstraram que os principais fatores determinantes de reestenose intra*stent* após implante dos *stents* convencionais é a presença de diabetes mellitus, vaso abordado fino e lesões longas. Outros fatores associados com reestenose são o tratamento de lesões ostiais, lesões calcificadas, lesões de bifurcação requerendo stens no vaso principal e no ramo lateral, lesões de oclusão total crônica e lesões em enxertos venosos. Os mesmos fatores estão associados com taxas relativamente maiores de reestenose nos *stents* farmacológicos, embora numa escala absoluta bem menor por causa do intenso efeito dessas endopróteses eluidoras de fármacos em limitar a resposta hiperplásica neointimal após o implante.[29]

A resposta vascular após a intervenção coronária constitui-se numa sequência de eventos complexos, dependente não só de aspectos clínicos dos pacientes tratados, mas também do instrumental empregado (balões, *stents*), da técnica utilizada (pressão deliberação das próteses, cobertura total da lesão, perfeita expansão do *stent*) e das características das lesões (fibróticas, calcificadas, elásticas). De forma didática, é atribuída a três processos, responsáveis pela hiperplasia neointimal reparativa: 1) alterações agudas e crônicas na geometria do vaso (retração elástica aguda e remodelamento negativo cicatricial e tardio); 2) migração e proliferação de células musculares lisas; e 3) produção excessiva de matriz extracelular.[25]

1.4.1 Alterações agudas e crônicas na geometria do vaso

O remodelamento negativo agudo, também chamado de retração elástica do vaso, era mais frequentemente observado na era da angioplastia apenas com balão, principalmente nas lesões calcificadas e de localização ostial. Depende das propriedades elásticas da parede do vaso no segmento tratado e pode ser definida como a diferença entre o diâmetro máximo de insuflação do balão e o diâmetro do vaso após a insuflação. Ocorre precocemente após a angioplastia, nas primeiras 24 horas após o procedimento, e deve ser diferenciado do remodelamento negativo cicatricial tardio.

O remodelamento negativo crônico (remodelamento negativo cicatricial tardio) ocorre numa fase mais tardia após o procedimento. Estudos histopatológicos de fragmentos vasculares obtidos em necropsias demonstram resposta predominantemente fibromuscular nos sítios tratados por angioplastia com balão, em decorrência da migração e da proliferação de células musculares lisas. Esse mecanismo constitui-se o principal processo determinante da reestenose após angioplastia com balão, tendo sido praticamente abolido com a introdução dos *stents* metálicos.[24,25]

1.4.2 Migração de células musculares lisas e produção excessiva de matriz extracelular (hiperplasia neointimal)

Estudos com ultrassom intracoronário trouxeram grande contribuição ao entendimento da reestenose após intervenção coronária percutânea, por demonstrarem que, diferentemente da angioplastia com balão, os *stents* virtualmente eliminaram a retração elástica e o remodelamento negativo tardio do vaso, sendo a reestenose após implante dos *stents* exclusivamente decorrente da formação de tecido neointimal[31].

Mais recentemente, com a introdução dos *stents* farmacológicos, a formação desse tecido neointimal foi significativamente reduzida no interior dessas endopróteses, resultando

na quase total abolição da reestenose intra*stent*, até então como já descrito anteriormente, a principal limitação dos procedimentos percutâneos.

1.5 Neoaterosclerose

Além da neoíntima, outro processo também responsável pela reestenose é a neoaterosclerose, termo criado a partir de exames de imagem, aterectomia e autópsia realizados após implante de *stents* farmacológicos.[32] A neoaterosclerose é uma forma de aterosclerose acelerada que ocorre dentro do segmento que recebeu o *stent* na árvore arterial coronariana após a implantação do dispositivo. Essa proliferação da neoíntima com formação de nova placa aterosclerótica dentro das hastes do *stent* sem reendotelização pode provocar oclusão trombótica e causar síndrome coronariana aguda.[33]

Histologicamente, é semelhante ao processo de ateromatose inicial, mas ocorre tardiamente após a hiperplasia neointimal. Caracteriza-se por um grupamento de macrófagos cobertos por uma camada de lipídeos. Esses podem ser cobertos ou não por tecido necrótico ou calcificado. Esse acúmulo de macrófagos pode progredir para a formação de fibroateroma, podendo ser observado na luz arterial ou nas camadas mais profundas da neoíntima. O núcleo necrótico da placa neoaterosclerótica contém debris celulares e ocasionalmente apresenta processos hemorrágicos com depósito de fibrina, em geral com origem em fissuras e rupturas da face luminal. Ademais, infiltrações adicionais de macrófagos na neoíntima resultam em formação do ateroma de capa fina, que geralmente ocasiona ruptura de placas localizadas dentro dos *stents*. Calcificações também podem ser observadas na neoíntima, especialmente em pacientes submetidos a implante de *stents* com maior tempo de evolução.[23]

A etiologia da neoaterosclerose é multifatorial, e caracteriza-se pela proliferação de células musculares lisas com a presença de lipídeos ou calcificações no segmento do vaso onde foi realizado o implante do *stent*, usualmente de forma tardia (> 12 meses) ou muito tardia (> 36 meses) após o implante do *stent* farmacológico, promovendo a falência do mesmo. Mecanisticamente, a hipótese é que as drogas antiproliferativas e imunossupressores

liberadas pelos *stents* farmacológicos evitam a reestenose, mas causam uma cobertura endotelial incompleta que dá origem a uma acelerada migração de lipoproteínas de baixa densidade, células espumosas e células inflamatórias dentro do *stent* criando uma lesão neoaterosclerótica. Fatores tais como a endotelização retardada, micro-hemorragias ao redor das hastes, tipo de polímero, inflamação crônica, reação de hipersensibilidade localizada e disfunção endotelial, têm putativo papel na patogêncese da neoaterosclerose.[33]

Os *stents* convencionais também podem sofrer o processo de neoaterosclerose, porém de uma forma muito mais tardia (> 4 anos) quando comparados aos *stents* farmacológicos. Porém, o principal mecanismo de falência dos *stents* convencionais é a reestenose, e o mecanismo primário é a proliferação de células musculares lisas. Vários estudos angiográficos e de ultrasson intra-coronário têm mostrado que os *stents* convencionais têm um espessamento neointimal precoce, mas depois de um ano podem experimentar um aumento no tamanho do lúmen. Inversamente, os *stents* farmacológicos têm menos reestenose nos primeiros meses, mas depois apresentam mais perda de área luminal e revascularização tardia do vaso (TVR) devido à neoaterosclerose. Esse fenômeno conhecido como *late catch up* é atribuído à neoaterosclerose, foi originalmente pensado como decorrente da inflamação dos primeiros polímeros DES. No entanto, a neoaterosclerose também tem sido observada em *stents* de segunda geração com hastes mais finas e diferentes polímeros[32].

Nakazawa e colaboradores revisaram casos de autópsia do registro de endoprótese da CVPath (Gaithersburg, Maryland) e compararam 66 lesões de *stents* farmacológicos com 77 lesões de *stents* convencionais, em que a alteração neoaterosclerótica incluindo a presença de macrófagos espumosos carregados de lipídios, foi mais frequentemente identificada nas lesões dos *stents* farmacológicos, ocorrendo de forma mais precoce (420 dias [361 a 683 dias] nos *stents* farmacológicos e 2.160 dias [1.800 a 2.880 dias]).[34]

1.6 Trombose de *stents*

Na fase inicial da experiência com os *stents*, eram observadas taxas de trombose de até 24% ao final de seis meses. Em decorrência da trombose, eram prescritos anticoagulantes em associação aos antiagregantes plaquetários, e os períodos de internação eram prolongados, o que dificultava a aplicabilidade clínica desses instrumentais. Além disso, as consequências clínicas para aqueles que sofrem trombose de *stent* são usualmente graves, com ocorrência de infarto do miocárdio em 80% dos casos e mortalidade no curto prazo de 20% a 25%. Aproximadamente 20% dos pacientes com a primeira trombose de *stent* experimentam um episódio recorrente dentro de dois anos. Com a evolução dos conhecimentos fisiopatológicos e o aprimoramento técnico, a trombose de *stents* foi reduzida a < 1,5% dentro do primeiro ano, tanto para os *stents* convencionais como farmacológicos.[29,35]

A classificação de trombose dos *stents* mias amplamente aceita é a do *Academic Research Consortium* (ARC), que classifica como *definitiva* a trombose que ocorre e vigência de síndrome coronária aguda e que possui evidência angiográfica ou na autópsia de trombo ou oclusão dentro ou adjacente a um *stent*; *provável* é aquela que ocorre quando há um episódio de óbito 30 dias após o implante de *stent* ou infarto agudo do miocárdio envolvendo o território da artéria tratada, porém sem confirmação angiográfica; e *possível* quando ocorre um óbito sem etiologia inexplicável após 30 dias do procedimento. Com relação ao período temporal entre o implante do *stent* e a trombose, temos a seguinte classificação: *aguda*, quando ocorre dentro das primeiras 24 horas (exceto os eventos que ocorrem dentro da sala de hemodinâmica); *subaguda:* é aquela que ocorre após as primeiras 24 horas até 30 dias; *precoce*: dentro dos primeiros 30 dias; *tardia:* de 30 dias a um ano e *muito tardia*: após um ano.[29]

A trombose do *stent* ainda pode ser classificada como *primária* quando está diretamente relacionada ao implante do *stent*, ou *secundária* se ocorre no sítio do *stent* após um procedimento de revascularização da lesão-alvo. A trombose primária do *stent* após implante de *stent* convencional tipicamente ocorre nos primeiros trinta dias após o implante, embora em raros casos pode ocorrer depois desse período. Em contraste, a trombose primária

após implante dos *stents* farmacológicos ocorre anos após, com taxa anual de incidência de 0,2% a 0,3% em pacientes submetidos à angioplastia de lesões não complexas e 0,4% a 0,6% naqueles submetidos ao procedimento com tratamento de lesões mais complexas, principalmente com os *stents* farmacológicos de primeira geração.[29,36]

Seja qual for o tipo de *stent*, a causa da trombose é multifatorial, e incluiu fatores relacionados ao paciente, ao procedimento (incluindo a escolha do *stent*) e pós-procedimento (incluindo tipo e duração da antiagregação plaquetária). A trombose do *stent* ocorre mais frequentemente em pacientes portadores de lesões complexas, especialmente em pacientes com síndrome coronária aguda e lesões trombóticas, diabetes, insuficiência renal, doença difusa, vasos finos e lesões de bifurcação requerendo múltiplos *stents*.[37,38] Dentre os fatores associados com trombose do *stent* relacionados ao procedimento temos o tipo de *stent* selecionado (convencional ou farmacológico), bem como se houve uma boa expansão da prótese com aposição de todas as hastes à parede luminal e se foi implantado num vaso com escoamento suficiente para permitir o adequado fluxo através do *stent*.[29] Propriedades biológicas dos *stents* farmacológicos também têm sido apontadas como fatores adicionais para a ocorrência de trombose, a saber: indução de fatores teciduais trombogênicos pelos polímeros carreadores e fármacos adjuvantes, retardo na endotelização do segmento tratado, reações de hipersensibilidade com remodelamento positivo do vaso e má-aposição das hastes e disfunção endotelial em segmentos adjacentes ao *stent*.[25]

Nos primeiros anos após a introdução dos *stents* farmacológicos, os de primeira geração, surgiram novos questionamentos quanto à maior incidência de trombose. Embora eles determinem significativa redução nas taxas de reestenose e de nova resvascularização do vaso-alvo, a ocorrência de trombose dos *stents* não foi reduzida. Estudos e metanálises evidenciaram que taxas de trombose muito tardia, antes raras com os *stents* convencionais, passaram a ser identificadas em um número pequeno de pacientes. O risco para trombose tardia de *stent* dos farmacológicos de primeira geração comprado aos convencionais, demonstrou ser pequeno, porém contínuo. Achados patológicos de pacientes com trombose de *stents* farmacológicos de primeira geração confirmaram que ocorria um atraso na cicatrização arterial, reendotelização incompleta e persis*tent*e depósito de fibrina quando comparado aos convencionais. O uso de polímeros duráveis, a espessura das hastes dos

stents, a dose dos fármacos antiproliferativos e a cinética de liberação da droga tem sido implicado como fatores contribuintes importantes nesses eventos adversos tardios. Os *stents* farmacológicos de segunda geração foram desenvolvidos com maior biocompatibilidade dos polímeros, seja os duráveis e os biodegradáveis, espessuras das hastes mais finas e a cinética de liberação da droga foi aperfeiçoada, o que claramente melhorou o perfil de eficácia e segurança dos *stents* farmacológicos. Tada e colaboradores publicaram estudo com 18.334 pacientes com 3 anos de seguimento após angioplastia onde evidenciaram taxas de trombose definitiva entre dos *stents* convencionais de 1,5%, nos farmacológicos de primeira geração de 2,2% e nos farmacológicos de segunda geração de 1%.[39]

1.7 A via de sinalização do mTOR

A quinase serina/treonina mTOR tem um papel central na regulação dos processos celulares críticos tais como crescimento, proliferação, organização do citoesqueleto, transcrição, síntese de proteínas e biogênese ribossomal.[40,41] A ligação dos fatores de crescimento e dos nutrientes, aminoácidos e glicose, com os receptores de superfície celular estimulam a via de sinalização da mTOR, ilustratada na Figura 3. Após a ligação dos fatores de crescimento com os receptores de membrana, a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) é estimulada e converte o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) em fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3), a qual localiza PKB na membrana onde ela é ativada pela proteína 3-fosfoinositida (PDK1) e mTORC2 (complexo mTOR 2). A ativação da proteína quinase B (PKB) fosforila e inibe o complexo esclerose tuberosa (TSC1/2). Rehb, é uma pequena GTPase que é inibida pelo TSC2, modula positivamente a atividade do mTORC1 (complexo mTOR 1), que por sua vez fosforila a S6 quinase e a proteína de ligação 1 ao fator de iniciação da translação eucariótica (4EBP1), resultando em um aumento da translação do RNA mensageiro. Os aminoácidos estimulam o mTORC1 através das proteínas Rag A/B e C/D. Em situações de baixa energia, a razão AMP/ATP aumenta e ativa a AMP quinase (AMPK), que fosforila e ativa o complexo TSC1/2, resultando na inibição da mTORC1. A atividade da mTORC2 é mediada por vias predominantemente desconhecidas. O mTORC2 fosforila e ativa a PKB, a proteína quinase

soro- e glicocorticoide-induzida 1 (SGK1) e proteína quinase C (PKC), que por sua vez estimulam o transporte de íons e o citoesqueleto. [42,43]

Estruturalmente, o mTOR existe em duas formas proteicas funcionalmente distintas, mTORC1 e o mTORC2. São diferentemente regulados e têm substratos dissemelhantes. Embora eles compartilham alguns componentes centrais tais como mTOR, a mLST8 e proteína de interação a mTOR contendo o domínio DEP (DEPTOR), eles também contêm proteínas adicionais diferentes que os define.[44, 45]

O mTORC1 estimula o crescimento e proliferação celulares por aumentar a translação celular dependente da membrana. É composto pelo mTOR, uma proteína de su*stent*ação RAPTOR (*regulatory associated protein of mTOR*), a mLST8 e o recentemente identificado DEPTOR[18,19 45,46]. O RAPTOR serve como plataforma ligante de ambos mTORs e efetores da inibição, é a subunidade catalítica do mTOR, e consi*stent*e com seu papel de regulador chave do metabolismo, proliferação, crescimento celulares, a atividade do mTORC1 é regulada por nutrientes, fatores de crescimento e níveis celulares de energia. Os alvos mais bem caracterizados do mTORC1 são as proteínas ligantes eIF4E (4E-BPs) e as proteínas S6 quinase (S6K), ambas possuem papel importante na regulação da síntese de proteínas[16,20 43,47]. Acredita-se que as proteínas S6 quinases controlam a translação por modular a atividade de seus alvos incluindo a proteína ribossomal S6, o fator 4B inicializador eucariótico (eIF4B) e proteínas programadoras da morte celular (PDCD4). As proteínas 4E-BPs são uma família de pequeno peso molecular repressoras de translação que incluem 4E-BP1, 4E-BP2 e 4E-BP3. Essas proteínas suprimem a translação do subconjunto de transcritos referidos como “RNAm sensível à eIF4E” por competir com eIF4G pela ligação no eIF4E e assim prevenir a formação do complexo de iniciação eIF4F. Depois de sua ativação, a mTORC1 fosforila Thr37 e Thr46 em 4E-BP1, que atua como um evento primitivo essencial para a fosforilação da Ser65 e Thr70 levando a liberação de eIF4E e subsequente montagem do complexo eIF4F. Acredita-se também que mTORC1 modula a síntese de proteínas indiretamente através da ativação do fator de iniciação da transcrição dependente do crescimento (TIF-IA) e consequente estimulação da transcrição ribossomal de RNA e biogênese ribossomal, bem como através da fosforilação de eIF4G. O mTORC1 também inibe a autofagia, um processo catabólico evolutivamente conservado desencadeado por privação de nutrientes no qual organelas celulares e proteínas são degredadas pelo lisossoma. Esse processo é conseguido através da fosforilação e subsequente repressão dos fatores promotores de autofagia unc-51-like

quinase 1 (ULK1) e do gene 13 relacionado a autofagia (ATG13). O mTORC1 também tem um papel importante na regulação da síntese de lipídeos e no metabolismo mitocondrial. [46,47,48]

O mTORC2 tem um importante papel na sobrevida da célula e organização do citoesqueleto. É constituído por alguns componentes do mTORC1 como mTOR, mLST8, DEPTOR e possui como componente essencial a proteína Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), que é requerida em ambos, complexo de formação do mTOR e atividade quinase. É constituído ainda por outras proteínas que são a mSIN1 (*mammalian stress-actived protein kinase* [SAPT]) e PRR5 (também conhecida como proptor). Não está bem esclarecido até o presente momento como a atividade do mTORC2 é regulada, mas existe evidência que pode ser estimulada por aminoácidos e fatores de crescimento. O mTORC2 fosforila a proteína quinase C (PKC)-α e proteína quinase B (PKB), ambas são quinases serina/treonina que têm função na regulação de inúmeros processos celulares chaves, como apoptose, proliferação, motilidade e diferenciação. Fosforila ainda a proteína quinase 1 soro- e glicocorticoide-induzida (SGK1), que tem uma importante função no controle e transporte de íons. [43, 49]

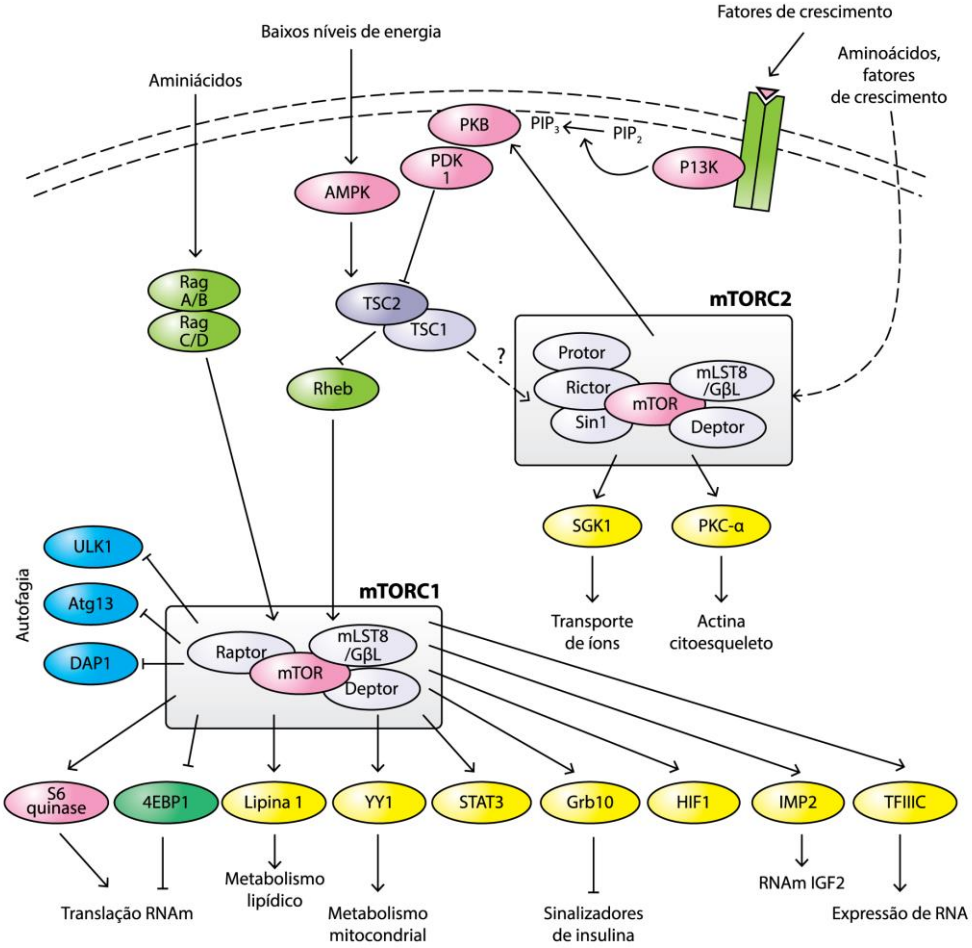


Figura 3- Vias de sinalização do mTOR. Após a estimulação pela insulina e outros fatores de crescimento, a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) converte fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) em 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol (PIP3), que localiza a PKB na membrana onde é depositada. Ativado por PDK1 e mTORC2. A PKB ativada fosforila e inibe o complexo da esclerose tuberosa (TSC1/2). A Rheb, uma pequena GTPase que é inibida pelo TSC2, modula positivamente a atividade da mTORC1. O mTORC1 fosforila S6 quinase 1/2 e 4EBP1, resultando no aumento da tradução do mRNA. A suficiência de aminoácidos ativa mTORC1 via Rag A/B e C/D. Sob condições de baixa energia, a relação AMP-para-ATP aumenta e ativa a AMP quinase (AMPK), que fosforila e ativa o complexo TSC1/2, resultando na inibição da mTORC1. A atividade do mTORC2 é mediada por vias predominantemente desconhecidas. O mTORC2 fosforila e ativa a PKB, a proteína quinase 1 (SGK1) induzida por soro e glicocorticóides e a PKC. Setas, efeitos estimulantes; bloqueio final, efeitos inibitórios; linhas sólidas, efeitos diretos; linhas tracejadas, efeitos indiretos. Atg13, proteína 13 relacionada à autofagia; DAP1, proteína associada à morte 1; Deptor: domínio DEP contendo a proteína de interação ao mTOR; 4EBP, proteína de ligação eIF4E; GβL-G: proteína do tipo subunidade da proteína beta; HIF1: fator 1 induzido por hipóxia; IMP2: proteína de ligação a RNAm do factor de crescimento 2 semelhante à insulina; mLST8: mamífero letal com Sec13 proteína 8; PDK1: proteína quinase 1 dependente de fosfoinositídeo; Protor: proteína observada com Rictor; Raptor: proteína associada reguladora da mTOR; Rictor: companheiro insensível à rapamicina de mTOR; Sin1: proteína de interação com a proteína-quinase ativada por estresse 1; TFIIIC: fator de transcrição 3C; ULK1: quinase 1 do tipo Unc-51. Adaptado de Barlow AD *et al.* 2013.[43]

1.7.1 Inibidores do mTOR: sirolimo (rapamicina) e seus análogos

Os inibidores do mTOR (*mammalian target of rapamycin)* são lactonas macrocíclicas com diversas aplicações na prática clínica diária por possuírem efeitos antifúngicos, imunossupressores e propriedades antiproliferativas. O principal representante desse grupo de fármacos é a rapamicina ou sirolimo, produzida pelo *Streptomyces hygroscopicus,* um actinomiceto isolado em 1975 do solo de Rapa-Nui na Ilha de Páscoa.[50,51] Outros representantes dessa classe de drogas utilizadas nos *stents* farmacológicos são everolimo, biolimo-A9, tacrolimo e zotarolimo.

Em 1991, o alvo da rapamicina (*target of rapamycin* - TOR) foi descoberto em leveduras. O único homólogo em mamíferos conhecido foi subsequentemente clonado e chamado mTOR (*mammalian* TOR). O mTOR é uma proteína-quinase relacionada a fosfoinositidil 3-quinase e controla o crescimento celular em resposta a nutrientes e fatores de crescimento.[52]

Conforme descrito previamente, os *stents* eluídores de fármacos são capazes de reduzir de forma importante a reação de hiperplasia intimal e consequentemente a reestenose após o implante desses dipositivos para tratamento das lesões ateroscleróticas coronarianas. Duas classes de fármacos tiveram sucesso para esse papel, o paclitaxel e a rapamicina (ou sirolimo) e seus análogos (rapalogos). A rapamicina ou sirolimo, originalmente desenvolvida como um antifúngico, foi primeiramente aprovada como imunossupressor para pacientes submetidos à transplante de órgãos sólidos, seguido pelo seu uso em *stents* coronarianos para prevenção da reestenose. O sirolimo e drogas análogas, atuam por se ligar à proteína citosólica de ligação 12, conhecida como proteína ligante FK 506 do kDa (FKBP-12), e o heterodímero resultante se liga à mTOR impedindo sua ativação[53] (Figura 4).

A mTOR é das famílias das quinases relacionadas a PI3K que participa de passos críticos do ciclo celular, sendo uma quinase chave do metabolismo, crescimento e proliferação celular. O resultado é a parada do ciclo celular entre a transição da fase G1 para S[1]. Afeta as células musculares lisas, monócitos e macrófagos, reduzindo inflamação, migração das células

musculares lisas, síntese de colágeno e expressão das citocinas. Inibem também as células endoteliais e células endoteliais progenitoras.[45,52]

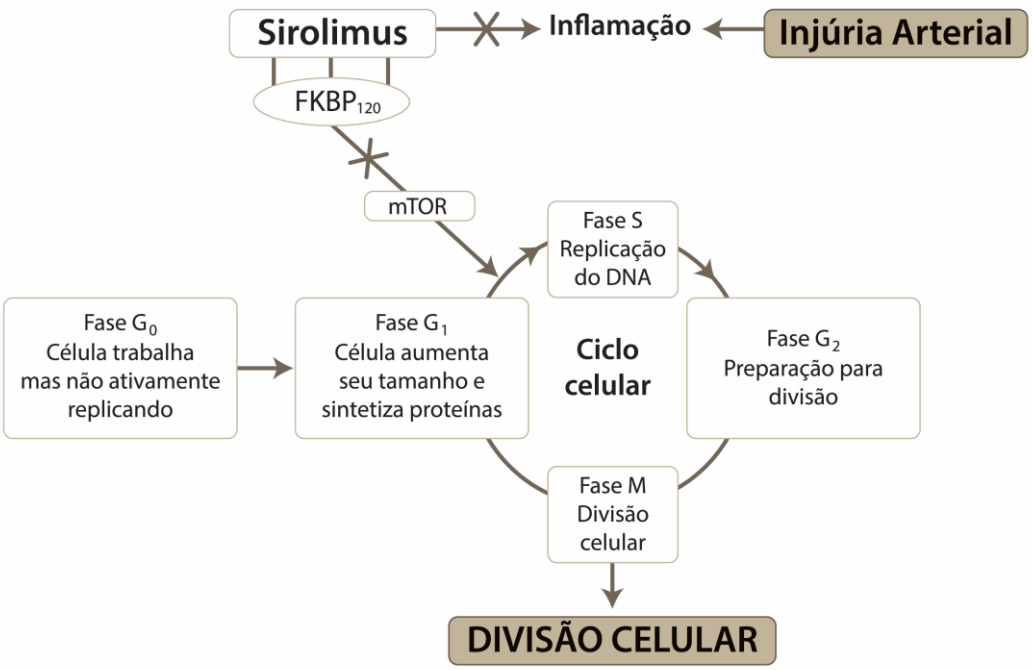


Figura 4- Mecanismo de ação do sirolimo: o sirolimo se liga à proteína de ligação FK 12 (FKBP12), o complexo resultante inibe a via do mTOR, causando subsequentemente a regulação negativa do inibidor da cinase da divisão celular p27(kip1), inibindo desse modo a divisão celular entre as fases G1 e S do ciclo celular. O sirolimo tem ampla faixa de doses, é citostático em oposição a citotóxico e possui propriedades antiinflamatórias adicionais por meio de sua inibição da interleucina-2, que reduz a ativação de células T e B. DNA: ácido desoxirribonucleico.

1.8 Hipótese

A análise do comportamento das células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana tratadas com *stent* convencional comparado com farmacológico nos modelos de monocultura e cocultura com a presença do soro rico em plaquetas à 10% poderia nos revelar um mecanismo ou alvo molecular diferente dos descritos até o momento para ajudar a aprimorar os *stents* farmacológicos aumentando seu perfil de eficácia e desta forma os benefícios clínicos da prevenção da reestenose poderiam alcançar impacto na mortalidade?

2 Objetivos

2.1 Objetivo primário

Avaliar as alterações causadas pelos *stents* convencionais e farmacológicos nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em cocultura na presença e na ausência do soro rico em plaquetas à 10%.

2.2 Objetivos secundários

Análise das seguintes variáveis nos diferentes modelos de cultura que foram tratados com *stents* convencionais e farmacológicos:

a) Determinação da produção de peróxidos lipídicos;

b) Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo;

c) Análise da expressão dos marcadores de controle de proliferação e inflamatórios.

3 Métodos

3.1 Delineamento do estudo

O presente estudo foi realizado com duas linhagens celulares, as células endoteliais humanas (HUVEC) e as células musculares lisas de aorta humana (VSMC) em monocultura e em cocultura (na presença ou ausência de 10% de soro rico em plaquetas), na presença de *stent* convencional (BMS) ou *stent* farmacológico (DES) e nos períodos de tempo de 24 e 48 horas. Vide Figura 5.

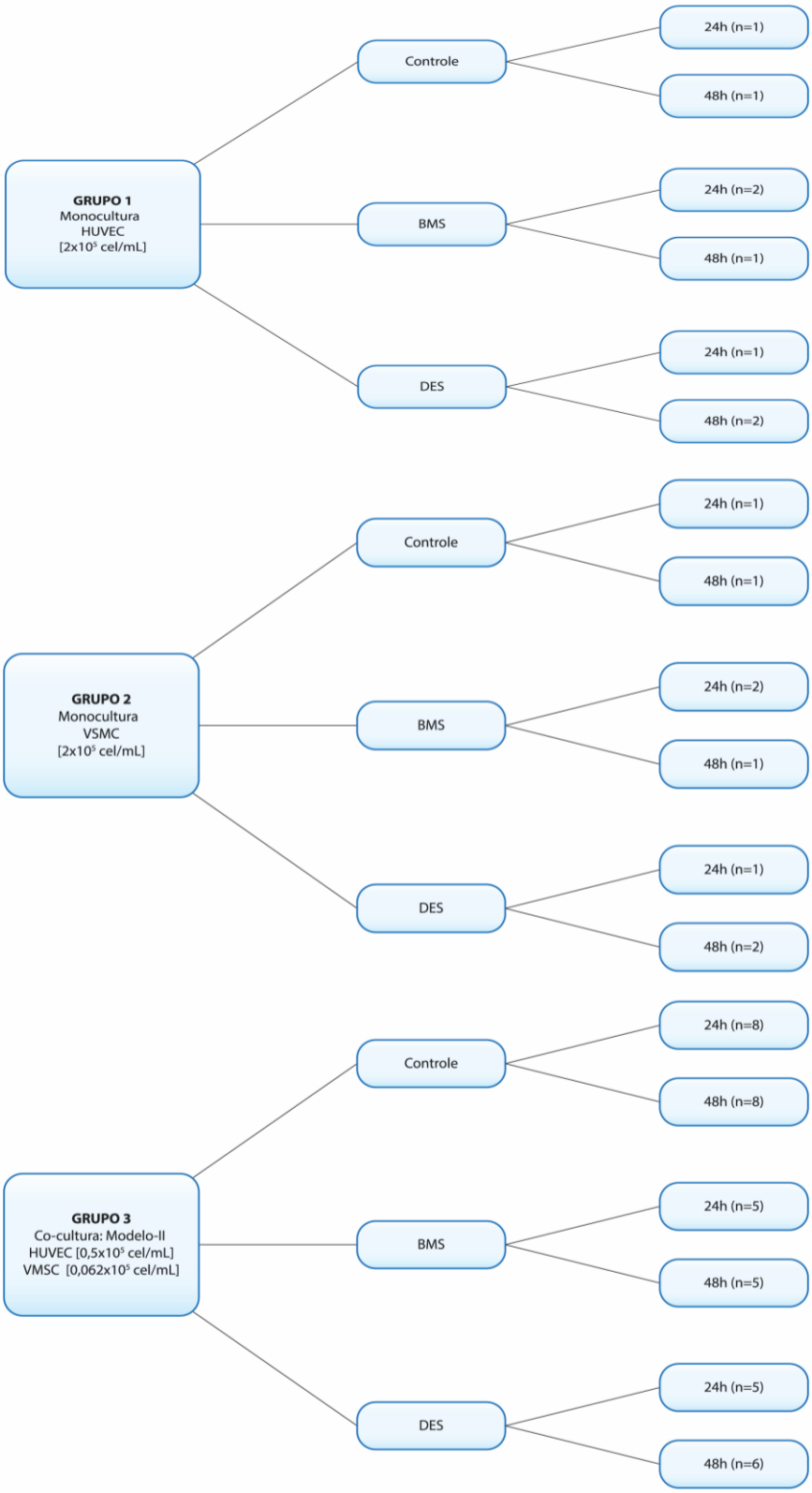


Figura 5- Delineamento do estudo. HUVEC: células endoteliais humanas; VSMC: células musculares lisas de aorta humana; BMS: *stent* convencional; DES: *stent* farmacológico; cel/mL: células por mililitro; h: horas e n= número da amostra. **Continua...**

...Continuação:

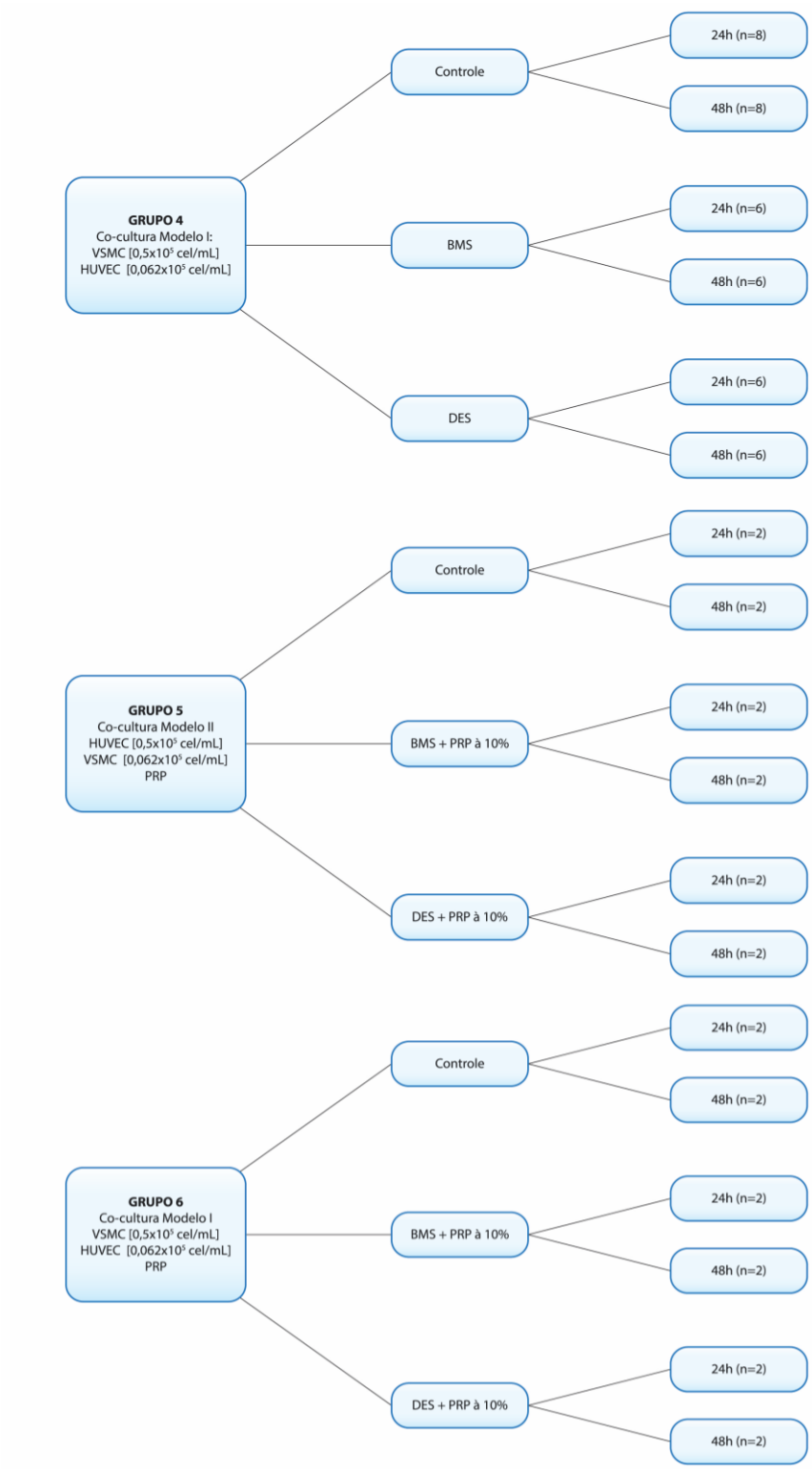


Figura 5- Delineamento do estudo. HUVEC: células endoteliais humanas; VSMC: células musculares lisas de aorta humana; BMS: *stent* convencional; DES: *stent* farmacológico; cel/mL: células por mililitro; h: horas e n= número da amostra. **Conclusão da Figura.**

3.2 Monocultura celular

Foram utilizadas as seguintes linhagens celulares: células endoteliais humanas (HUVEC) e células musculares lisas arteriais de aorta humana (VSMC), obtidas do American Type Culture Collection (ATCC), tendo os códigos ATCC® CRL-1730™ e ATCC® PCS-100-021™ respectivamente, mantidas e estocadas no banco de células sob responsabilidade do Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria (Lab. Biologia Molecular, Instituto Butantan). Após descongelamento as células foram transferidas para garrafa de cultura celular (25 cm^2), contendo o meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Campinas-SP) suplementado com soro fetal bovino 10%, insulina humana (Humulin 100 UI/mL, Eli Lilly and Company - EUA) 1%, bicarbonato se sódio 200 mM, pH 7,4 em estufa 5% CO2 à 37ºC. As células dispostas em monocamada foram submetidas à dissociação enzimática com solução de tripsina 0,2% + EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) 0,02%, para que ocorra o desprendimento das células. A neutralização enzimática foi realizada utilizando o mesmo meio de cultura RPMI 1640 contendo 10% SFB. Após a neutralização as células em suspensão foram contadas em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 2 x 10^5 células/mL. A viabilidade celular foi determinada pelo teste de exclusão pelo azul de Tripan, sendo considerada ideal para a execução dos experimentos a viabilidade superior a 94%. Após atingirem confluência as células foram subcultivadas para ampliação, realização de experimentos ou foram congeladas em solução contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich Cód. C6164) em meio de crescimento completo e estocadas em nitrogênio líquido.

A quantidade de células por poço foi 2 x 10^5 células para ambos os tipos celulares, uma vez que a concentração após a neutralização das células em suspensão foi ajustada para 2 x 10^5 células/mL e cada poço recebeu 1 mL. As células endoteliais humanas utilizadas nesse experimento de monocultura estavam na quarta passagem e as células musculares lisas de aorta humana estavam na sétima passagem. Foram acrescentados nos poços de cultura juntamente com as células os *stents*, convencionais ou farmacológicos, e separados poços sem *stent* para constituição do grupo controle. Figuras 6 a 9.

Na monocultura de células endoteliais humanas, no experimento de 24 horas, utilizamos o *stent* farmacológico no tamanho 4,0 x 22 mm, com uma dose total de sirolimo de 276 µm no poço de cultura celular – placa de Petri (vide Materiais e Métodos tópico

“Preparação dos *stents*”). No experimento de 48 horas, foi utilizado um *stent* farmacológico no tamanho 4,0 x 09 mm e outro na medida 3,5 x 09 mm, com as doses correspondentes de sirolimo de 254,34 µm e 98,91 µm respectivamente no poço de cada cultura celular – placa de Petri.

Na monocultura de células musculares lisas de aorta humana, no experimento de 24 horas, utilizamos o *stent* farmacológico 4,0 x 30 mm, com uma dose total de sirolimo de 376 µm no poço de cultura celular – placa de Petri. No experimento de 48 horas, foi utilizado um *stent* farmacológico no tamanho 4,0 x 15 mm e outro na medida 4,0 x 26 mm, com as doses correspondentes de sirolimo de 188,4 µm e 326,56 µm respectivamente no poço de cada cultura celular – placa de Petri.

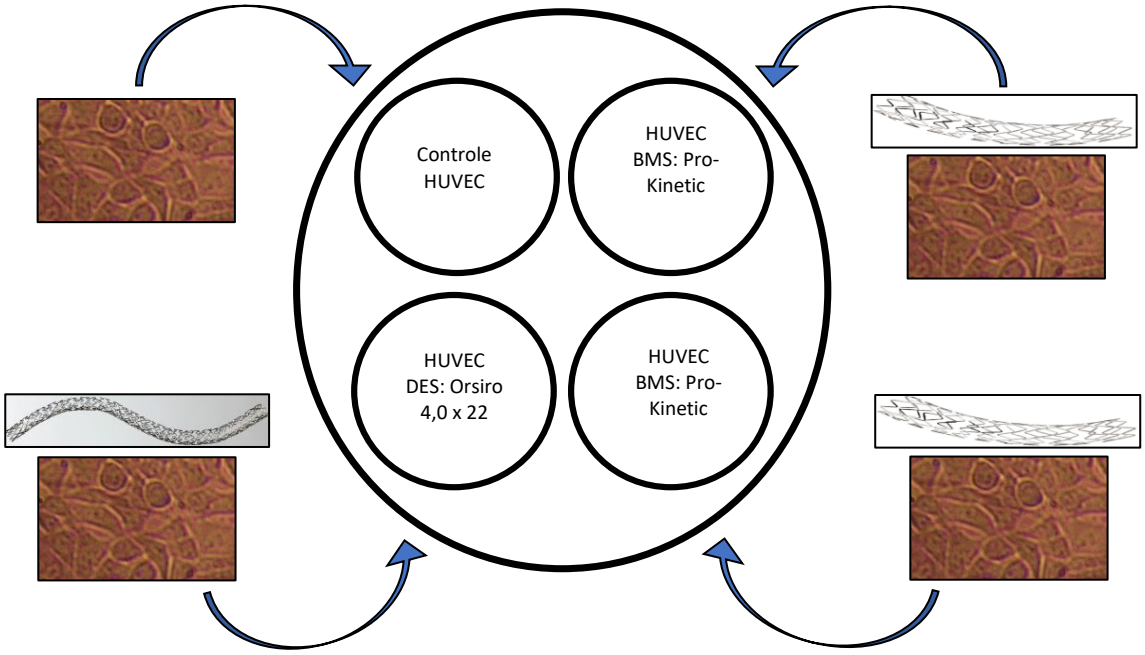


Figura 6- Monocultura de células endoteliais humanas em experimento de 24 horas. Concentração celular por poço 2 x 10^5 cel/mL. Células na quarta passagem. BMS: *stent* convencional (Pro-Kinetic®, Biotronik, Suíça); DES: *stent* farmacológico (Orsiro®, Biotronik, Suíça). HUVEC: células endoteliais humanas.

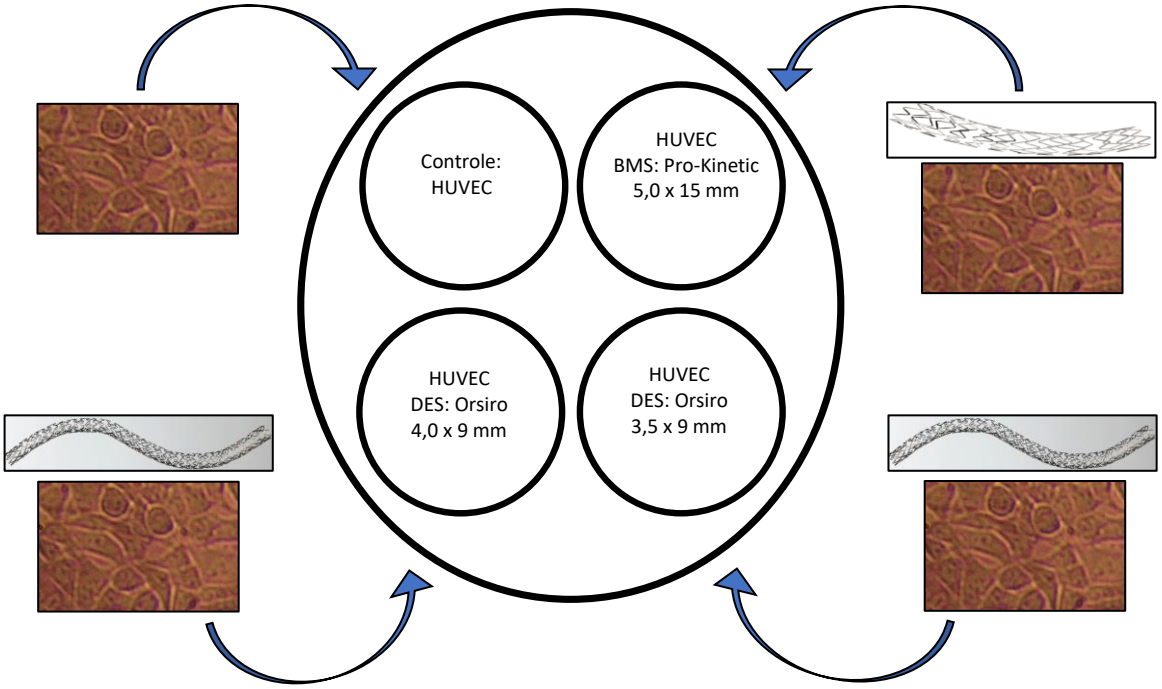


Figura 7- Monocultura de células endoteliais humanas em experimento de 48 horas. Concentração celular por poço 2 x 10^5 cel/mL. Células na quarta passagem. BMS: *stent* convencional (Pro-Kinetic®, Biotronik, Suíça); DES: *stent* farmacológico (Orsiro®, Biotronik, Suíça). HUVEC: células endoteliais humanas.

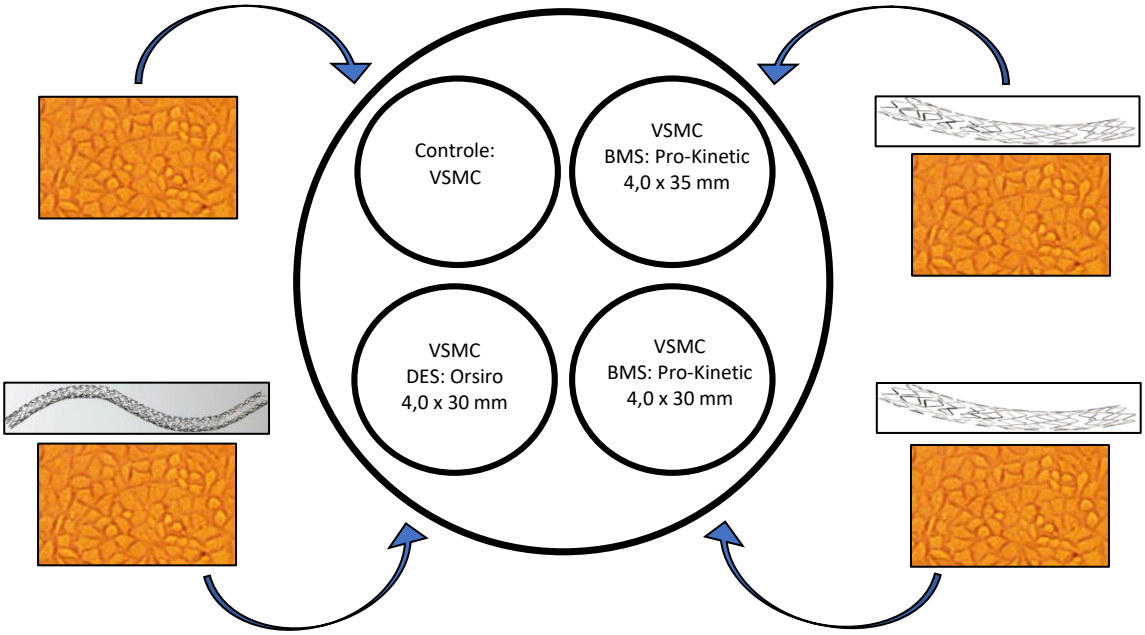


Figura 8- Monocultura de células musculares lisas de aorta humana em experimento de 24 horas. Concentração celular por poço 2 x 10^5 cel/mL. Células na sétima passagem. BMS: *stent* convencional (Pro-Kinetic®, Biotronik, Suíça); DES: *stent* farmacológico (Orsiro®, Biotronik, Suíça). VSMC: células musculares lisas de aorta humana.

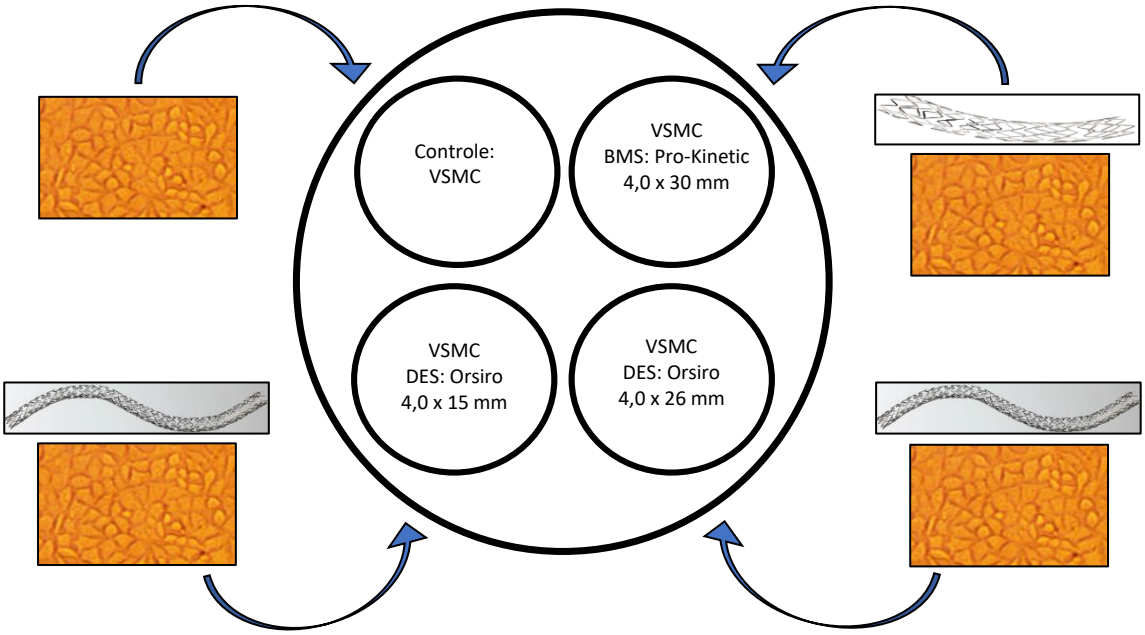


Figura 9- Monocultura de células musculares lisas de aorta humana em experimento de 48 horas. Concentração celular por poço 2 x 10^5 cel/mL. Células na sétima passagem. BMS: *stent* convencional (Pro-Kinetic®, Biotronik, Suíça); DES: *stent* farmacológico (Orsiro®, Biotronik, Suíça). VSMC: células musculares lisas de aorta humana.

3.3 Cocultura celular

Técnica de cultivo *in vitro* de uma mistura de tipos celulares, a cocultura permite interações sinérgicas ou antagônicas entre os tipos celulares, fundamentais na diferenciação celular, indução de apoptose e sinalização celular. Os contatos primários célula-a-célula são o principal meio de interação entre as células e a conexão com o microambiente. As junções intercelulares podem ser um alvo para a terapia e assim reconstituir *in vitro* mecanismos de mimetismo para a compreensão dos processos fisiopatológicos.

O procedimento experimental adotado neste estudo foi estabelecido a partir de uma curva de crescimento celular obtida em diferentes concentrações das células musculares lisas de aorta humana e células endoteliais humanas. Utilizamos dois modelos de cocultura, onde sumariamente, em um deles a concentração das células musculares lisas foi maior **(Modelo–I)** e no outro a concentração de células endoteliais foi a predominante **(Modelo-II)**. Em grupos específicos pré-determinados acrescentamos soro rico em plaquetas (vide delineamento do estudo) no volume de 60 µL por poço da placa de cultura de 24 poços.

A concentração celular utilizada na cocultura **Modelo–I (usada nos grupos 4 e 6)** das células musculares lisas de aorta humana foi de 0,5 x 10^5 células/mL, enquanto a concentração das células endoteliais humanas foi de 0,062 x 10^5 células/mL. A concentração celular utilizada na cocultura **Modelo-II (usada nos grupos 3 e 5),** entre células endoteliais humanas foi de 0,5 x 10^5 células/mL, enquanto as concentrações das células musculares lisas humanas foi de 0,062 x 10^5 células/mL. As passagens de cultivo celular utilizadas neste experimento foi a sétima passagem para as células musculares lisas de aorta humana e a terceira passagem para as células endoteliais. Figuras 10 a 14.

As análises do comportamento de crescimento e alterações de danos causados pela presença do *stent* convencional e o *stent* farmacológico contendo sirolimo, e em condições com meio suplementado com plasma rico em plaquetas foram avaliadas após 24 e 48 horas de exposição na presença ou ausência do *stent*.

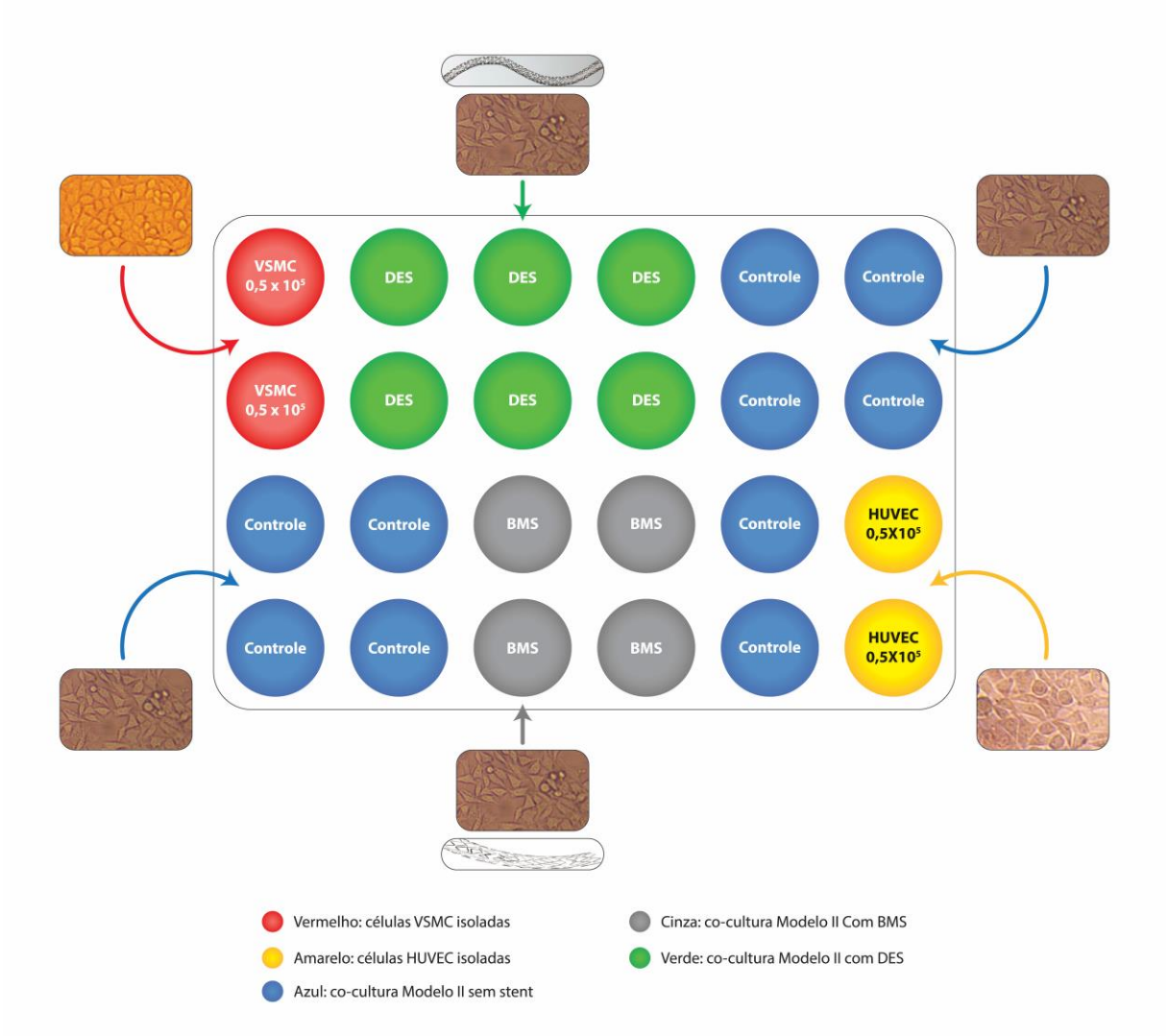


Figura 10- Cocultura Modelo-I, Grupo 4. Placa de cultura de 24 poços com as células distribuídas da seguinte maneira: poços em vermelho: células VSMC na concentração de 0,5 x 10^5 células/mL; poços em amarelo: células HUVEC na concentração de 0,5 x 10^5 células/mL; poços em azul: cocultura de células Modelo-I sem *stent* (controle); poços em cinza: cocultura de células Modelo-I com BMS; e poços em verde: cocultura de células Modelo-I com DES. Foram constituídas duas placas nesse modelo, uma para avaliação em 24 horas e outra para o período de tempo de 48 horas. **Cocultura Modelo-I** refere-se à maior concentração de células VSMC em relação às células HUVEC (concentração utilizada de VSMC foi 0,5 x 10^5 células/mL e de HUVEC foi 0,062 x 10^5 células/mL); VSMC: células musculares lisas de aorta humana; HUVEC: células endoteliais humanas; BMS: *stent* convencional; DES: *stent* farmacológico.

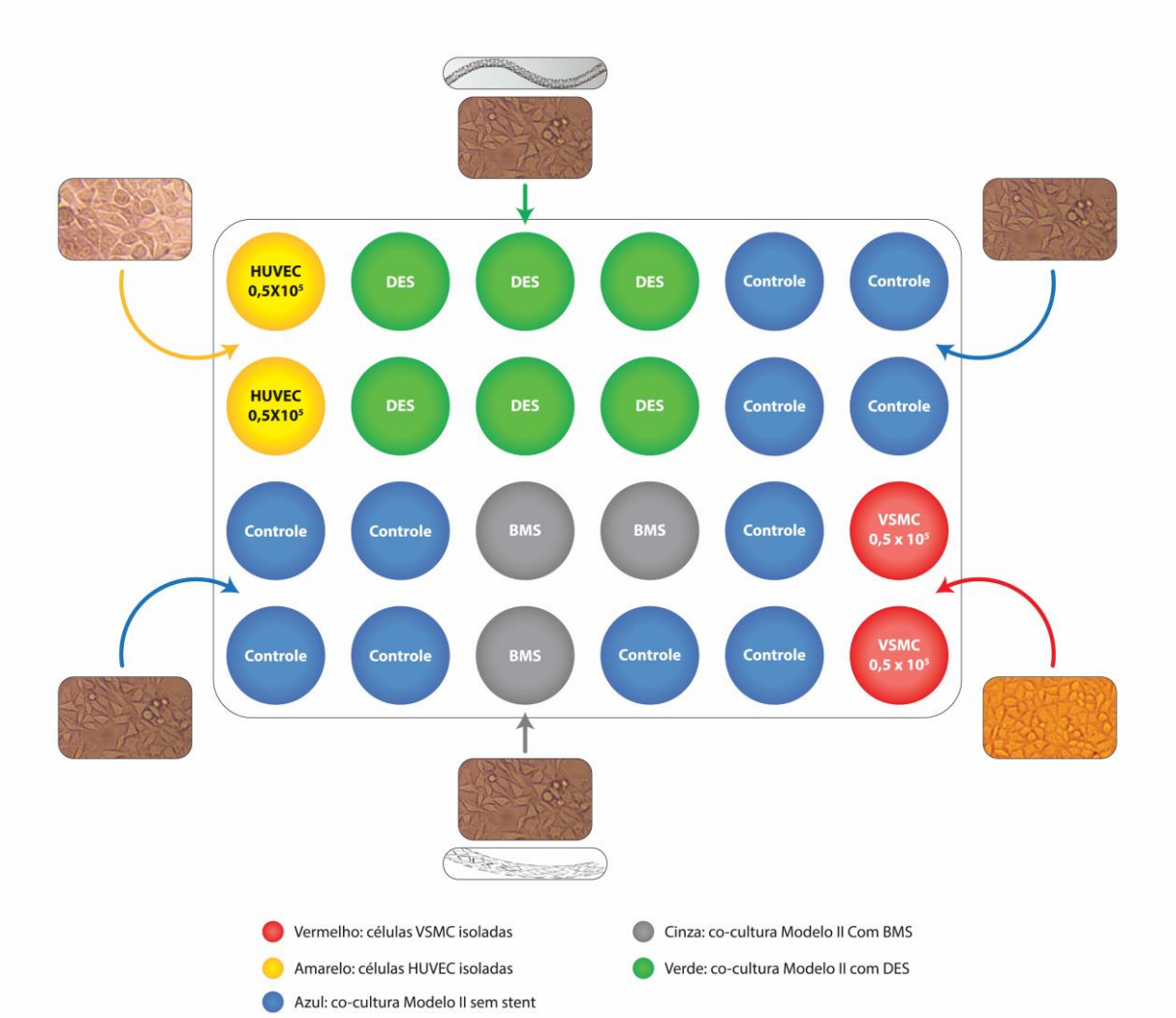


Figura 11- Cocultura Modelo-II, Grupo 3. Concentração utilizada de HUVEC foi 0,5 x 10^5 células/mL e de VSMC foi 0,062 x 10^5 células/mL. Placa de cultura de 24 poços com as células distribuídas da seguinte maneira: poços em vermelho: células VSMC na concentração de 0,5 x 10^5 células/mL; poços em amarelo: células HUVEC na concentração de 0,5 x 10^5 células/mL; poços em azul: cocultura de células Modelo-I sem *stent* (controle); poços em cinza: cocultura de células Modelo-I com BMS; e poços em verde: cocultura de células Modelo-I com DES. Foram constituídas duas placas nesse modelo, uma para avaliação em 24 horas e outra para o período de tempo de 48 horas. **Cocultura Modelo-II** refere-se à maior concentração de células HUVEC em relação às células VSMC (concentração utilizada de HUVEC foi 0,5 x 10^5 células/mL e de VSMC foi 0,062 x 10^5 células/mL); VSMC: células musculares lisas de aorta humana; HUVEC: células endoteliais humanas; BMS: *stent* convencional; DES: *stent* farmacológico.

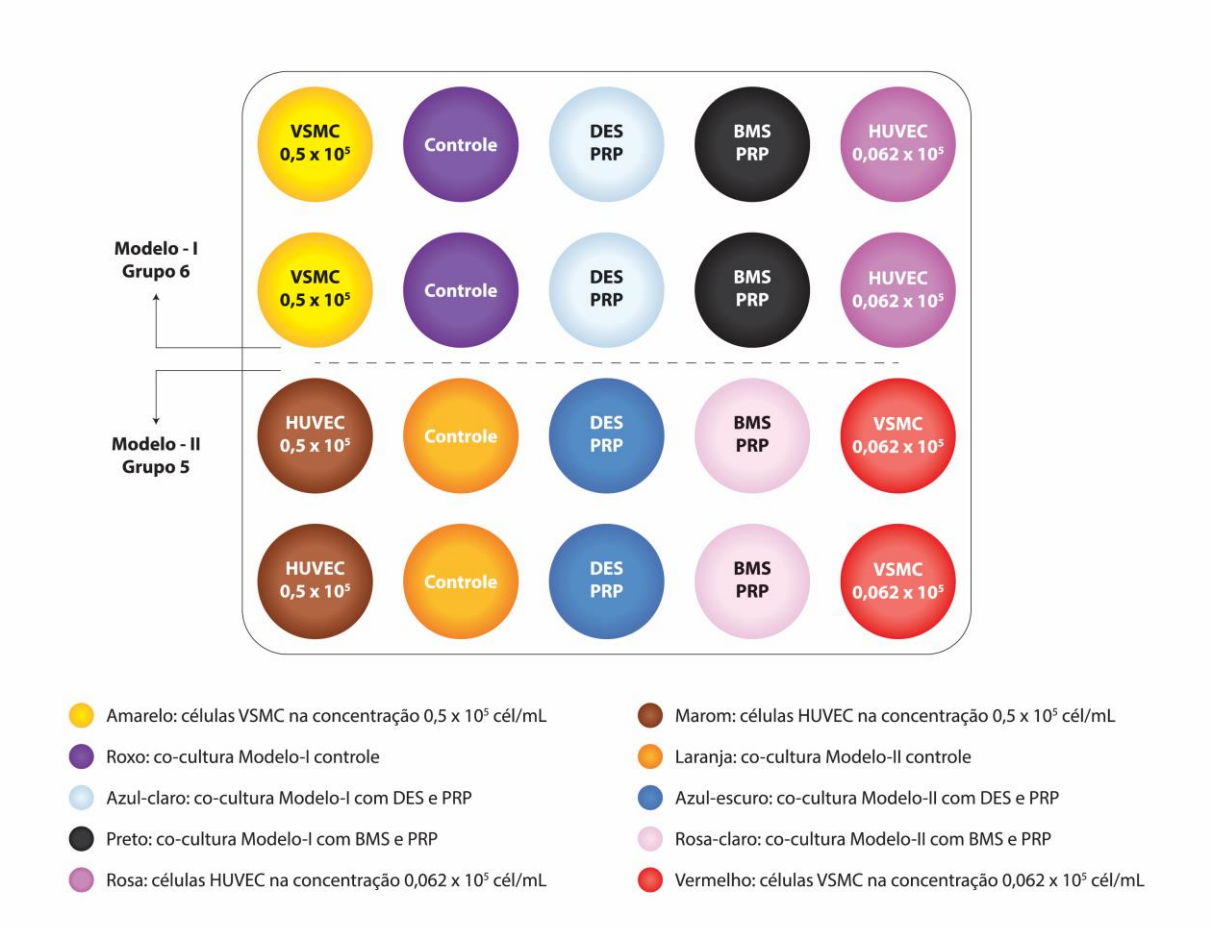


Figura 12- Cocultura com PRP à 10% (Modelos-I e II, Grupos 4 e 5). Placa de cultura de 24 poços (uma das fileiras está ausente porque não foi utilizada) com as células distribuídas conforme legenda de cores acima. Foram constituídas duas placas nesse modelo, uma para avaliação em 24 horas e outra para o período de tempo de 48 horas. **Cocultura Modelo-I** refere-se à maior concentração de células VSMC em relação às células HUVEC (concentração utilizada de VSMC foi 0,5 x 10^5 células/mL e de HUVEC foi 0,062 x 10^5 células/mL); **Cocultura Modelo-II** refere-se à maior concentração de células HUVEC em relação às células VSMC (concentração utilizada de HUVEC foi 0,5 x 10^5 células/mL e de VSMC foi 0,062 x 10^5 células/mL); PRP: soro rico em plaquetas à 10%; VSMC: células musculares lisas de aorta humana; HUVEC: células endoteliais humanas; BMS: *stent* convencional; DES: *stent* farmacológico.

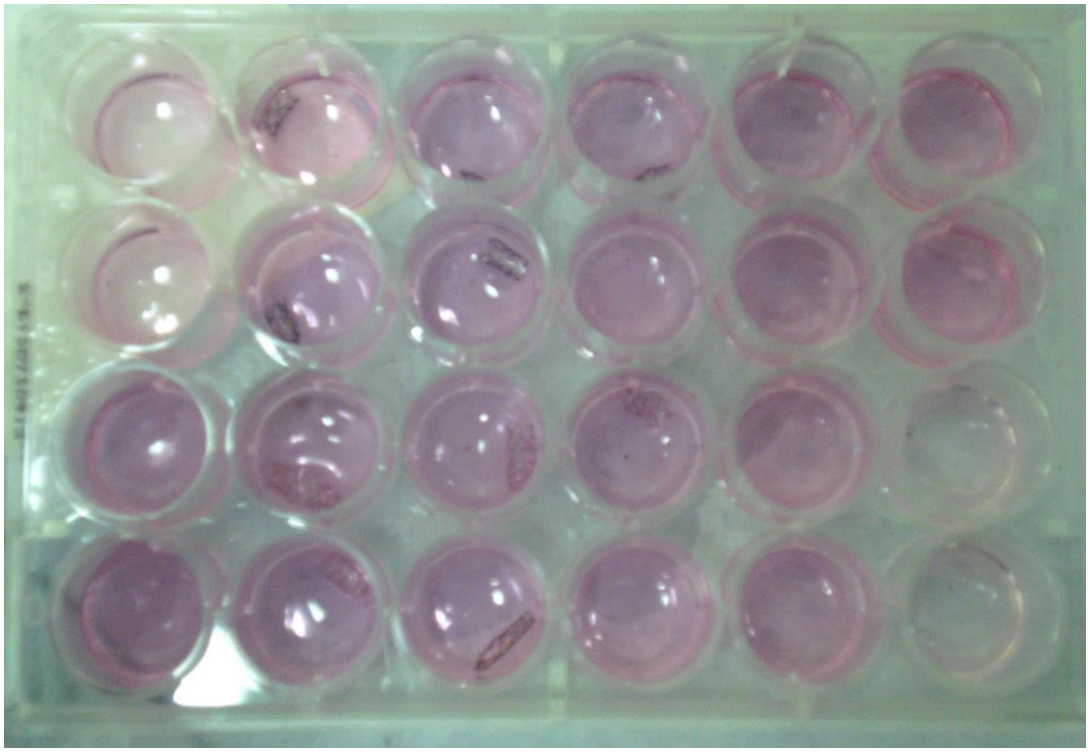


Figura 13 - Foto da placa de cultura das coculturas Modelo-I e Modelo-II e nos grupos 3 e 4.

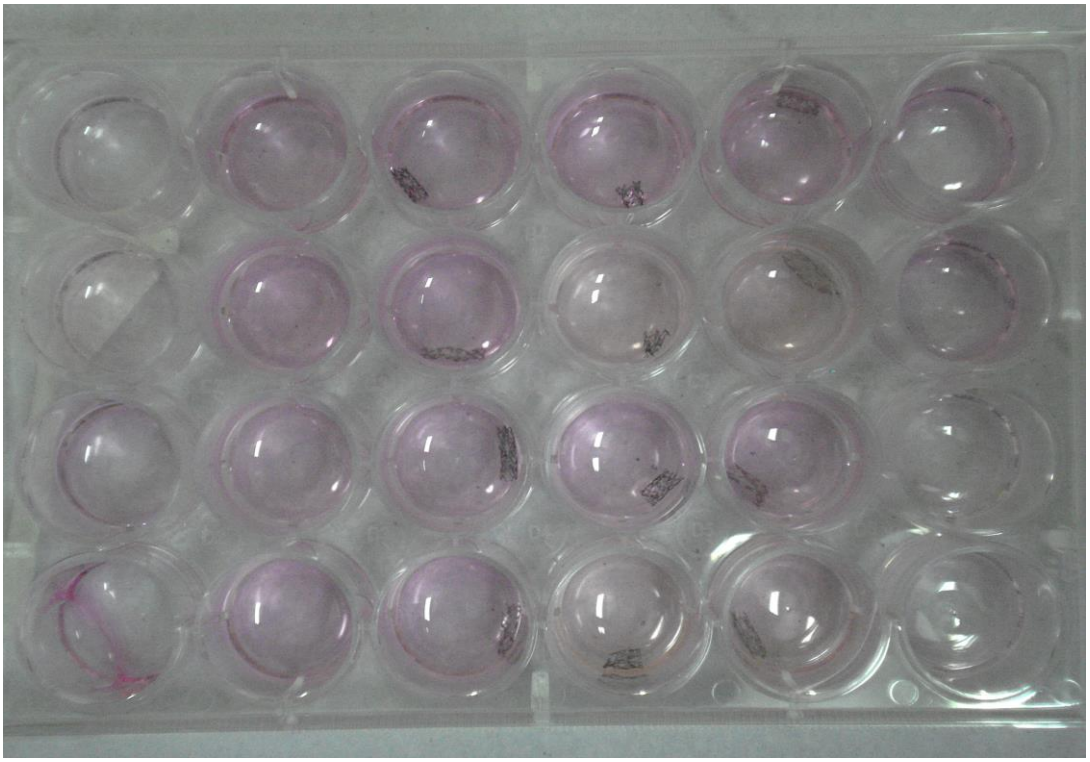


Figura 14 - Foto da placa de cultura das coculturas Modelo-I e Modelo-II e nos grupos 5 e 6.

3.4 Curva de crescimento

A fim de estabelecer as concentrações celulares ideais dos diferentes tipos celulares utilizados nos dois modelos das coculturas empregados nos experimentos, realizamos diversas proporções entre as concentrações celulares das células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana, e então as concentrações das células foram ajustadas a partir da quantificação da curva de crescimento entre essas duas células, representada na Figura 15. A proporção estabelecida com maior grau de significância foi 1:8 para os ambos tipos celulares, ou seja, nessa proporção há um aumento significativo na área de crescimento e proliferação dessas células. A proporção de 1:8 representa 0,5 x 10^5 cél/mL e 0,062 x 10^5 cél/mL.

Portanto, no Modelo-I de cocultura, utilizamos uma base de células musculares lisas de aorta humana na concentração de 0,5 x 10^5 cél/mL acrescido de células endoteliais humanas na concentração de 0,062 x 10^5 cél/mL. No Modelo-II de cocultura, utilizamos uma base de células endoteliais humanas na concentração de 0,5 x 10^5 cél/mL e células musculares lisas de aorta humana na concentração de 0,062 x 10^5 cél/mL.

Vide Figura 15 para curva de crescimento celular para estabelecimento das concentrações dos diferentes tipos celulares nos modelos de cocultura.

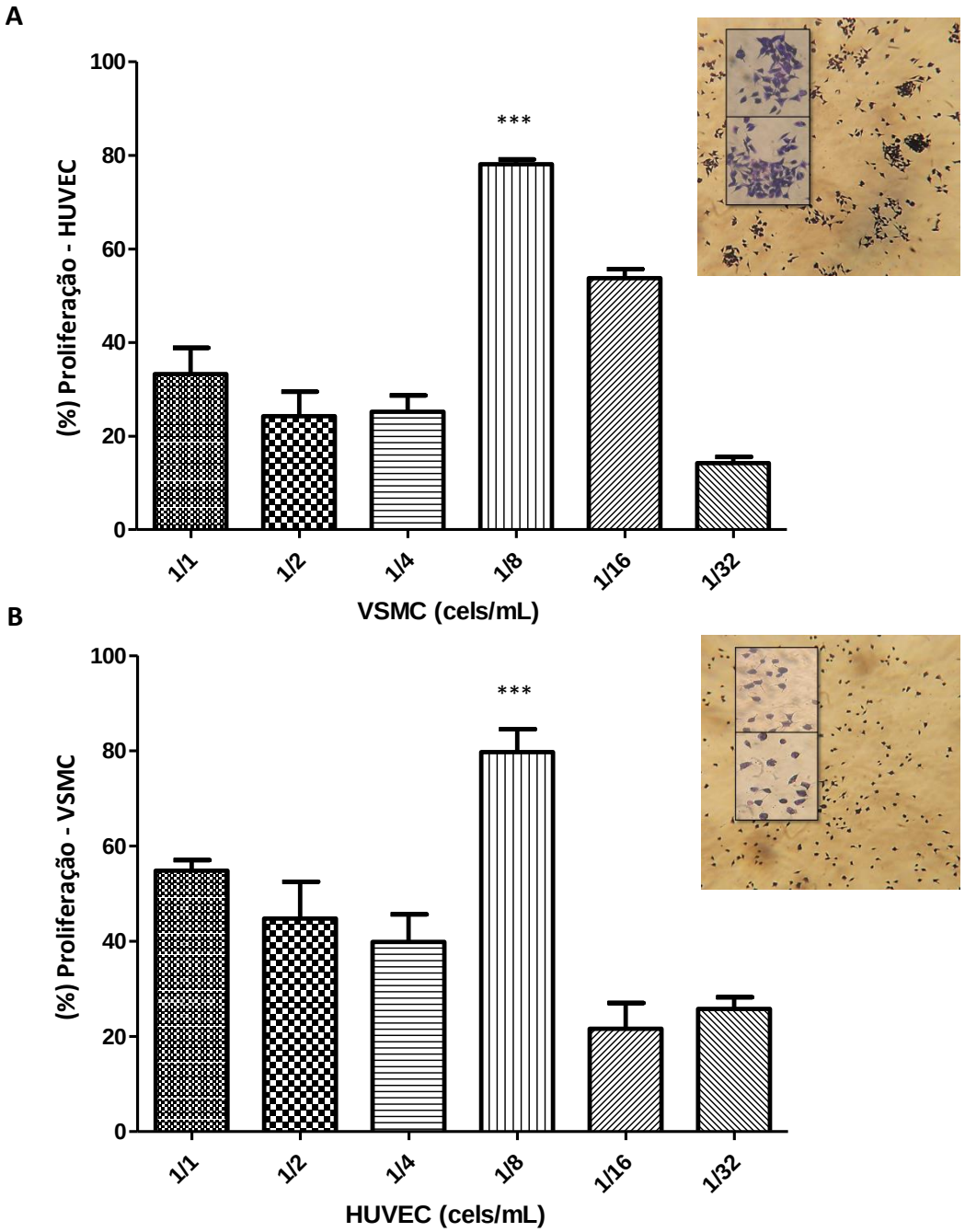


Figura 15 - Curva de crescimento celular. Realizada para estabelecimento das concentrações dos diferentes tipos celulares nos modelos de cocultura. **(A)** Representa o modelo de cocultura com base constituída por células musculares lisas de aorta humana (Modelo-I). A proporção de 1:8 foi onde houve maior estímulo das células musculares lisas de aorta humana pelas células endoteliais. Essa proporção consiste em células musculares lisas de aorta humana na concentração de 0,5 x 10^5 cél/mL acrescido de células endoteliais humanas na concentração de 0,062 x 10^5 cél/mL. **(B)** Representa o modelo de cocultura com base constituída por células endoteliais humanas (Modelo-II). A proporção de 1:8 foi onde houve maior estímulo das células endoteliais pelas células musculares lisas de aorta humana. Essa proporção consiste em células endoteliais humanas na concentração de 0,5 x 10^5 cél/mL acrescido de células musculares lisas de aorta humana na concentração de 0,062 x 10^5 cél/mL. Grau de significância estatística *** $p < 0,001$.

3.5 Soro rico em plaquetas (PRP) à 10%

As plaquetas, estruturas anucleadas que circulam no sangue periférico, são pequenos fragmentos citoplasmáticos, anucleados, derivados de células da medula óssea, os megacariócitos, e possuem uma meia vida de sete a dez dias. Na formação das plaquetas, minúsculas porções do citoplasma separam-se das regiões periféricas dos megacariócitos através de grandes canais de demarcação plaquetária. As plaquetas participam ativamente no processo de reparo das feridas, sendo as primeiras células presentes no local do trauma. Um megacariócito pode originar duas a três mil plaquetas. Contem no seu citoplasma grânulos com uma grande concentração em proteínas. O aumento de sua produção resulta na proliferação e diferenciação celular e no aumento da produção da matriz extracelular, ajudando também na coagulação sanguínea.[54]

A preparação do plasma rico em plaquetas (PRP) se dá por meio de um procedimento simples, que é a centrifugação do sangue total anticoagulado, sob condições controladas, obtida pela sequestração e concentração por gradiente de densidade. Esta centrifugação visa obter um plasma com a maior concentração de plaquetas quando comparada com a contagem basal do sangue periférico, permitindo a separação de plasma com elevado número de plaquetas, rico em PDGF (Fator de crescimento derivado de plaquetas), TGF-a (Fator de crescimento de transformação) e TGF-b, entre outros fatores. Tem aplicação em áreas multidisciplinares, mostrando resultados promissores especialmente na regeneração tecidual e na cicatrização, por ser considerado um agente catalisador no processo de reparo. Diversos estudos na literatura demonstram que os fatores de crescimento derivados das plaquetas são os principais responsáveis pela aceleração da regeneração tecidual e outros efeitos terapêuticos do PRP, sendo que se destaca, entre os fatores de crescimento presentes no PRP, o PDGF considerado iniciador universal da maior parte do processo de cicatrização.[55]

As plaquetas conseguem excretar variados tipos de fatores de crescimento através da degranulação plaquetária e exi*stent*es no plasma rico em plaquetas: fator de crescimento derivado das plaquetas (*Platelet derivated growth factors* – PDGF), fator transformador do crescimento b (*Transforming growth factors* – TGF-b), fator de crescimento semelhante à insulina (*Insulin-like growth factor 1*), fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor* – VEGF); fator de crescimento epitelial (*Epithelial growth factor*

– EGF); fator de angiogênese derivado da plaqueta (*Platelet-derived angiogenesis factor*) e fator plaquetário 4 *(Platelet factor 4* – PF-4).[56]

A cocultura com PRP à 10% foi realizada da seguinte forma: as células foram colocadas em cultura com soro fetal bovino a 10% por 24 horas; após a confluência de 90% o meio foi removido e substituído por meio sem soro fetal bovino; 24h após as células foram cultivadas com meio com 10% de PRP e 24 horas após as células foram tratadas.

3.6 *Stents* utilizados e seu manuseio

No presente estudo foram utilizados dois tipos de *stent*, convencional e farmacológico, gentilmente doados pela Biotronik AG, Bülach, Switzerland.

O *stent* convencional utilizado foi o **PRO-Kintetic Energy®**, um sistema de *stent* coronário de cromo cobalto (CoCr) que consiste em um *stent* expansível por balão pré-montado em um sistema de entrega de troca rápida. É feito de uma liga de cobalto-cromo (L-605) e é revestido com uma camada fina de carbeto de silício amorfo (proBIO). Suas hastes são ultrafinas e possuem espessura de 60 μm. Existem dois modelos diferentes de *stents*: pequeno (diâmetro interno de *stent* de 2,25 a 3,0 mm) e médio (diâmetro interno de *stent* de 3,5 a 4,0 mm). O sistema de entrega é um cateter de angioplastia transluminal percutânea de troca rápida com um comprimento de 140 cm e com uma única entrada para conectar um dispositivo de insuflação para inflar e desinflar o balão. O cateter possui um revestimento hidrofóbico na superfície externa do eixo proximal e um revestimento hidrofílico na superfície externa do eixo distal. O lúmen do fio-guia começa na ponta do sistema de distribuição e termina na porta de saída do fio-guia, a 29 cm da extremidade distal. O sistema de *stent* é compatível com os fios-guia de 0,014” (0,36 mm) de diâmetro e guiam os cateteres com um diâmetro interno de ≥ 0,056” (1,42 mm).

O *stent* farmacológico utilizado foi o **Orsiro®**, um sistema de *stent* coronário de cromo cobalto (CoCr) com hastes ultrafinas de de 60 μm, que consiste em um *stent* expansível por balão pré-montado em um sistema de entrega de troca rápida. É feito de uma liga de cobalto-cromo (L-605) e é revestido com uma camada fina de carbeto de silício amorfo (proBIO) com revestimento de polímero de ácido poli-L-láctico biorreabsorvível que elui o fármaco antiproliferativo sirolimo, na concentração de 1,4 $\mu g/mm^2$. Existem dois modelos diferentes

de *stents*: pequeno (diâmetro interno de *stent* de 2,25 a 3,0 mm) e médio (diâmetro interno de *stent* de 3,5 a 4,0 mm). O sistema de entrega é um cateter de angioplastia transluminal percutânea de troca rápida com um comprimento de 140 cm e com uma única entrada para conectar um dispositivo de insuflação para inflar e desinflar o balão. O cateter possui um revestimento hidrofóbico na superfície externa do eixo proximal e um revestimento hidrofílico na superfície externa do eixo distal. O lúmen do fio-guia começa na ponta do sistema de distribuição e termina na porta de saída do fio-guia, a 29 cm da extremidade distal. O sistema de *stent* é compatível com os fios-guia de 0,014" (0,36 mm) de diâmetro e guiam os cateteres com um diâmetro interno de ≥ 0,056" (1,42 mm).

Para ajustar o comprimento dos *stents* de forma que fosse possível fisicamente adicioná-los nas placas de cultura de 24 poços, que possuem um diâmetro de 10 mm, e também garantir que todos os poços recebessem a mesma dosagem do sirolimo, para os grupos 3 e 4 (com o Modelo-I e Modelo-II respectivamente, vide tópico "Delineamento do Estudo") do experimento, cortamos os *stents* dos diferentes diâmetros e comprimentos para que não ultrapassassem os 10 mm que os poços comportam e que mantenham a mesma carga do fármaco.

Utilizamos a seguinte fórmula de cálculo de área do cilindro (Figura 16):

$$A = h\,(2\pi r) + 2\,\pi\,r^2$$

Onde temos: (A) área do cilindro, (h) altura e (r) raio.

Como o *stent* trata-se de uma estrutura vazada, desconsideramos a última parte da fórmula ($2\,\pi\,r^2$) que diz respeito aos cilindros sólidos, e utilizamos apenas a primeira parte [$A = h\,(2\pi r)$] para cálculo da área dos *stents* (Figura 16).

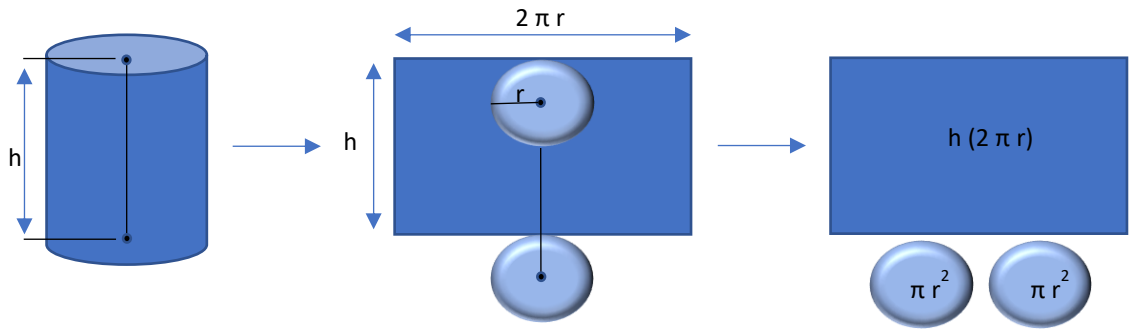


Figura 16- Ilustração da fórmula do cálculo da área do *stent*. Realizado como pré-requisito para padronização da dose do sirolimo contido em cada *stent* farmacológico que os respectivos poços de cultura receberam, nas coculturas dos diversos modelos e períodos de tempo do experimento. Onde A: área do cilindro, h: altura e r: raio.

O comprimento máximo do *stent* considerado possível para ser adicionado no poço da placa de 24 poços que possui 10 mm de diâmetro foi 09 mm, para que houvesse certa margem de folga no manuseio do material. Calculamos a partir do *stent* de mais fino calibre que fez parte da nossa amostra que é o de diâmetro 2,25. Tomemos como exemplo o *stent* farmacológico **Orsiro®** 2,25 x 40 mm onde temos um raio de 1,125 mm e comprimento de 40 mm (equivalente a altura do cilindro), a área do cilindro calculada através da fórmula acima é 281,2 mm^2, e o *stent* **Orsiro®** como descrito acima possui 1,4 μg de sirolimo/mm^2, em 09 mm desse *stent* há 63,27 μg de sirolimo. Sendo assim, foi padronizado que cada poço de cultura celular designado para receber *stent* farmacológico, o faria com os comprimentos ajustados para 63,27 μg de sirolimo.

Nos grupos 5 e 6, Modelo-I e Modelo-II com soro rico em plaquetas, utilizamos stetns farmacológicos com mesmo diâmetro e com um comprimento menor (4,5 mm de comprimento), dessa forma cada poço de cultura nesses grupos recebeu 38,85 μg de sirolimo.

Os *stents* utilizados nos experimentos foram manuseados da seguinte forma: retirados do invólucro plástico de proteção no qual vem acondicionados dentro da capela de fluxo laminar com todas as medidas antisépticas, liberados do balão carreador da extremidade distal através da insuflação com manômetro na pressão nominal, cortados nas medidas pré-definidas com uso do paquímetro digital e tesoura estéril, e por último, adicionados nos poços das placas de cultura. Figura 17.

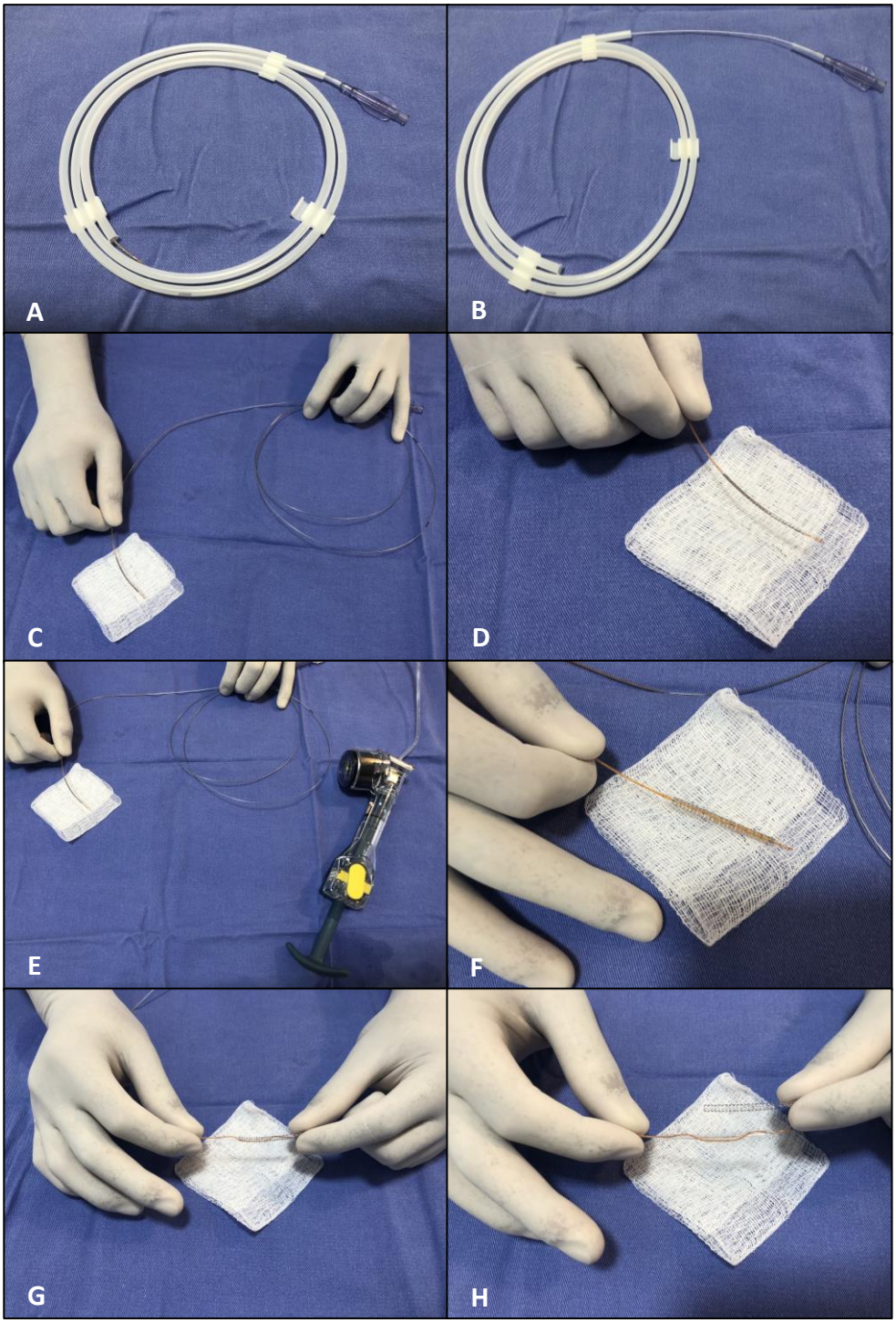


Figura 17 - Manuseio dos *stents* utilizados nos experimentos. (A a D): os stetns foram retirados do invólucro plástico de proteção no qual vem acondicionados dentro do fluxo laminar com todas as medidas anti-sépticas; **(E e F)** insuflação com manômetro para liberação na na pressão nominal; **(G e H)** liberados do balão carreador da extremidade distal; posteriromente foram cortados nas medidas pré-definidas com uso do paquímetro digital e tesoura estéril e adicionados nos poços das placas de cultura (etapa não representada nas fotos).

3.7 Concentração de sirolimo ajustada pelo número de células por poço de cultura

Como exposto previamente nos tópicos referentes à cada etapa do experimento (vide Materias e Métodos "Monocultura" e "Cocultura"), os poços de cultura celular receberam diferentes tamanhos de *stent* farmacológico, por conseguinte, diferentes doses de sirolimo. O *stent* farmacológico utilizado nesse experimento, como também já foi exposto previamente (vide Materiais e Métodos "*Stents* Utilizados e seu Manuseio"), elui o fármaco antiproliferativo sirolimo, na concentração de 1,4 $\mu g/mm^2$.

Na monocultura de células endoteliais humanas (grupo 1), cada poço recebeu 1 mL de célula na concentração 2 x 10^5 células/mL totalizando 2 x 10^5 células por poço (14 vezes mais células que nos experimentos da cocultura, vide no parágrafo a seguir). No experimento de 24 horas o tamanho do *stent* utilizado foi o 4,0 x 22 mm, com uma dose de sirolimo de 276 µg, ajustando para a quantidade de células por poço em relação à cocultura, temos uma dose de 19,38 µg). No experimento de 48 horas os tamanhos dos *stents* utilizados foram 3,5 x 09 mm e 4,0 x 09 mm, com uma dose de sirolimo de 98,91 µm e 254,34 µg respectivamente, ajustando para a quantidade de células por poço em relação à cocultura, temos doses de 6,94 µg e 17,86 µg. Na monocultura de células musculares lisas de aorta humana (grupo 2), no experimento de 24 horas o tamanho do *stent* utilizado foi o 4,0 x 30 mm, com uma dose de sirolimo de 376 µg, ajustando para a quantidade de células por poço em relação à cocultura, temos uma dose de 26,41 µg. No experimento de 48 horas os tamanhos dos *stents* utilizados foram 4,0 x 15 mm e 4,0 x 26 mm, com uma dose de sirolimo de 188,4 µg e 326,56 µg respectivamente, ajustando para a quantidade de células por poço em relação à cocultura, temos doses de 13,23 µg e 22,94 µg.

Nas coculturas Modelo-I e Modelo-II sem o soro rico em plaquetas (grupos 3 e 4), em cada poço foi adicionado 0,25 mL de célula na concentração de 0,5 x 10^5 células/mL da célula base do modelo em questão mais 0,25 mL de célula na concentração de 0,062 células/mL da célula diluída do modelo em questão (no Modelo-I a célula base é VSMC e a célula diluída foi a HUVEC enquanto que no Modelo-II a célula base é HUVEC e a célula diluída foi a VSMC), totalizando 0,5 mL em cada poço. Quando adicionamos no poço de cultura 0,25 mL de uma concentração celular de 0,5 x 10^5 células/mL, equivale a termos adicionado 0,125 x 10^5 células. Acrescentamos no poço de cultura 0,25 mL de uma concentração celular de 0,062 x 10^5 células/mL, o que equivale a termos inserido 0,0155 x 10^5 células. Somando-se os dois

temos que cada poço das coculturas recebeu 0,5 mL com 0,1405 x 10^5 células. Os tamanhos dos *stents* foram ajustados para que cada poço recebesse 63,27 µg.

Nas coculturas Modelo-I e Modelo-II com soro rico em plaquetas (grupos 5 e 6) as concentração e quantidade celular foram as mesmas que a descrita acima nos Modelo-I e Modelo-II grupos 3 e 4, porém foi adicionada nos poços de cultura *stents* farmacológicos com o mesmo diâmetro de 2,75 mm e cortados o comprimento em 4,5 mm para cada poço, totalizando uma dose de sirolimo de 38,85 µg. Vide Tabela 1.

Tabela 1- Apresentação dos diferentes tipos, quantidades e concentrações celulares nos modelos de cultura celular e a dose relacionada de sirolimus por poço de cultura celular ajustada para a quantidade celular

Tipo de cultura	Tipo celular	Grupo do Estudo	Concentração celular (cels/mL)	Quantidade celular por poço	Tamanho do stent (mm)	Dose de sirolimus por poço (µg)	Dose sirolimus ajustada (µg)
Monocultura	HUVEC 24 h	Grupo 1	2×10^5	2×10^5	4,0 x 22	276	19,38
Monocultura	HUVEC 48 h	Grupo 1	2×10^5	2×10^5	3,5 x 09	98,91	6,94
Monocultura	HUVEC 48 h	Grupo 1	2×10^5	2×10^5	4,0 x 09	254,34	17,86
Monocultura	VSMC 24 h	Grupo 2	2×10^5	2×10^5	4,0 x 30	376	26,41
Monocultura	VSMC 48 h	Grupo 2	2×10^5	2×10^5	4,0 x 15	188,4	13,23
Monocultura	VSMC 48 h	Grupo 2	2×10^5	2×10^5	4,0 x 26	326,56	22,94
Co-cultura	HUVEC e VSMC (Modelo-II)	Grupo 3	HUVEC $0,5 \times 10^5$ VSMC $0,062 \times 10^5$	$0,1405 \times 10^5$	*	63,27	63,27
Co-cultura	VSMC e HUVEC (Modelo-I)	Grupo 4	VSMC $0,5 \times 10^5$ HUVEC $0,062 \times 10^5$	$0,1405 \times 10^5$	*	63,27	63,27
Co-cultura com PRP	HUVEC e VSMC (Modelo-II)	Grupo 5	HUVEC $0,5 \times 10^5$ VSMC $0,062 \times 10^5$	$0,1405 \times 10^5$	2,75 x 4,5	38,85	38,85
Co-cultura com PRP	VSMC e HUVEC (Modelo-I)	Grupo 6	VSMC $0,5 \times 10^5$ HUVEC $0,062 \times 10^5$	$0,1405 \times 10^5$	2,75 X 4,5	38,85	38,85

*Tamanhos variados ajustados conforme a quantidade de sirolimus para que todas as amostras recebessem 63,37 µg. HUVEC: célula endotelial humana; VSMC: célula muscular lisa de aorta humana, co-cultura Modelo–I (usada nos grupos 4 e 6) utilizou concentração de células musculares lisas de aorta humana de $0,5 \times 10^5$ células/mL e concentração das células endoteliais humanas de $0,062 \times 10^5$ células/mL; co-cultura Modelo-II (usada nos grupos 3 e 5) utilizou concentração de células endoteliais humanas de $0,5 \times 10^5$ células/mL e concentração das células musculares lisas humanas de $0,062 \times 10^5$ células/mL.

3.8 Avaliação da citotoxicidade pelo método colorimétrico do MTT e determinação da IC_{50}

O teste colorimétrico MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-1)2,5-difeniltetrazólio brometo] (Sigma Aldrich Cód. M2128) é empregado em triagem inicial para a identificação de compostos com atividade citotóxica. Este ensaio de redução de tetrazólio é baseado na quantidade de cristais de formazan formados, mensurados através do registo das alterações de absorbância a 540 nm. As células com metabolismo ativo convertem MTT em cristal de formazan que possui coloração roxa. Quando as células estão inviáveis, perdem a capacidade de converter MTT em formazan. O mecanismo que permite avaliar a viabilidade celular envolve a atividade das enzimas NADH e NADPH presentes no citoplasma, e da enzima succinato desidrogenase, localizada nas mitocôndrias. Porém, este teste não discrimina o tipo de mecanismo envolvido na redução da viabilidade celular. [57]

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste colorimétrico do MTT. As células endoteliais na segunda passagem e as células musculares lisas na sexta passagem foram plaqueadas em placas separadas em octoplicata na densidade de 2 x 10^4 células por poço, em placas de 96 poços e cultivadas por 24 horas em estufa contendo 5% de CO2 a 37°C, para adaptação das células. Após o período de incubação de 24 horas, as células foram tratadas durante 24 e 48 horas com everolimo nas concentrações de 0,09; 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 μM. Oito poços em cada placa não foram tratados com o fármaco para constituir a população de células de controle. Após o tratamento com o everolimo, o sobrenadante foi recolhido e armazenado em outra placa de 96 poços sob refrigeração de -20º C. Nas placas tratadas foram adicionados 10 µL de MTT (5 µg/ml) e 90 µL de meio de cultura incompleto em cada poço e em seguida incubadas por 3 horas no escuro à 37ºC. Após este período, o meio foi removido e acrescentado 150 µL do solvente metanol para dissolver os cristais de formazan, e na eluição com o metanol a célula libera cor amarela para o meio. A quantificação da absorbância foi realizada em espectofotômetro para microplacas (leitor de ELISA - ThermoPlate®) com comprimento de onda de 540nm e filtro de referência de 630 nm, capaz de detectar a cor amarela em todos seus espectros, desde o incolor até o amarelo intenso, na dependência da quantidade de células viáveis na amostra. Os resultados expressaram a porcentagem média de células viáveis. O valor da média da densidade óptica do grupo controle foi considerado 100% de viabilidade celular e os resultados dos demais grupos experimentais foram comparados a esse valor.

Para a determinação da concentração inibitória (IC_{50}), os dados obtidos da densidade óptica foram normalizados em relação ao grupo controle de células não tratadas (100%) e posteriormente calculada a equação da reta considerando-se o valor da concentração molar na função logarítmica (log[x] μM) através de regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism™ 5 (La Jolla, California, EUA), e os valores foram expressos em μM.

3.9 Determinação de produtos da peroxidação de lipídios polissaturados

No processo de respiração celular, a redução do oxigênio pode gerar espécies reativas ao oxigênio. Em situações de equilíbrio as espécies reativas ao oxigênio são neutralizadas pelos antioxidantes, porém em algumas situações pode ocorrer um desequilíbrio entre as formas oxidantes e antioxidantes, gerando o estresse oxidativo. Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das espécies reativas ao oxigênio frente ao estresse, porém a membrana celular é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade.

O processo de peroxidação lipídica é iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado e propagado por radicais peroxilas, resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malondialdeido, 4-hidroxinonenal e isoprostanos, que podem ser detectados em amostras biológicas e utilizados para avaliar o estresse oxidativo da célula, ou seja, podem ser utilizados como indicadores da ação dos radicais livres no organismo.[58]

O malondialdeído (MDA, $C_3 H_4 O_2$), é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados por cisão beta dos ácidos graxos poli-insaturados peroxidados, principalmente o ácido araquidônico. O MDA é volátil, possui baixo peso molecular (C3H4O2 – PM = 72,07), tem uma cadeia curta 1, 3-dicarbonil e é um ácido moderadamente fraco (pKa – 4,46). Possui ação citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias ao estresse oxidativo.

A quantificação de MDA nos sistemas biológicos é um parâmetro importante para avaliação do estresse oxidativo celular, sendo amplamente utilizada como um marcador do dano oxidativo em moléculas lipídicas. O método foi introduzido por Yagi[59] e tem sido vastamente empregado, e o princípio consiste na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico

(TBA). A taxa de lipoperoxidação das células foi medida utilizando a técnica de Ohkawa *et al.* (1979),[60] que se baseia na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), predominantemente o malondialdeido (MDA), que em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento), reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos, dentre eles o ácido tiobarbitúrico (TBA), para produzir cromógenos com alta absortividade molar no espectro visível. A sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) origina produtos de coloração rosa coloração rosa que podem ser determinados por espectrofotometria em comprimento de onda ajustado para 535 nm. O aumento de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico é uma evidência indireta da intensa produção de radicais livres. [61]

Embora esse método ainda seja amplamente utilizado, ele não é específico para detecção dos produtos da peroxidação lipídica, uma vez que quantifica a soma das diferentes substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Dessa forma, os valores de TBARS incluem interferentes provenientes da reação do TBA com outras substâncias presentes na amostra, como por exemplo, carboidratos e proteínas.

Utilizando-se essa técnica foi possível avaliar a degradação oxidativa de ácidos graxos presentes em sobrenadante das culturas celulares recolhido dos(as):

- teste colorimétrico do MTT em 24 e 48 horas;
- monocultura de células endoteliais humanas e de células musculares lisas de aorta humana na presença de stens convencionais ou farmacológicos em 24 e 48 horas;
- cocultura de células endoteliais humanas e de células musculares lisas de aorta humana na presença de stens convencionais ou farmacológicos em 24 e 48 horas;
- cocultura de células endoteliais humanas e de células musculares lisas de aorta humana com soro rico em plaquetas na presença de *stents* convencionais ou farmacológicos em 24 e 48 horas.

Foram realizadas alíquotas de 100 µl do sobrenadante das culturas primárias de cada amostra celular conforme descrito acima, nos intervalos de 24 e 48 horas. Duas séries de tubos (A e B) devidamente marcados, foram preparados com 200 µl de ácido tricloroacético 20% - TCA (Sigma Aldrich Cód. T4885) em A e 200 µl de TBA contendo TCA (ácido tiobarbitúrico 0,86% - 59 mM [Sigma Aldrich Cód. S388033]) em B. As amostras foram mantidas por 20min em banho-maria a 100 °C. Após este período os tubos correspondentes de TCA e TBA/TCA

foram imediatamente imersos em banho-de-gelo por 20 min e submetidos à centrifugação à 8000 rpm durante 4 min. Foram retirados 100 µl do sobrenadante de cada amostra e acondicionados em placa de 96 poços, que foi utilizado para a quantificação das TBARS. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro para microplacas, leitor de ELISA (ThermoPlate), com comprimento de onda ajustado para 535 nm.

O cálculo da taxa da lipoperoxidação foi realizado subtraindo os valores do branco de cada série. A absorbância média da série de TCA foi obtida pela diferença da absorbância da TCA/TBA e dividindo pelo coeficiente molar do malondialdeido (MDA), conforme a expressão matemática que segue:

$$\text{LPO}=\frac{(\text{média da absorbância TCA – branco})-(\text{média da absorbância TCA/TBA – branco})\text{x}5}{0{,}0312 \text{ – coeficiente molar (MDA)}}$$

Onde: TCA = ácido tricloroacético 20%; TBA = Ácido Tiobarbitúrico 20%; MDA = malondialdeido.

Os valores foram expressos em nmoles de MDA/mL formado no sobrenadante das culturas celulares.

3.10 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um recurso que permite uma análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão. As células da amostra em suspensão são marcadas com anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos, que permitem a identificação e a quantificação de células pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência.[62]

As células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana foram plaqueadas nas placas de cultura conforme o tipo de cultura e nas seguintes concentrações, também de acordo com o tipo de cultura descrito no delineamento experimental.

Após a deprivação do soro fetal bovino por 24 horas, as células foram tratadas com *stent* convencional ou farmacológico, na presença ou não de soro rico em plaquetas a 10%, durante 24 e 48 horas. Após o tratamento as células foram ressuspendidas em 300 µL de solução de tripsina (Sigma Aldrich Cód. T3924) a 0,2% à 37ºC e bloqueada com a adição de meio de cultivo completo com soro fetal bovino (SFB 20%). Em seguida, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm, e o botão celular ressuspendido em 1 mL de "Cold GM" (glicose 6,1 mM; NaCl 137 mM; KCl 4,4 mM; 14 Na2HPO4 1,5 mM; KH2PO4 0,9 mM; EDTA 0,5 mM). Em seguida, adicionou-se lentamente etanol absoluto (4ºC) sob agitação. As células foram fixadas por 30 minutos. Após este período, foram centrifugadas e ressuspendidas em 200 µL de tampão FAC's Flow, 10 µL de Triton X, 10 µL de iodeto de propídio (PI) (50µg/ml, Sigma®) e 1 µL de RNase-A (0,3mg/ml - Sigma®). As células foram mantidas a temperatura ambiente durante 1 hora, no escuro. A leitura foi realizada por citometria de fluxo no citômetro FACS Calibur™ (Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA, EUA), no canal de fluorescência FL2-H (Alexa Fluor 488), e as fases do ciclo celular (DNA fragmentado ou sub-G1, G0/G1, fase S e G2/M) foram analisadas utilizando-se o programa Cell-Quest. Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o programa WinMDI 2.8. Os valores foram expressos em porcentagem média de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular.

3.11 Análise da expressão de marcadores celulares envolvidos nas vias de apoptose e controle de proliferação celular por citometria de fluxo

3.11.1 Marcadores celulares utilizados

A análise da expressão de marcadores celulares envolvidos nas vias de apoptose e controle de proliferação celular foi realizada estudando o perfil de expressão dos marcadores caspase-3, PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), p-27 e ciclina D1. Foram também realizadas as determinações de marcadores envolvidos no processo inflamatório ICAM-1, IL-1 beta, TNF-DR4, VEGF-R1 (angiogênese), IL-6 e MCP-1.

3.11.1.1 Caspase 3

A apoptose é mediada por uma cascata proteolítica intracelular. Uma célula que sofre apoptose morre de modo “limpo”, sem danificar as suas vizinhas, como quando uma célula morre como resultado de uma doença aguda. Nessa última situação, em geral as células se incham e arrebentam, derramando todo o seu conteúdo sobre suas vizinhas, um processo chamado de *necrose celular*, que aciona uma resposta inflamatória potentemente danosa. Em contraste, uma célula que sofre apoptose se enruga e condensa, o citoesqueleto colapsa, o envelope nuclear se desmonta, e o DNA do núcleo se quebra em fragmentos. O mais importante, a superfície da célula é alterada de modo que ela imediatamente atrai células fagocíticas, geralmente células fagocíticas especializadas, os macrófagos, que engolfam a célula em apoptose antes que ela derrame seu conteúdo. Essa remoção rápida da célula morrendo evita as consequências danosas da necrose celular e também permite que os componentes orgânicos da célula em apoptose sejam reciclados pela célula que a ingere.[63]

A maquinaria responsável pela apotose nas células animais envolve a família *caspase* de proteínas. As caspases são produzidas como precursores inativos chamados de pró-caspases, e são normalmente ativadas por clivagem proteolítica em resposta a sinais que induzem apoptose. As caspases ativadas clivam e assim ativam outros membros da família das pró-caspases, resultando em uma cascata proteolítica cada vez maior. [63]

3.11.1.2 PCNA

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) foi descrito como marcador da atividade proliferativa, é encontrado no núcleo sendo um cofator da DNA polimerase delta em células eucarióticas essencial para a replicação. O PCNA é um homotrímero e ajuda a aumentar a processabilidade da síntese da cadeia principal durante a replicação do DNA, onde atua como arcabouço para recrutar proteínas envolvidas na replicação do DNA, reparo do DNA e remodelação da cromatina.[63]

3.11.1.3 p27

Dois grupos de inibidores das quinases dependentes de ciclina (CKIs) são dominantes na biologia cardiovascular: a família CIP/KIP, que inclui o p21, p27 e p57, e a família INK4, que inclui p15, p16, p18 e p19.

Os danos ao coração ou aos vasos sanguíneos levam a um processo de remodelação, que é adaptativo em condições normais ou mal adaptativo em condições fisiopatológicas de doença. Em resposta a estímulos fisiológicos, as células da musculatura lisa vascular na camada média proliferam e migram para dentro da camada íntima, para formar uma lesão vascular de múltiplas camadas ou *neoíntima*.

Normalmente esse é um processo autolimitado que resulta em uma lesão vascular bem cicatrizada e na preservação do fluxo sanguíneo luminal. Em certas doenças vasculares, entretanto, a proliferação de células da musculatura lisa vascular se torna excessiva, levando a uma lesão patológica no vaso sanguíneo, a qual por sua vez produz sintomas clínicos. Essas doenças são frequentemente caracterizadas por inflamação local ou sistêmica, a qual exacerba a resposta proliferativa das células da musculatura lisa vascular. As CKIs da família CIP/KIP são reguladoras importantes da remodelação tecidual da vasculatura. A p27 (Kip1) é expressa constitutivamente em células da musculatura lisa vascular e nas células endoteliais das artérias, e é regulada de forma negativa após o dano vascular ou a exposição das células da musculatura lisa vascular e células endoteliais a mitógenos. Após a explosão proliferativa, as células da musculatura lisa vascular sintetizam e secretam moléculas de matriz extracelular, as quais sinalizam para outras células da musculatura lisa vascular e células endoteliais, levando a indução de p27 (Kip1) e p 21 (Cip1), e supressão da ciclina E-CDK2. A expressão de CKIs CIP/KIP leva a paralisação do ciclo celular e inibição da divisão celular. A p27 (Kip1) também é um importante regulador da inflamação tecidual através de seus efeitos da proliferação dos linfócitos T. Na vasculatura, a p27 (Kip1) medeia o reparo vascular através de sua regulação na proliferação, inflamação e células genitoras da medula óssea[8].

3.11.1.4 Ciclina D1

As proteínas essenciais nos pontos de controle do ciclo celular das células eucarióticas são as ciclinas e as quinases dependentes de ciclina (Cdks). As Cdks são complexos de holoenzimas que contêm subunidades ciclina reguladoras e subunidades Cdk catalíticas. Quatro fases distintas do ciclo celular são reguladas por complexos ciclina- Cdk: fase G1, fase S, fase G2 e fase M.[63]

O controle do ponto de restrição da fase G1 é mediado por duas CDKs, a quinases dependentes de ciclina D e E. As ciclinas do tipo D (D1, D2 e D3), interagem de forma combinatória com dois "parceiros" catalíticos, Cdk-4 e Cdk-6, no início da fase G1, para produzir pelo menos seis holoenzimas expressas em padrões histoespecíficos. A ciclina E entra em um complexo com sua parceira catalítica Cdk-2 e colabora com as quinases dependentes de ciclina D para completar a fosforilação da proteína supressora do tumor de retinoblastoma (Rb) mais tarde em G1, o que resulta no trânsito através do ponto de controle G1-S para fase S.[63]

3.11.1.5 ICAM-1

Existem duas grandes famílias de moléculas de adesão leucocitária. Os membros da superfamília de imunoglobulinas incluem estruturas como a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1). Essa última molécula é mais versátil que a primeira, tanto com os tipos de leucócitos com os quais se liga como pela sua ampla e constitutiva expressão em baixos níveis pelas células endoteliais em várias partes da circulação.[64]

3.11.1.6 IL-1 e IL-6

O processo inflamatório na parede endotelial é regulado por muitos mediadores que são secretadas tanto por células inflamatórias como por células da parede vascular. São chamados *citocinas*, tais como interleucinas (IL), quimiocinas, fatores estimulantes de colônias (CSF), fatores de necrose tumoral (TNF), interferons (IFN) e fatores transformadores de crescimento (TGF). O termo quimiocinas refere-se a uma grande família de citocinas estruturalmente relacionadas, com propriedades de quimioatração. São expressas por células da parede vascular e por leucócitos emigrados, interagem com receptores que ativam proteínas e vias de sinalização intra-celular. Suas propriedades são o recrutamento de leucócitos, interferem na homeostasia vascular e na formação da célula espumosa.[65]

3.11.1.7 TNF-DR4

Os receptores do fator de necrose tumoral são uma superfamília protéica de receptores de citocinas caracterizada pela capacidade de se ligar a fatores de necrose tumoral (TNFs) através de um domínio rico em cisteína extracelular. Estão primariamente envolvidos na apoptose e inflamação, mas também podem participar de outras vias de transdução de sinal, como proliferação, sobrevivência e diferenciação. Os receptores de TNF são expressos em uma ampla variedade celular, especialmente em leucócitos. As células endoteliais também expressam os receptores do TNF, pois é conhecido que na patogênese da aterosrosclerose precoce a permeabilidade da camada endotelial aumenta nos locais de predileção pela deposição das partículas de LDL. Essa permeabilidade é mediada por citocinas, sendo aumentada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e pelo interferon-gama (IFN-γ).[66]

3.11.1.8 VEGF-R1

Os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs) e receptores (VEGFRs) regulam tanto a vasculogênese, o desenvolvimento de vasos sangüíneos de células precursoras durante a embriogênese inicial, quanto a angiogênese, a formação de vasos sanguíneos a partir de vasos preexis*tent*es em um estágio posterior. A família de genes VEGF contém pelo menos 7 membros, enquanto a família de genes VEGFR tem 3 a 4 membros dependendo da espécie vertebrada. O VEGF-A e seus receptores VEGF-R1 e VEGF-R2 desempenham papéis importantes na angiogênese fisiológica bem como patológica.[67]

O VEGF também é conhecido como fator de permeabilidade vascular (VPF), foi originalmente descrito como um mitógeno específico para células endoteliais. O VEGF é produzido além das células endoteliais por muitos tipos de células, incluindo células tumorais, macrófagos, plaquetas, queratinócitos, e células mesangiais renais. As atividades do VEGF não se limitam ao sistema vascular; o VEGF desempenha um papel em funções fisiológicas normais, como a formação óssea, hematopoiese, cicatrização de feridas, e desenvolvimento.[68,69]

3.11.1.9 MCP-1

A proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (também chamada de quimiocina ligante 2 - CCL2) é expressa principalmente por células inflamatórias e células endoteliais. O nível de expressão é regulado positivamente após estímulos pró-inflamatórios e lesão tecidual. Uma das principais doenças na qual a MCP-1 desempenha papel importante na patogênese é a aterosclerose, doença progressiva que começa com o acúmulo de lipídios, lipoproteínas e células imunes na parede arterial. O processo aterosclerótico começa pela penetração de partículas circulantes ricas em apo-B por entre as células endoteliais, às quais são retidas no espaço subendotelial e sofrem modificações oxidativas e enzimáticas. Estas ativam o endotélio, que passa a produzir citocinas como a MCP-1 que atraem monócitos para o subendotélio. A interação entre moléculas de adesão de monócitos e células endoteliais

facilita a adesão monocitária do endotélio, sua fixação e, na sequência, sua penetração para região subendotelial.[65]

3.11.2 Descrição da técnica laboratorial para análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo

Após os diferentes tratamentos das diversas culturas celulares, nos períodos de 24 e 48 horas, as células foram fixadas em tampão FAC's Flow com paraformaldeído 4% por 1 hora. Após esse período as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, o botão celular ressuspendido em tampão FAC's Flow e as membranas permeabilizadas com Triton X-100 0,1%, por 30 minutos, a 4°C. Em seguida, adicionou-se 1 µg do anticorpo primário específico para as proteínas e receptores descriminados abaixo (Tabela 1). Após 24 horas de incubação, adicionou-se o Alexa-Fluor® 488 (Life Technologies Cód. Z25402) com albumina do soro bovino (BSA) 0,2%, por 24 horas, a 4°C protegidos da luz. Após a ligação específica dos anticorpos, as células foram lavadas e ressuspendidas em 200 µL de tampão FAC's Flow. A aquisição dos eventos celulares foi realizada no citômetro de fluxo Muse® Cell Analyzer (Merk KGaA, Darmstardt, Germany) em intensidade de fluorescência FL-1 (Alexa Fluor 488). Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o programa WinMDI 2.8.

Tabela 2 - Anticorpos primários específicos para proteínas e receptores utilizados na etapa de análise da expressão de marcadores celulares envolvidos nas vias de apoptose e necrose por citometria de fluxo

Anticorpo primário	Fabricante
VEGF-R1	AF-293-NA
p-27	sc-1641
MCP-1	sc-377082
TNF-DR4	ab13890
ICAM-1	R&D Systems BBA3
IL-1	sc-32294
IL-6	sc-57315
ciclina D1	sc-8396
caspase-3	ab13847
PCNA	ab29

VEGF-R1: Receptor 1 para o fator de crescimento vascular endotelial; p-27: proteína p-27; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1; TNF-DR4: receptor 4 do TNF (fator de necrose tumoral); ICAM-1: proteína quimiotática de monócitos-1; IL-1: interleucina 1; IL-6: interleucina-6; PCNA: antígeno nuclear de células em proliferação.

3.12 Análise estatística

Os valores numéricos foram expressos em média ± desvio padrão (DP). A análise estatística foi realizada utilizando o programa *GraphPad Prism™* 5. O nível de significância entre os diferentes grupos de tratamento foi determinado pelo método não paramétrico de variância de ANOVA de um fator seguido do teste comparativo múltiplo de TUKEY (0,5%). As comparações foram consideradas não significativas (n.s.), significativas nos níveis: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4 Resultados

4.1 Avaliação dos aspectos morfológicos das culturas de células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana tratadas com *stents* convencional e farmacológico

4.1.1 Avaliação dos aspectos morfológicos das monoculturas de células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana tratadas com *stents* convencional e farmacológico

O efeito dos *stents* convencionais e farmacológicos na monocultura de células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana foi fotodocumentado em todos os períodos de tratamento nas células endoteliais humanas e as alterações morfológicas observadas foram capturadas utilizando microscópio invertido Nikon Eclipse TS 100 e o programa NIS-Elements F. As alterações em sua morfologia estão evidenciadas nas Figuras 18 e 19.

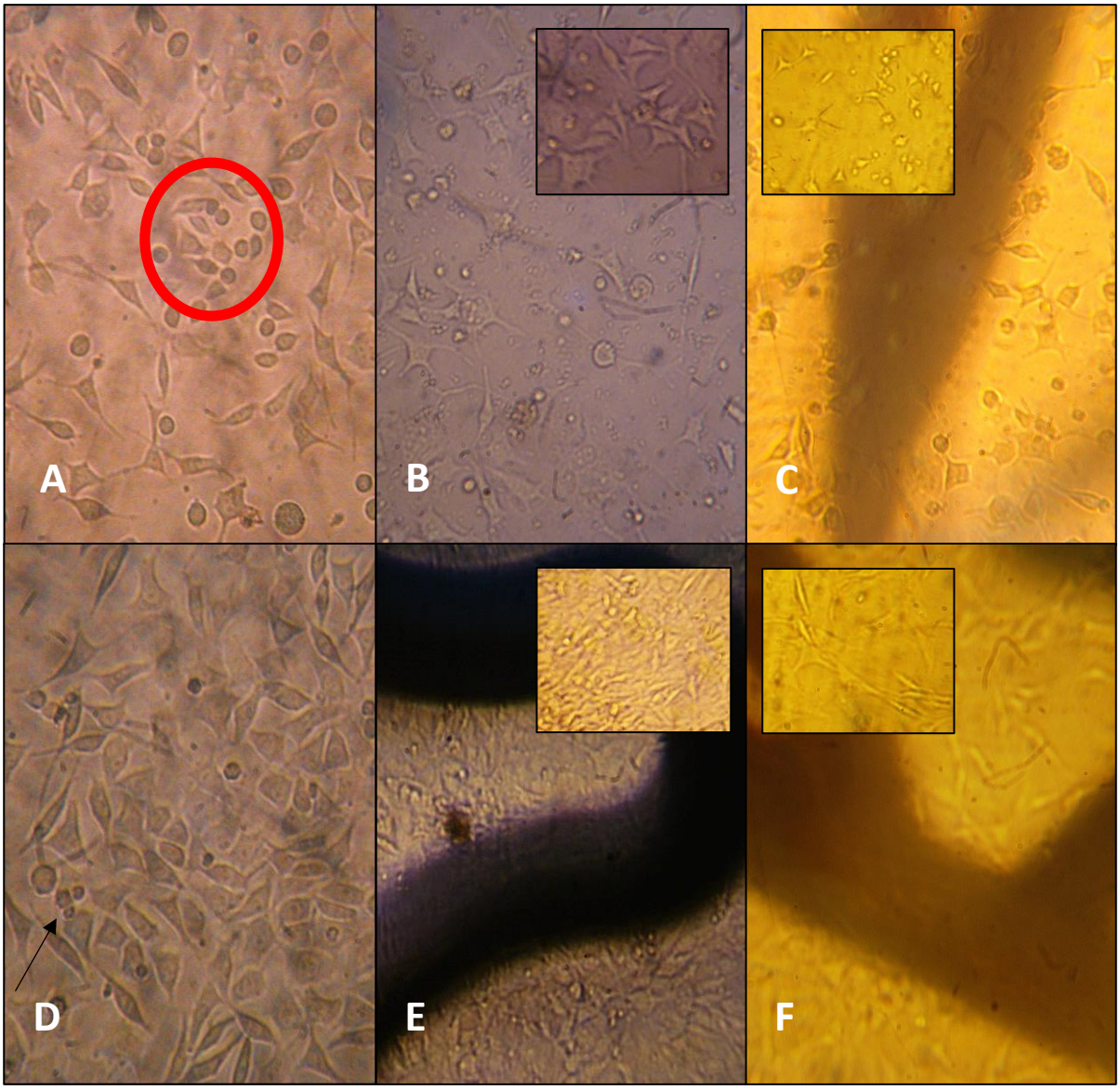


Figura 18- Fotomicrografia representativa das alterações celulares na monocultura com HUVEC e VSMC 24h. (A) Células HUVEC controle: observa-se células justapostas com aspecto epitelial com núcleo proeminente e central. Presença de células em proliferação celular (círculo vermelho); **(B)** células HUVEC com BMS. Células com aspecto epitelial com núcleo proeminente e central com projeções e prolongamentos citoplasmares (seta preta); **(C)** células HUVEC com DES: presença de algumas células picnóticas com aspecto de sofrimento; **(D)** células VSMC controle. Observa-se observa-se células alongadas com núcleo central, em destaque aspecto da densidade celular e presença de células em divisão celular (seta preta); **(E):** células VSMC com BMS, sem alteração importante no aspecto celular; **(F)** células VSMC com DES: observa-se pequena diminuição da densidade celular. **HUVEC:** células endoteliais humanas; **VSMC:** células musculares lisas de aorta humana; **BMS:** *stent* convencional; **DES:** *stent* farmacológico. Aumento de 20X. Magnificação de 30X.

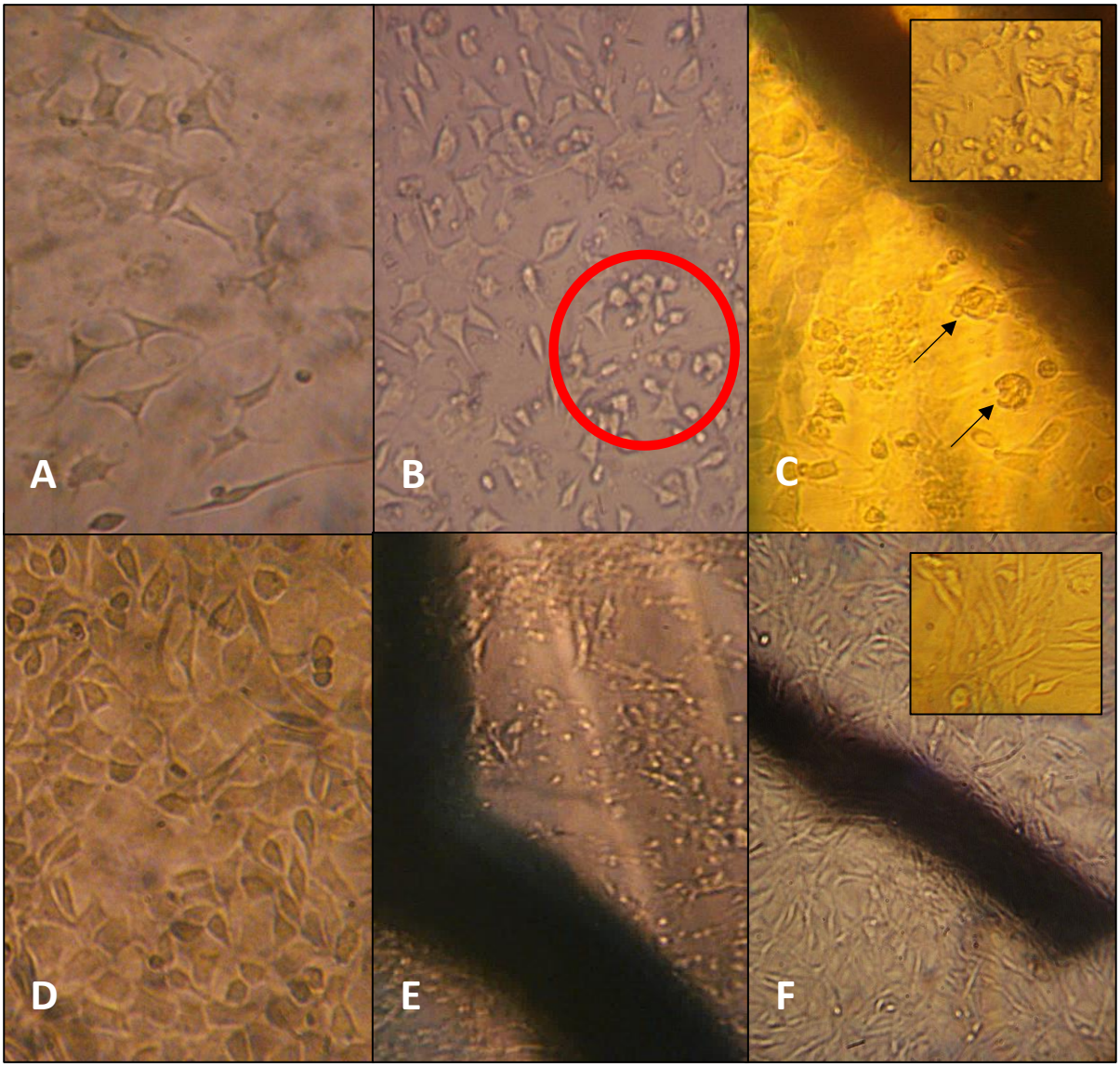


Figura 19- Fotomicrografia representativa das alterações celulares na monocultura com HUVEC e VSMC 48h. (A) Células HUVEC controle: observa-se células justapostas com aspecto epitelial com núcleo proeminente e central; **(B)** células HUVEC com BMS: aspecto de aumento da densidade celular com presença de células em divisão (círculo vermelho); **(C)** células HUVEC com DES: presença de células em sofrimento e também mortas (setas pretas); **(D)** células VSMC controle: observa-se observa-se células alongadas com núcleo central, **(E)** células VSMC com BMS: ocorreu aumento da densidade celular; **(F)** células VSMC com DES. **HUVEC:** células endoteliais humanas; **VSMC:** células musculares lisas de aorta humana; **BMS:** *stent* convencional; **DES:** *stent* farmacológico. Aumento de 20X. Magnificação de 30X.

4.1.2 Avaliação dos aspectos morfológicos das coculturas de células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana tratadas com *stents* convencional e farmacológico

O efeito dos *stents* convencionais e farmacológicos na cocultura de células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana foi fotodocumentado em todos os períodos de tratamento nas células endoteliais humanas e as alterações morfológicas observadas foram capturadas utilizando microscópio invertido Nikon Eclipse TS 100 e o programa NIS-Elements F. As alterações em sua morfologia estão evidenciadas nas Figuras 20 a 23.

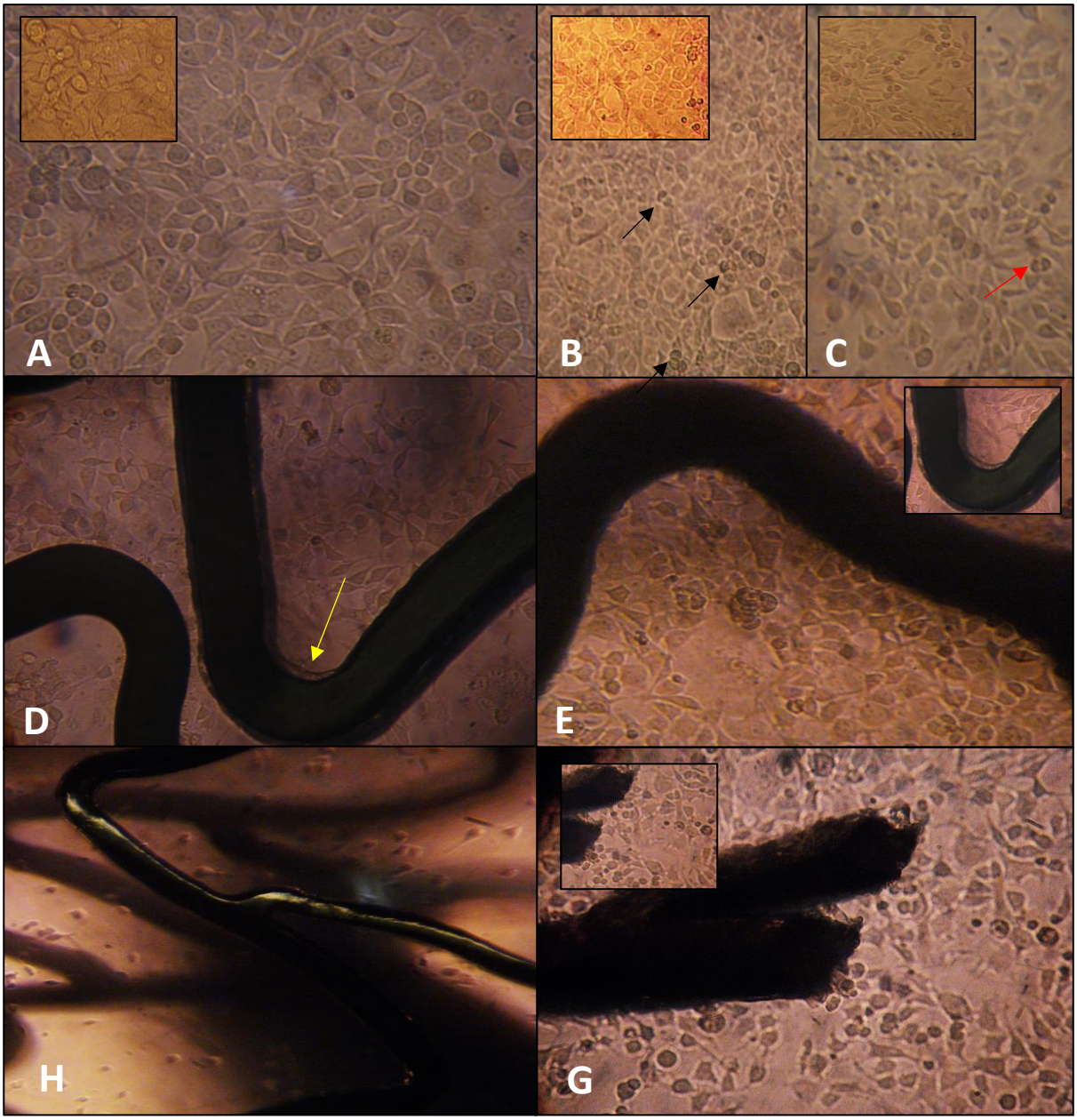


Figura 20- Fotomicrografia representativa das alterações celulares na cocultura Modelo II na presença de BMS ou DES no período 24 horas. (A) cocultura Modelo II sem *stent* (grupo controle): observa-se células HUVEC e VSMC; **(B)** HUVEC: observa-se células de aspecto epitelial com núcleo proeminente e central, justapostas (setas pretas); **(C)** VSMC: observa-se células alongadas com núcleo central, em destaque aspecto da densidade celular e presença de células em divisão celular (setas vermelhas); **(D e E)** cocultura Modelo II com BMS: as células crescem sobre as hastes dos *stents* tendendo a formar um revestimento; **(F e G)** cocultura base Modelo II com DES: observa-se células em sofrimento (de aspecto picnótico), células que se desprenderam da placa de cultura e algumas em divisão celular. **Cocultura Modelo-II:** células HUVEC na concentração de 0,5 x 10^5 cels/mL com células VSMC na concentração de 0,062 x 10^5 cels/mL**HUVEC:** células endoteliais humanas; **VSMC:** células musculares lisas de aorta humana; **BMS:** *stent* convencional; **DES:** *stent* farmacológcio. Em todas as fotos exceto H: aumento de 20X e magnificação de 30X. Na foto H: aumento de 10X e magnificação de 15X.

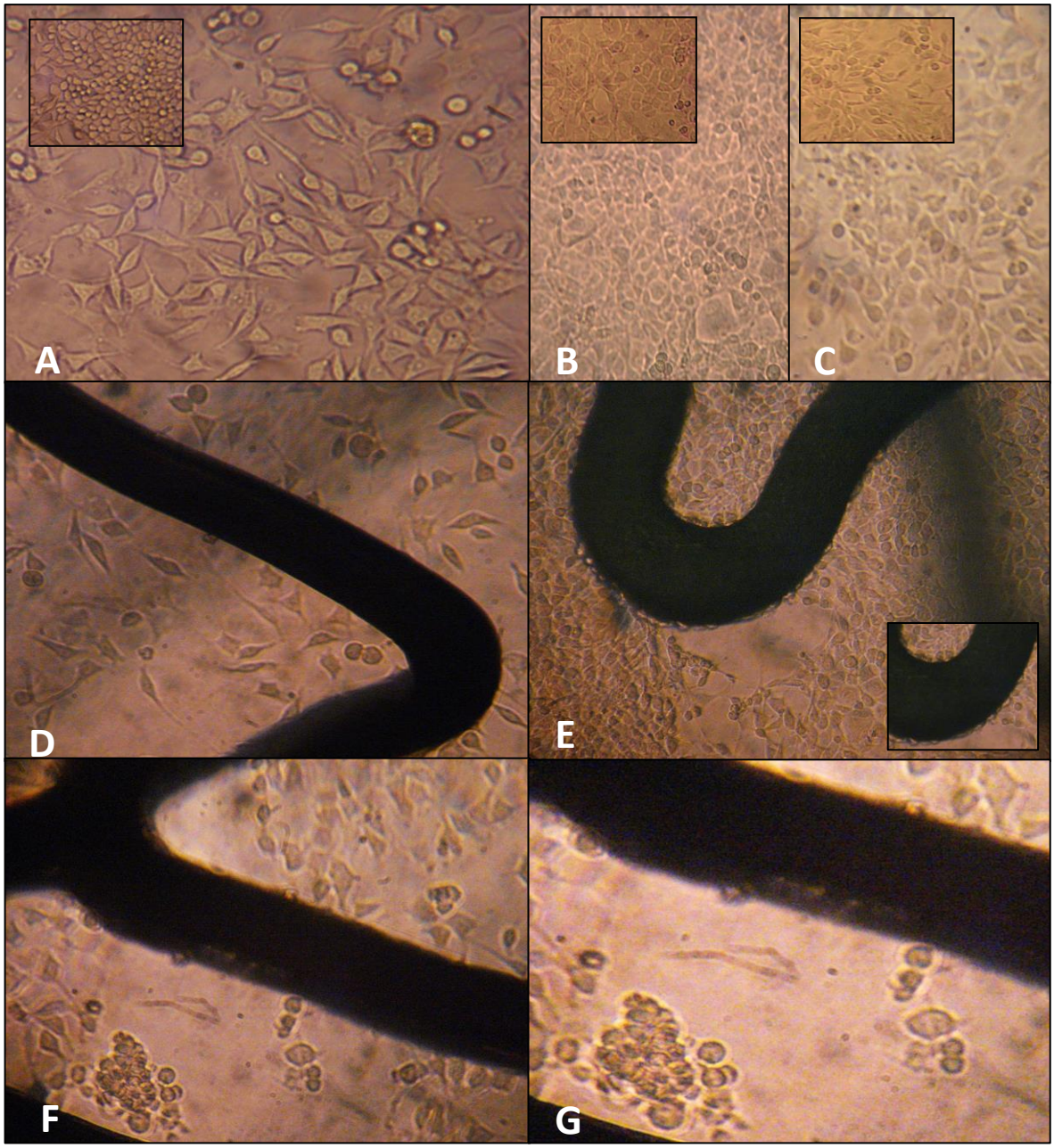


Figura 21- Fotomicrografia representativa das alterações celulares na cocultura Modelo-I na presença de BMS ou DES no período 24 horas. (A) cocultura Modelo I sem *stent* (grupo controle): células HUVEC e VSMC; **(B)** HUVEC: observa-se células de aspecto epitelial justapostas com núcleo proeminente e central; **(C)** células musculares lisas de aorta humana, observa-se células alongadas com núcleo central, em destaque aspecto da densidade celular e presença de células em divisão celular (setas pretas); **(D e E)** cocultura Modelo I com BMS: as células crescem sobre as hastes dos *stents* tendendo a formar um revestimento (no detalhe); **(F e G):** cocultura base Modelo I com DES: observa-se células em sofrimento (de aspecto picnótico), células que se desprenderam da placa de cultura e algumas em divisão celular. **Cocultura Modelo-I:** células VSMC na concentração de 0,5 x 10^5 cels/mL com células HUVEC na concentração de 0,062 x 10^5 cels/mL; **HUVEC:** células endoteliais humanas; **VSMC:** células musculares lisas de aorta humana. **BMS:** *stent* convencional; **DES:** *stent* farmacológcio. Aumento de 20X e magnificação de 30X.

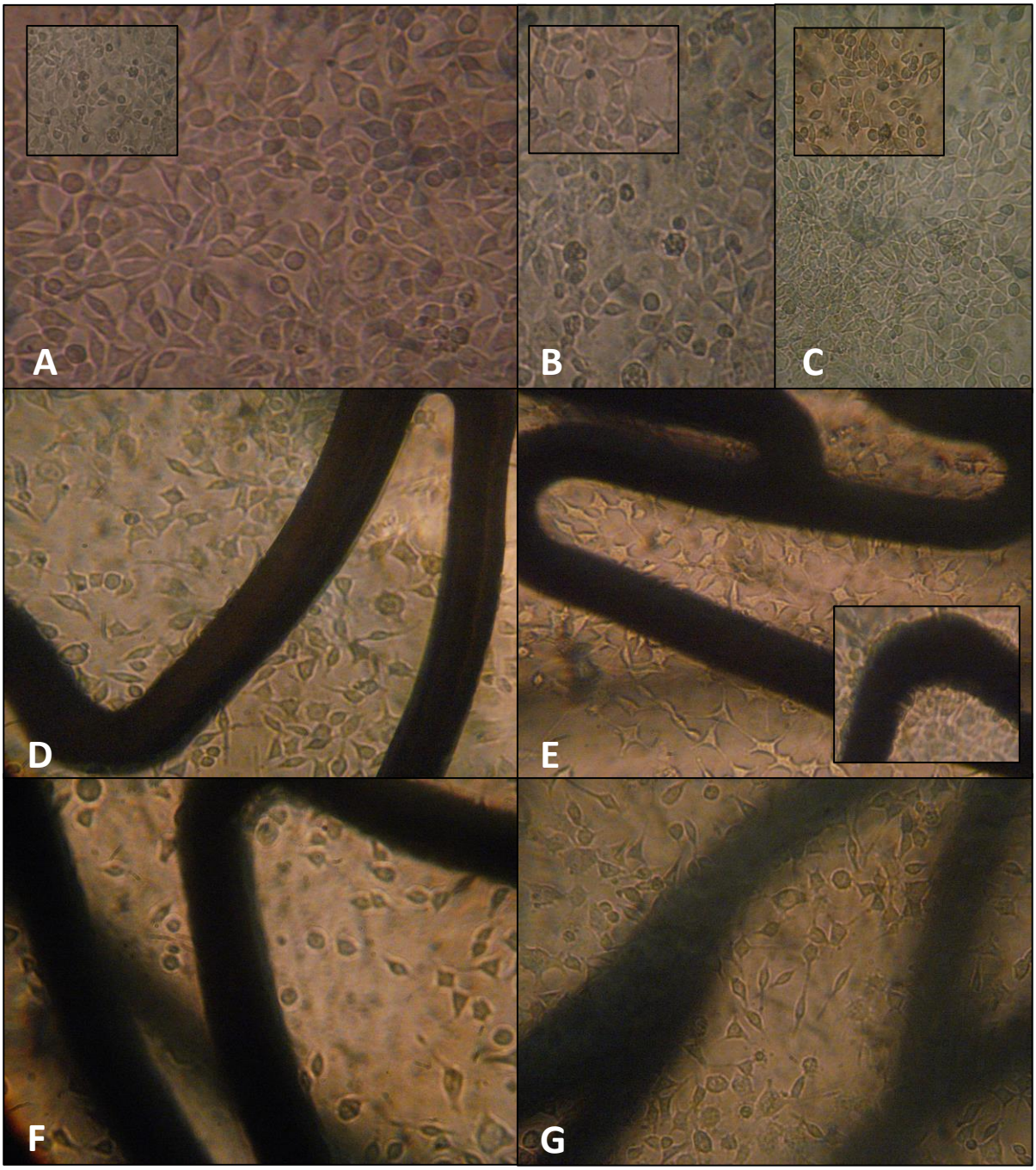


Figura 22- Fotomicrografia representativa das alterações celulares na cocultura Modelo II na presença de BMS ou DES no período 48 horas. (A) cocultura Modelo II sem *stent* (grupo controle): observa-se células HUVEC e VSMC; **(B)** HUVEC: observa-se células de aspecto epitelial com núcleo proeminente e central, justapostas; **(C)** VSMC: observa-se células alongadas com núcleo central, em destaque aspecto da densidade celular e presença de células em divisão celular; **(D e E)** cocultura Modelo II com BMS: as células crescem sobre as hastes dos *stents* tendendo a formar um revestimento; **(F e G)** cocultura base Modelo II com DES: observa-se células em sofrimento (de aspecto picnótico), células que se desprenderam da placa de cultura. **Cocultura Modelo-II:** células HUVEC na concentração de 0,5 x 10^5 cels/mL com células VSMC na concentração de 0,062 x 10^5 cels/mL; **HUVEC:** células endoteliais humanas; **VSMC:** células musculares lisas de aorta humana; **BMS:** *stent* convencional; **DES:** *stent* farmacológcio. Aumento de 20X e magnificação de 30X.

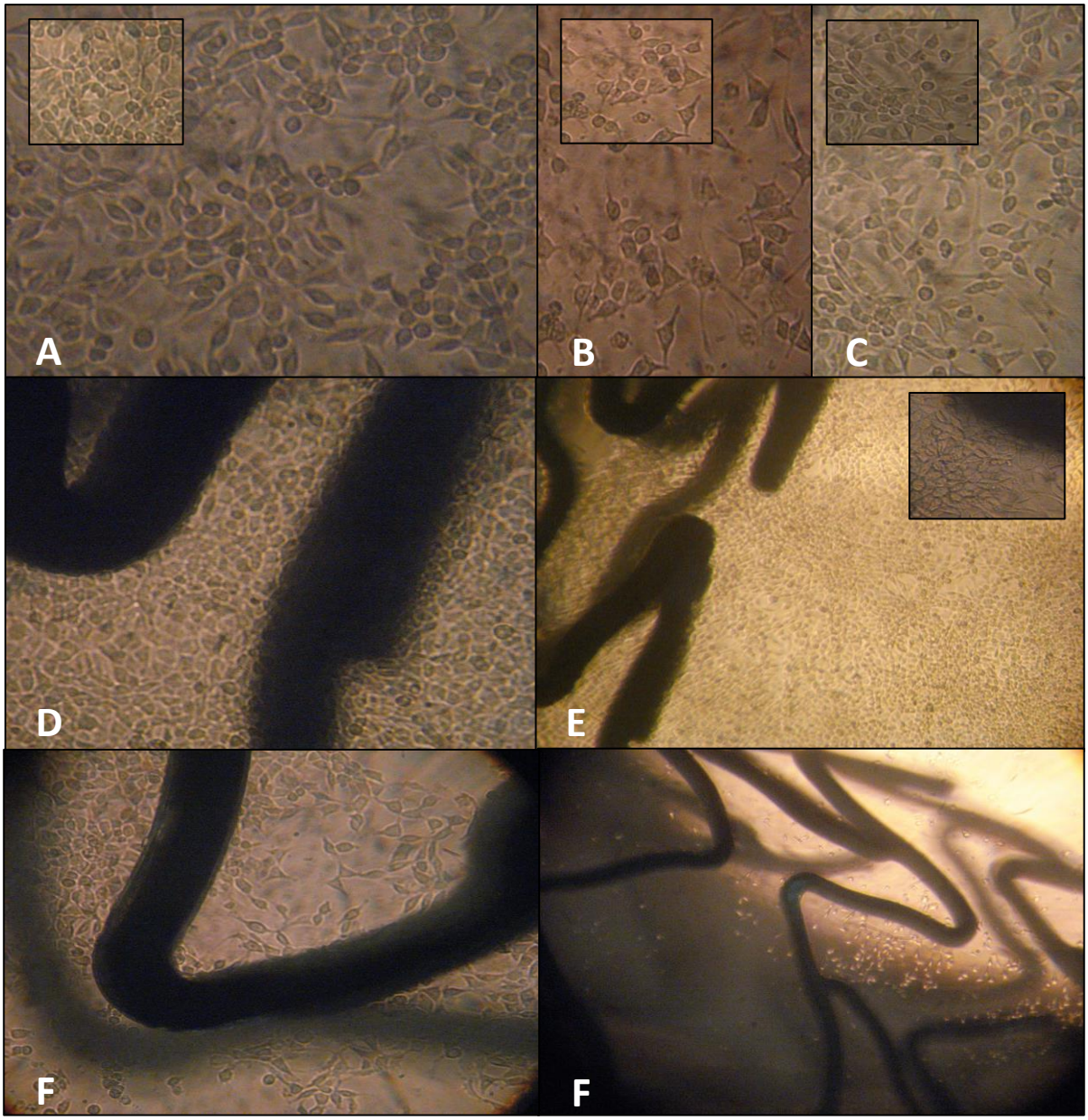


Figura 23- Fotomicrografia representativa das alterações celulares na cocultura Modelo I na presença de BMS ou DES no período 48 horas. (A) cocultura Modelo I sem *stent* (grupo controle): células HUVEC e VSMC; **(B)** HUVEC: observa-se células de aspecto epitelial justapostas com núcleo proeminente e central; **(C)** células musculares lisas de aorta humana, observa-se células alongadas com núcleo central, em destaque aspecto da densidade celular e presença de células em divisão celular; **(D e E)** cocultura Modelo I com BMS: as células crescem sobre as hastes dos *stents* tendendo a formar um revestimento; **(F e G):** cocultura base Modelo I com DES: observa-se células em sofrimento (de aspecto picnótico), células que se desprenderam da placa de cultura e algumas em divisão celular. **Cocultura Modelo-I:** células VSMC na concentração de 0,5 x 10^5 cels/mL com células HUVEC na concentração de 0,062 x 10^5 cels/mL; **HUVEC:** células endoteliais humanas; **VSMC:** células musculares lisas de aorta humana, **BMS:** *stent* convencional; **DES:** *stent* farmacológcio. Em todas as fotos exceto E e F: aumento de 20X e magnificação de 30X. Nas fotos E e F: aumento de 10X e magnificação de 15X.

4.1.3 Avaliação dos aspectos morfológicos das coculturas de células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana com PRP à 10% tratadas com *stents* convencional e farmacológico

O efeito dos *stents* convencionais e farmacológicos na cocultura de células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana com PRP à 10% foi fotodocumentado em todos os períodos de tratamento nas células endoteliais humanas e as alterações morfológicas observadas foram capturadas utilizando microscópio invertido Nikon Eclipse TS 100 e o programa NIS-Elements F. As alterações em sua morfologia estão evidenciadas nas Figuras 24 e 25.

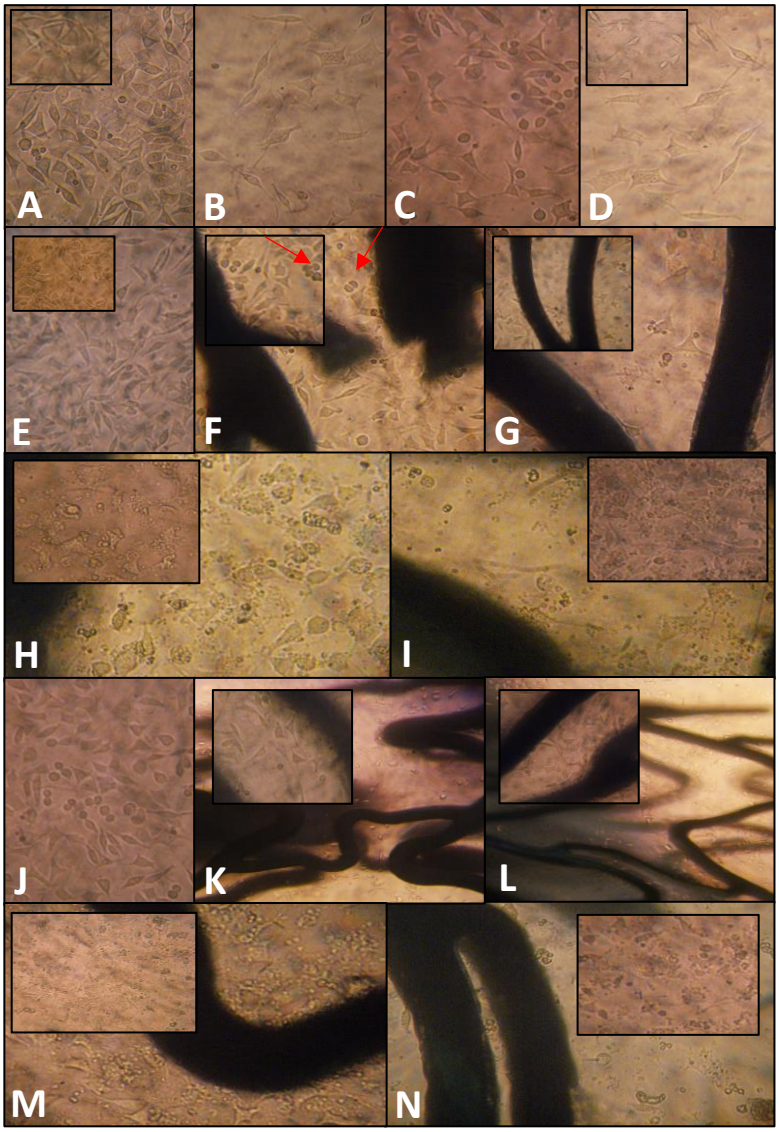


Figura 24- Fotomicrografia representativa das alterações celulares nas coculturas Modelos I e II com PRP na presença de BMS ou DES no período de 24 horas. (A) células VSMC na concentração de 0,5 x 10^5 cels/mL; **(B)** células VSMC na concentração de 0,062 x 10^5 cels/mL; **(C)** células HUVEC na concentração de 0,5 x 10^5 cels/mL; **(D)** células HUVEC na concentração de 0,062 x 10^5 cels/mL; **(E)** cocultura Modelo-I controle; **(F)** cocultura Modelo-I com BMS: observa-se alta densidade celular e setas em divisão (setas vermelhas); **(G)** cocultura Modelo-I com DES: observa-se diminuição da densidade celular e células picnóticas **(H)** cocultura Modelo-I com BMS e PRP: observa-se as plaquetas com aspecto refringente **(I)** cocultura Modelo-I com DES com PRP: observa-se as plaquetas com aspecto refringente e diminuição da densidade celular **(J)** cocultura Modelo-II controle; **(K)** cocultura Modelo-II com BMS; **(L):** cocultura Modelo-II com DES; **(M)** cocultura Modelo-II com BMS e PRP: observa-se elevada densidade celular as plaquetas com aspecto refringente **(N)** cocultura Modelo-II com DES com PRP: há uma diminuição importante da densidade celular. **Cocultura Modelo-I:** células VSMC na concentração de 0,5 x 10^5 cels/mL com células HUVEC na concentração de 0,062 x 10^5 cels/mL; **cocultura Modelo-II:** células HUVEC na concentração de 0,5 x 10^5 cels/mL com células VSMC na concentração de 0,062 x 10^5 cels/mL. **VSMC:** células musculares lisas de aorta humana; **HUVEC:** células endoteliais humanas; **BMS:** *stent* convencional; **DES:** *stent* farmacológico; **PRP:** soro rico em plaquetas; Em todas as fotos exceto K e L: aumento de 20X e magnificação de 30X. Nas fotos K e L: aumento de 10X e magnificação de 15X.

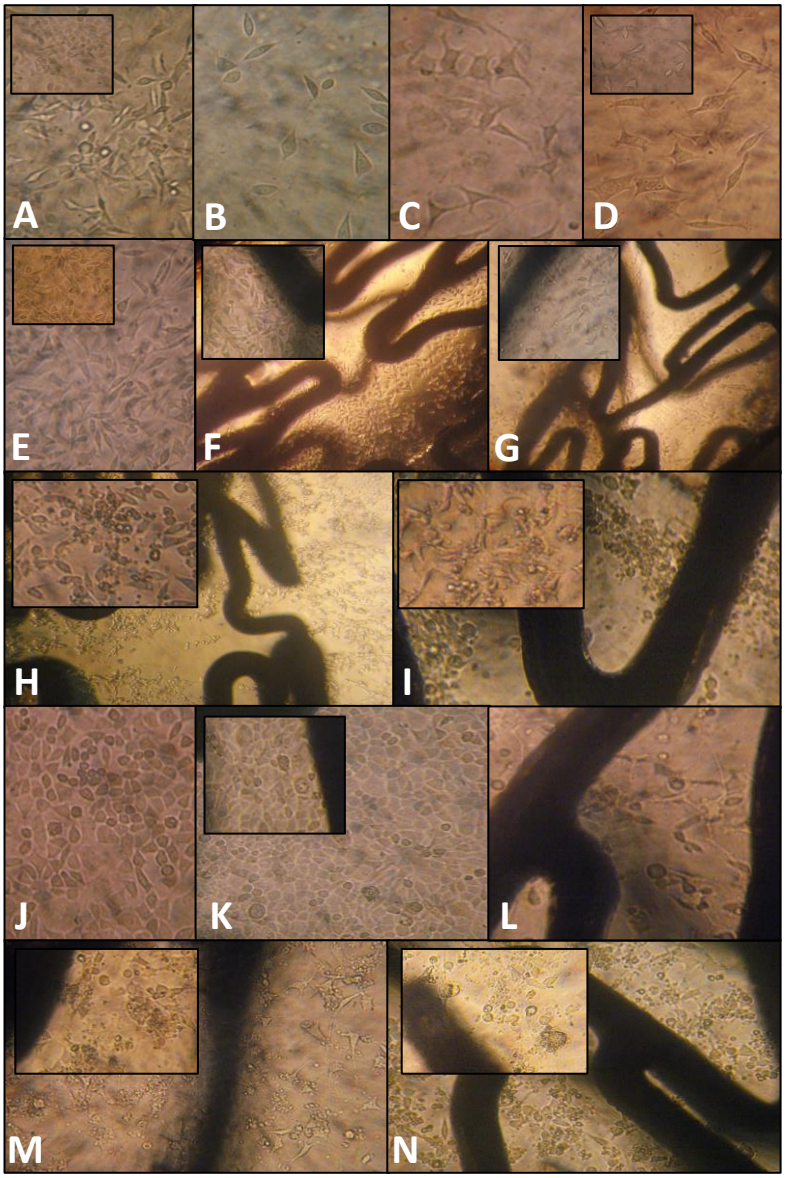


Figura 25- Fotomicrografia representativa das alterações celulares na cocultura Modelos I e II com PRP na presença de BMS ou DES no período de 48 horas. (A) células VSMC na concentração de 0,5 x 10^5 cels/mL; **(B)** células VSMC na concentração de 0,062 x 10^5 cels/mL; **(C)** células HUVEC na concentração de 0,5 x 10^5 cels/mL; **(D)** células HUVEC na concentração de 0,062 x 10^5 cels/mL; **(E)** cocultura Modelo-I controle; **(F)** cocultura Modelo-I com BMS: elevada densidade celular e crescimento celular sobre as hastes **(G)** cocultura Modelo-I com DES: diminuição da densidade celular e células com aspecto de sofrimento **(H)** cocultura Modelo-I com BMS e PRP; **(I)** cocultura Modelo-I com DES com PRP; **(J)** cocultura Modelo-II controle; **(K)** cocultura Modelo-II com BMS; **(L)** cocultura Modelo-II com DES; **(M)** cocultura Modelo-II com BMS e PRP: observa-se as plaquetas com aspecto refringente **(N)** cocultura Modelo-II com DES com PRP: baixa densidade celular e plaquetas com aspceto refringente. **Cocultura Modelo-I:** células VSMC na concentração de 0,5 x 10^5 cels/mL com células HUVEC na concentração de 0,062 x 10^5 cels/mL; **cocultura Modelo-II:** células HUVEC na concentração de 0,5 x 10^5 cels/mL com células VSMC na concentração de 0,062 x 10^5 cels/mL. **VSMC:** células musculares lisas de aorta humana; **HUVEC:** células endoteliais humanas; **BMS:** *stent* convencional; **DES:** *stent* farmacológico; **PRP:** soro rico em plaquetas. Em todas as fotos exceto F,G e H: aumento de 20X e magnificação de 30X. Nas fotos F,G e H aumento de 10X e magnificação de 15X.

4.2 Avaliação da viabilidade celular e determinação da IC_{50} após o tratamento com o sirolimo em células endoteliais humanas e células musculares lisas arteriais de aorta humana

O teste colorimétrico do MTT avalia a atividade de enzimas que reduzem o MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-1)2,5-difeniltetrazólio brometo] (Sigma Aldrich Cód. M2128) a cristais de formazam. Esses cristais foram eluídos e mensurados com o uso de um espectofotômetro para microplacas.

O ensaio colorimétrico do MTT foi realizado a fim de avaliar a viabilidade celular e calcular os valores da concentração mínima do everolimo capaz de inibir 50% da concentração celular *in vitro* (IC_{50}) após o tratamento em diversas concentrações e por diferentes tempos de tratamento (24 e 48 horas) nas células endoteliais humanas e células musculares lisas arteriais de aorta humana.

4.2.1 Avaliação da viabilidade celular e determinação da IC_{50} após o tratamento com o everolimo em células endoteliais humanas

Os resultados demonstraram em ambos os períodos de tratamento com o sirolimo houve citotoxicidade nas células endoteliais humanas (Figuras 26 e 28), sendo a IC_{50} calculada de 14,85 μM (R^2 0,9559) no período de 24 horas. Após 48 horas de tratamento com sirolimo, a IC_{50} calculada nas células endoteliais humanas foi 10,47 μM (R^2 0,9508). Nas células endoteliais humanas a IC_{50} diminuiu conforme o tempo de tratamento aumentou de 24 para 48 horas, demonstrando o seu potencial citotóxico em função do tempo de tratamento.

O efeito da citotoxicidade causado pelo everolimo foi fotodocumentado em todos os períodos de tratamento nas células endoteliais humanas e as alterações morfológicas observadas foram capturadas utilizando microscópio invertido Nikon Eclipse TS 100 e o programa NIS-Elements F. As alterações em sua morfologia na dependência das diferentes concentrações de everolimo utilizado nos tratamentos estão evidenciadas nas Figuras 27 e 29.

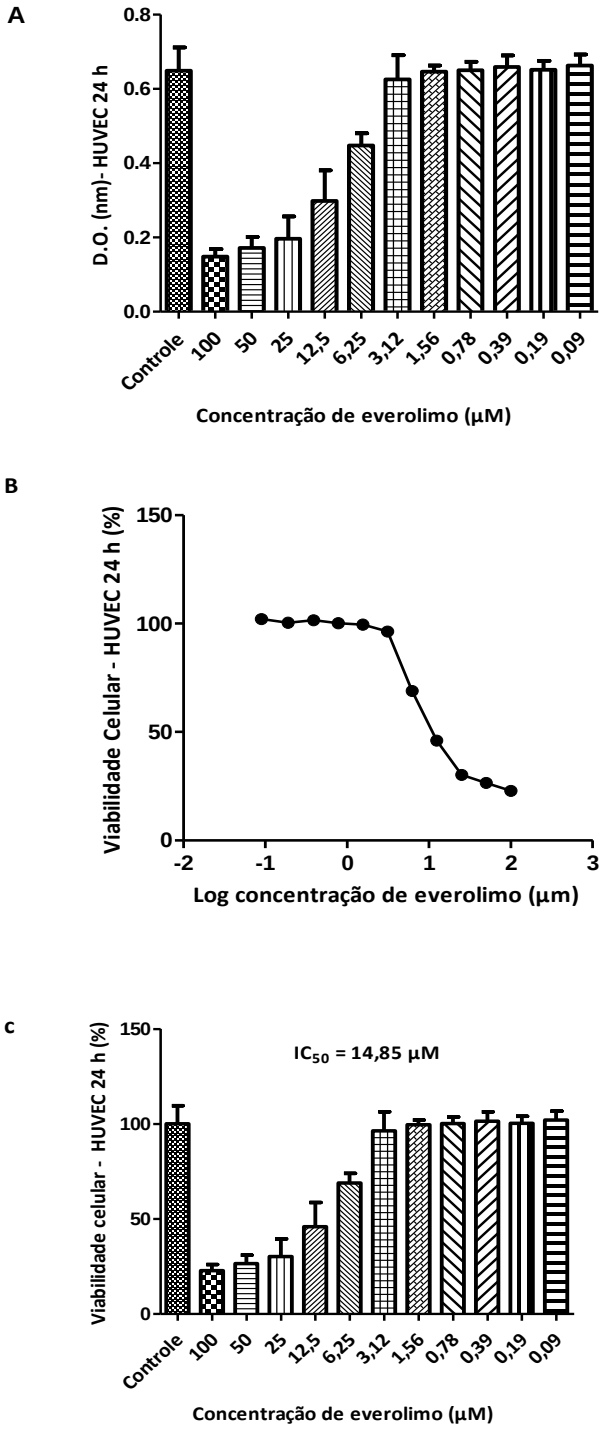


Figura 26- Determinação da IC_{50} após o tratamento com o everolimo por 24 horas em células endoteliais humanas. **A:** Distribuição das médias e desvio padrão da D.O. em função das diferentes concentrações do sirolimo. **B:** Representação do Log da concentração de everolimo em relação à viabilidade celular após linearização dos dados para obter a equação da reta (a normalização dos dados foi realizada considerando o valor da D.O. do controle como 100%). **C:** Distribuição das médias e desvio padrão da viabilidade celular em função das diferentes concentrações do everolimo para determinação da IC50%. D.O.: densidade ótica; nm: nanômetro; HUVEC: células endoteliais humanas; µM: micromolar.

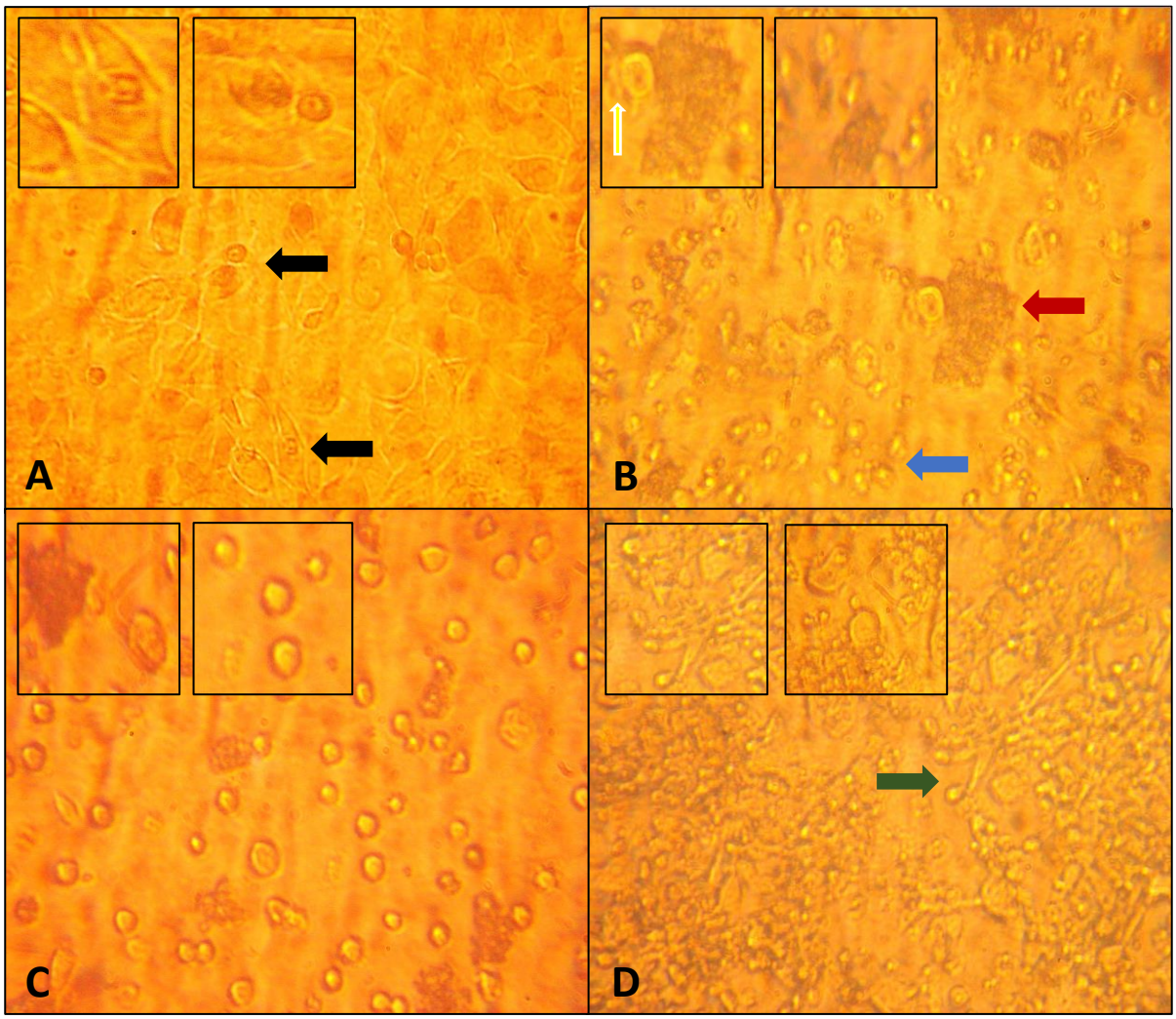


Figura 27- Fotomicrografia representativa das alterações celulares em células endoteliais humanas, após 24 horas de tratamento com everolimo. **A:** grupo controle, observa-se células de aspecto epitelial com núcleo proeminente e central, justapostas, (setas pretas e no destaque à esquerda) e células em divisão celular (destaque à direita); **B:** grupo tratado com 25 μM de everolimo, observa-se diminuição significativa da densidade celular, em destaque a formação de corpos apoptóticos com modificações da membrana celular e a presença de "bleebs" (seta branca no destaque à esquerda) células esféricas (setas azuis) e grande quantidade de debri celular (setas vermelhas); **C:** grupo tratado com 12,5 μM de everolimo, observa-se perda da adesão celular a superfície da placa de cultura, células em formato esférico (destaque à direita) e uma pequena quantidade de agregados celulares (destaque à esquerda); **D:** grupo tratado com 6,25 μM de everolimo, observa-se moderada perda da adesão e densidade celular, algumas células apresentam expansões em seus prolongamentos de aspecto fusiforme (seta marrom e destaque à esquerda) e outras exibem aspecto arredondado (destaque à direita). Fotomicrografia obtida em microscópio de luz invertido Nikon Eclipse TS100, aumento de 20X, magnificação 30X.

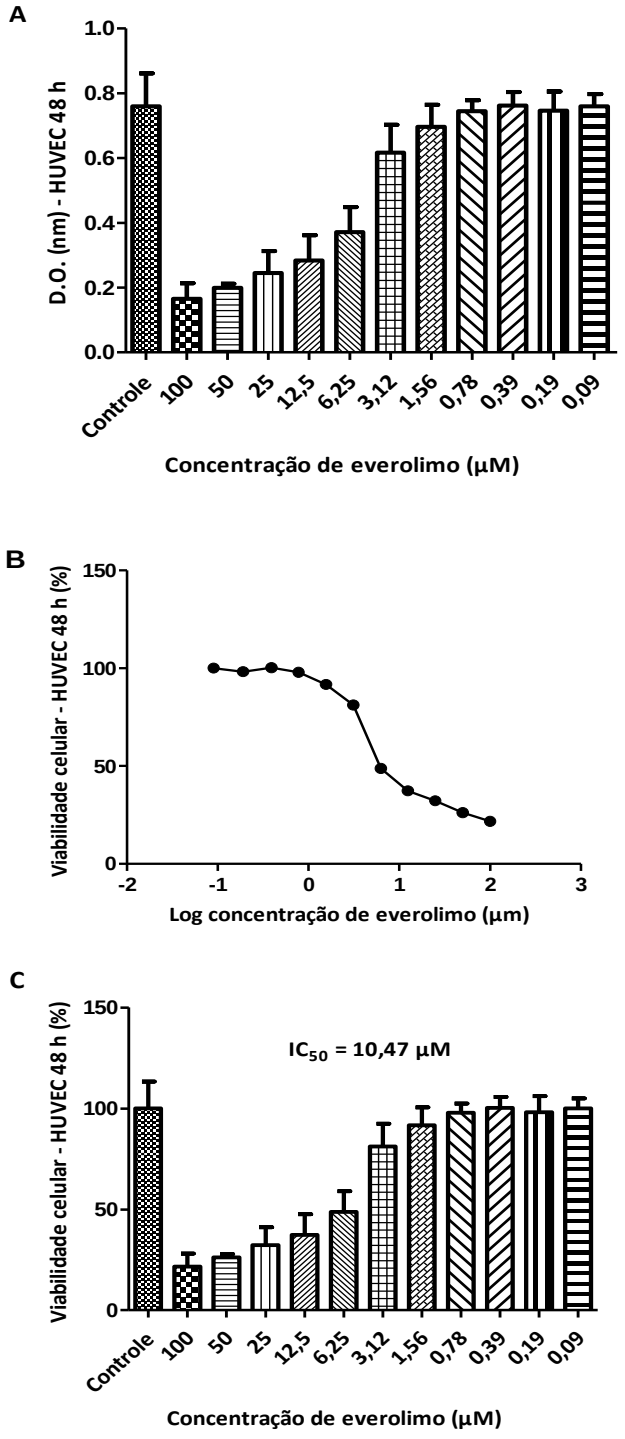


Figura 28- Determinação da IC_{50} após o tratamento com o everolimo por 48 horas em células endoteliais humanas. A: Distribuição das médias e desvio padrão da D.O. em função das diferentes concentrações do sirolimo. **B:** Representação do Log da concentração de everolimo em relação à viabilidade celular após linearização dos dados para obter a equação da reta (a normalização dos dados foi realizada considerando o valor da D.O. do controle como 100%). **C:** Distribuição das médias e desvio padrão da viabilidade celular em função das diferentes concentrações do everolimo para determinação da IC50%. D.O.: densidade ótica; nm: nanômetro; HUVEC: células endoteliais humanas; µM: micromolar.

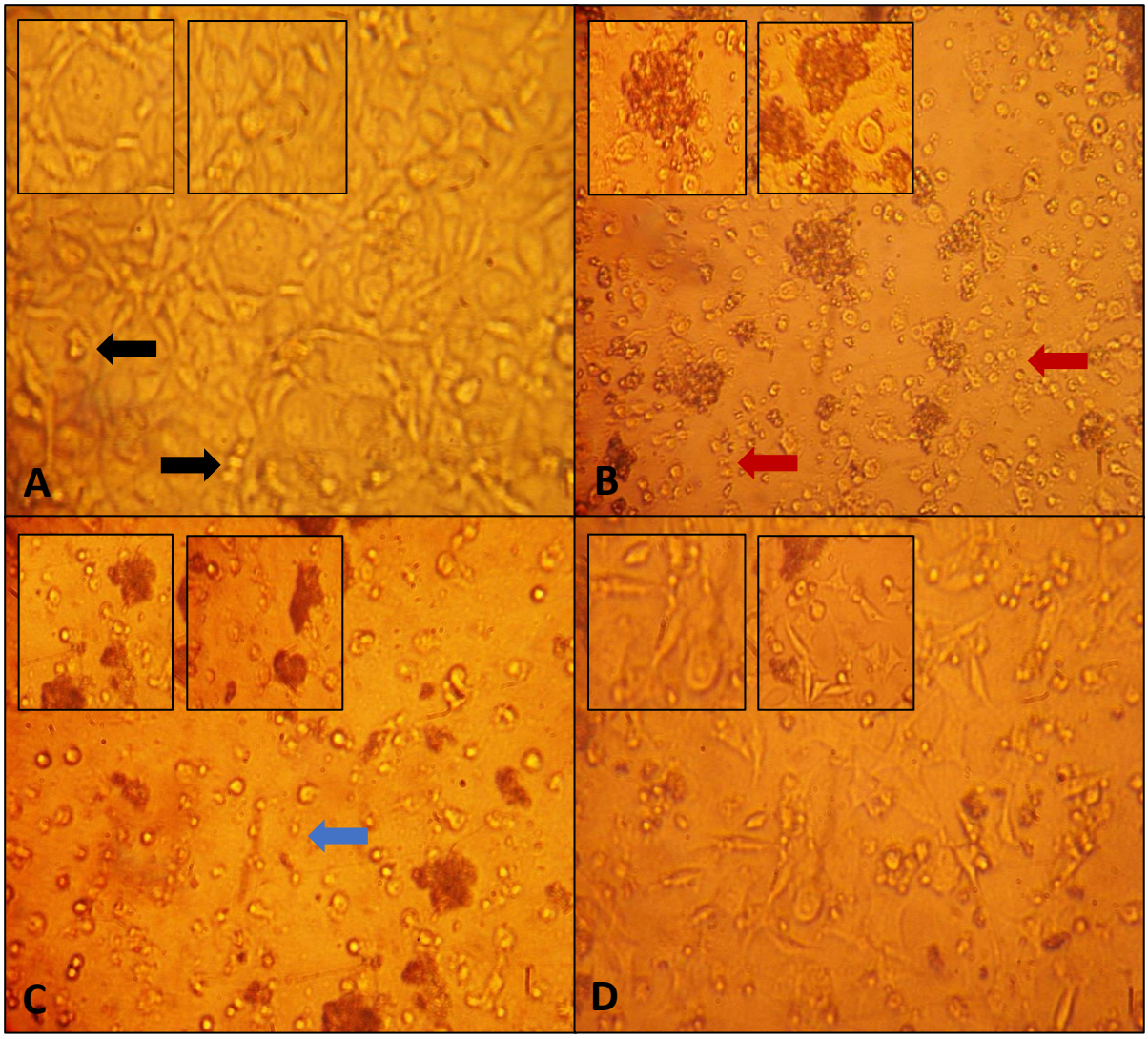


Figura 29- Fotomicrografia representativa das alterações celulares em células endoteliais humanas, após 48 horas de tratamento com everolimo. A: grupo controle, observa-se células de aspecto epitelial com núcleo proeminente e central, justapostas, com rearranjo juncional e formação tubular (destaque à esquerda) e algumas em divisão celular (setas pretas); **B:** grupo tratado com 25 μM de everolimo, observa-se diminuição significativa da densidade celular, pleomorfismo no seu volume e no núcleo (setas vermelhas) e no destaque a formação de debri celular; **C:** grupo tratado com 6,25 μM de everolimo, observa-se significativa perda da adesão celular a superfície da placa de cultura, células em formato esférico (setas azuis) e uma quantidade de agregados celulares em ambos os destaques; **D:** grupo tratado com 3,125 μM de everolimo, observa-se discreta perda da adesão e da densidade celular, algumas células apresentam expansões em seus prolongamentos de aspecto fusiforme, no destaque à esquerda temos a presença de células em processo de apoptose, com "bleebs" de membrana celular e no destaque à direita podemos observar a perda da disposição juncional para o rearranjo tubular. Fotomicrografia obtida em microscópio de luz invertido Nikon Eclipse TS100, aumento de 20X, magnificação 30X.

4.2.2 Avaliação da viabilidade celular e determinação da IC_{50} após o tratamento com o everolimo em células musculares lisas de aorta humana

Os resultados demonstraram em ambos os períodos de tratamento com o sirolimo houve citotoxicidade nas células musculares lisas de aorta humana, sendo a IC50% calculada de 9,48 μM (R^2 0,9506) no período de 24 horas. Após 48 horas de tratamento com everolimo, a IC_{50} calculada nas células musculares lisas de aorta humana foi 22,24 μM (R^2 0,9545). A IC_{50} das células musculares lisas de aorta humana aumentou conforme o tempo de tratamento aumentou de 24 para 48 horas, evidenciando que essas células foram menos sensíveis ao everolimo em comparação às primeiras. Figuras 30 e 32.

O efeito de citotoxicidade causado pelo everolimo foi fotodocumentado em todos os períodos de tratamento nas células musculares lisas de aorta humana e as alterações morfológicas observadas foram capturadas utilizando microscópio invertido Nikon Eclipse TS 100 e o programa NIS-Elements F. As alterações em sua morfologia na dependência das diferentes concentrações de sirolimo utilizado nos tratamentos estão evidenciadas nas Figuras 31 e 33.

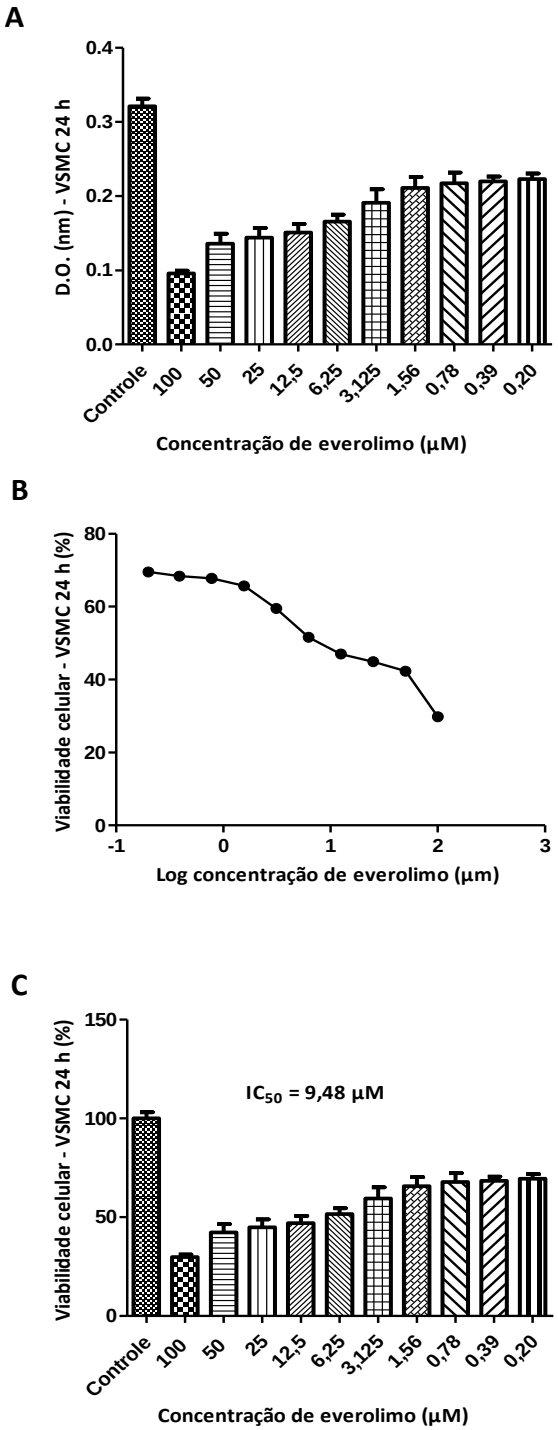


Figura 30- Determinação da IC_{50} após o tratamento com o sirolimo por 24 horas em células musculares lisas arteriais de aorta humana. A: Distribuição das médias e desvio padrão da D.O. em função das diferentes concentrações do sirolimo. **B:** Representação do Log da concentração de everolimo em relação à viabilidade celular após linearização dos dados para obter a equação da reta. **C:** Distribuição das médias e desvio padrão da viabilidade celular em função das diferentes concentrações do everolimo para determinação da IC50%. D.O.: densidade ótica; nm: nanômetro; VSMC: células musculares lisas arteriais de aorta humana; µM: micromolar.

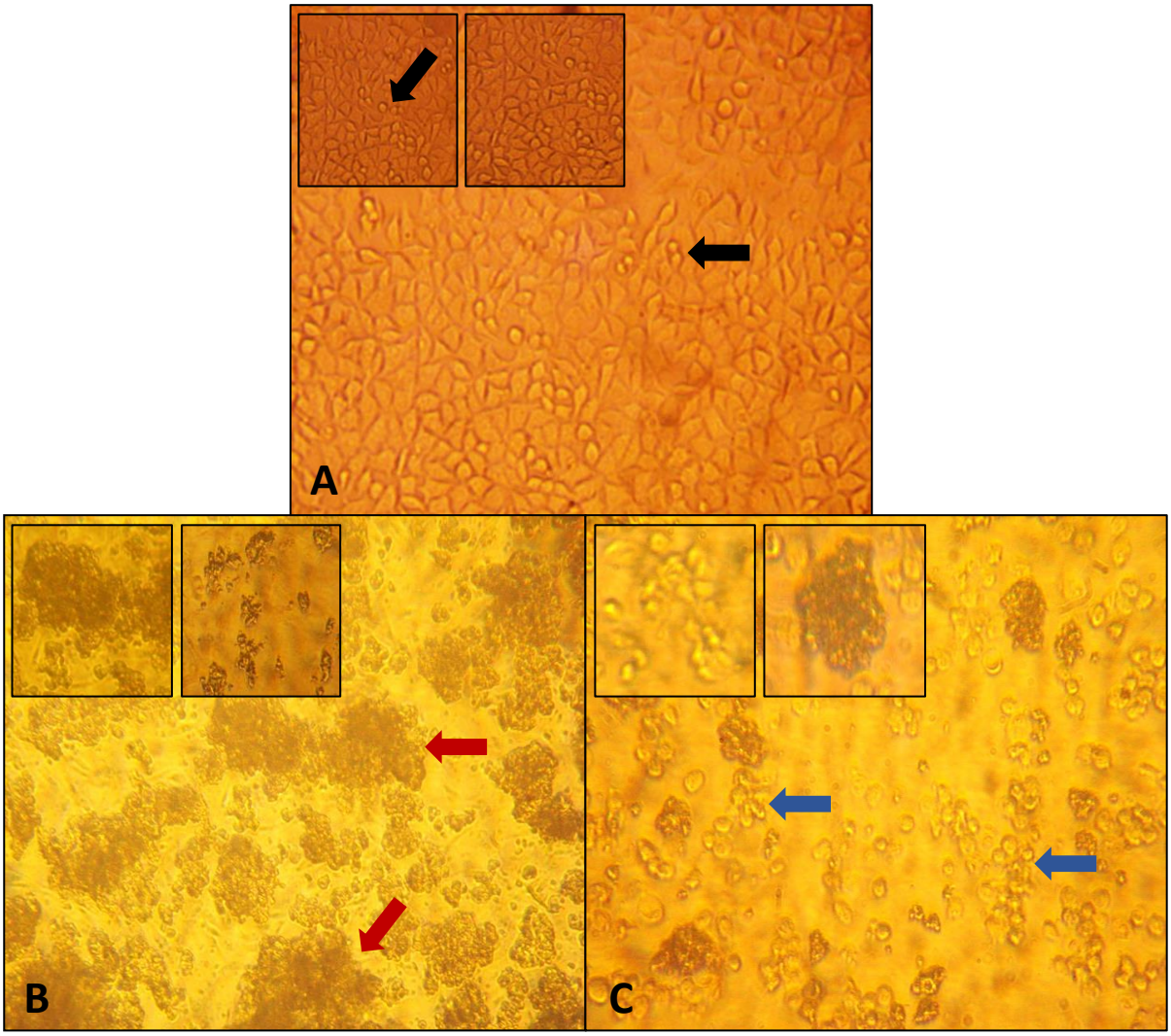


Figura 31- Fotomicrografia representativa das alterações celulares em células musculares lisas de aorta humana, após 24 horas de tratamento com everolimo. **A:** grupo controle, observa-se células alongadas com núcleo central, em destaque aspecto da densidade celular e presença de células em divisão celular (setas pretas). **B:** grupo tratado com 25 μM de everolimo, observa-se diminuição da densidade celular, formação de agrupamentos celulares agregados no sobrenadante (setas vermelhas e também no destaque à esquerda), perda da adesão celular e grande quantidade de debri celular (destaque da direita). **C:** grupo tratado com 3,125 μM de everolimo, observa-se células em formato esférico (setas azuis e destaque à esquerda), agregados celulares e formação de debris (destaque à direita). VSMC: células musculares lisas arteriais de aorta humana. Fotomicrografia obtida em microscópio de luz invertido Nikon Eclipse TS100, aumento de 20X, magnificação 30X.

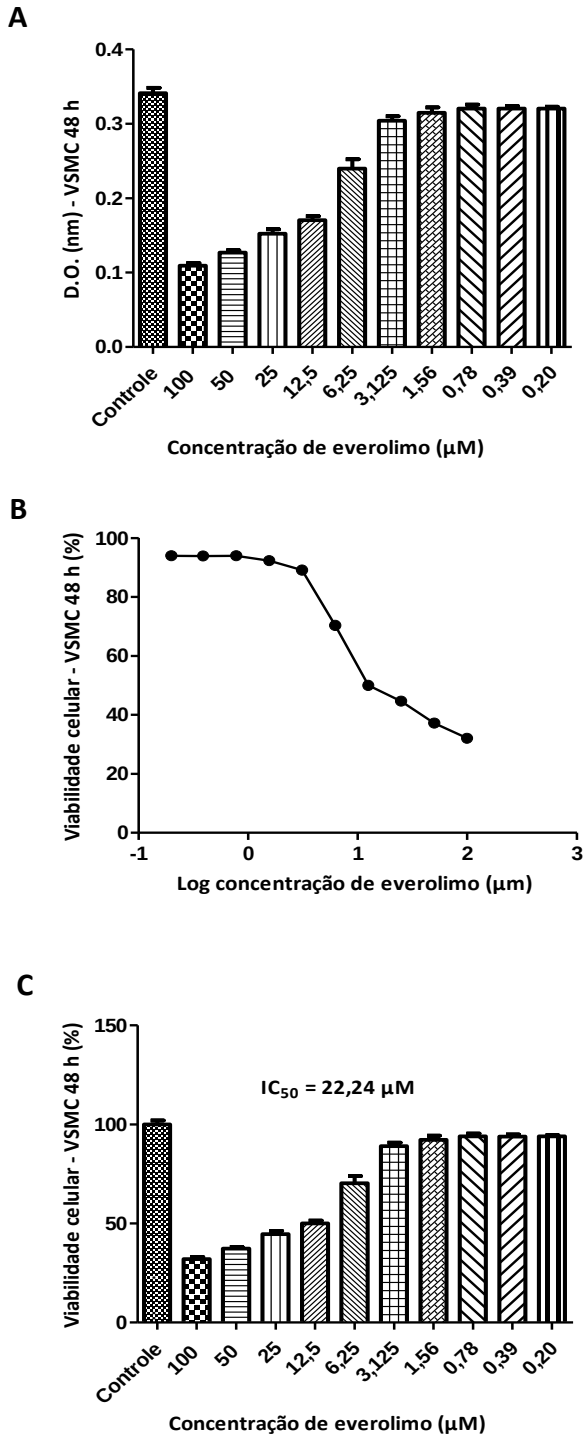


Figura 32- Determinação da IC_{50} após o tratamento com o everolimo por 48 horas em células musculares lisas arteriais de aorta humana. A: Distribuição das médias e desvio padrão da D.O. em função das diferentes concentrações do everolimo. B: Representação do Log da concentração de everolimo em relação à viabilidade celular após linearização dos dados para obter a equação da reta. C: Distribuição das médias e desvio padrão da viabilidade celular em função das diferentes concentrações do everolimo para determinação da IC_{50}. D.O.: densidade ótica; nm: nanômetro; VSMC: células musculares lisas arteriais de aorta humana; µM: micromolar.

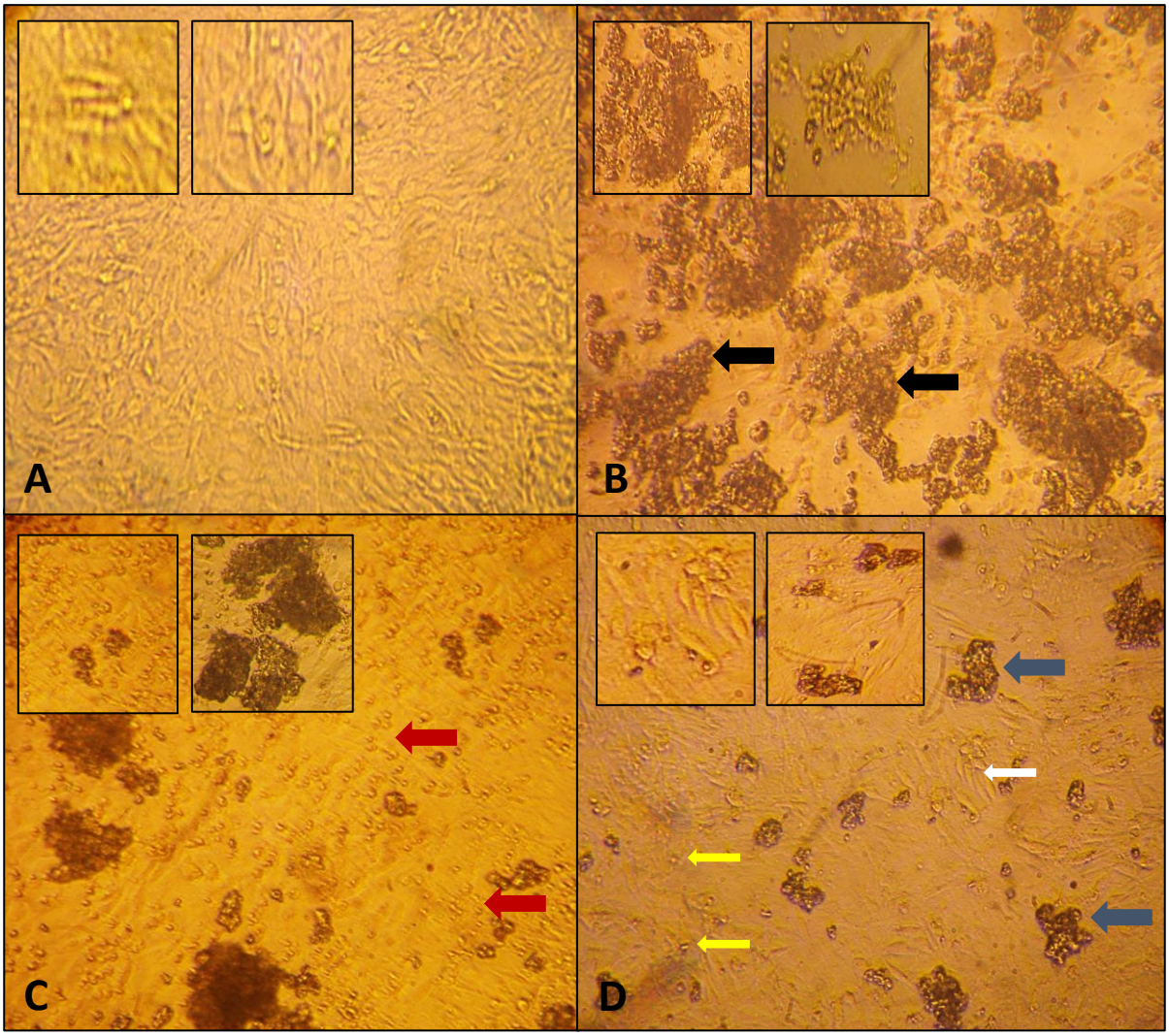


Figura 33- Fotomicrografia representativa das alterações celulares em células musculares lisas de aorta humana, após 48 horas de tratamento com everolimo. **A:** grupo controle, observa-se células alongadas com núcleo central, com alta densidade celular e presença de células em divisão celular (no destaque); **B:** grupo tratado com 25μM de everolimo, observa-se diminuição significativa da densidade celular, formação de grandes agrupamentos celulares agregados no sobrenadante (setas pretas e no destaque à esquerda), perda da adesão celular e formação de corpos apoptóticos e grande quantidade de debri celular no sobrenadante (destaque à direita); **C:** grupo tratado com 3,125 μM de everolimo, observa-se células em formato esférico (setas vermelhas e no destaque à esquerda), agregados celulares (destaque à direita) e a presença de debris; **D:** grupo tratado com 1,65 μM de everolimo, observa-se a presença de moderados agregados no sobrenadante (setas azuis e no destaque à direita), células arredondadas (setas amarelas), alongadas (seta branca) e no destaque à esquerda células aderidas a superfície da placa de cultura. Fotomicrografia obtida em microscópio de luz invertido Nikon Eclipse TS100, aumento de 20X, magnificação 30X.

4.3 Determinação da formação de peróxidos lipídicos

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada segundo a metodologia de Ohkawa *et al.* (1979), descrita previamente. Utilizando-se essa técnica foi possível avaliar a degradação oxidativa de ácidos graxos presentes em sobrenadante das culturas celulares quantificando a produção de ácido tiobarbitúrico (TBARS) predominantemente o malondialdeido (MDA) recolhido dos (as):

- teste colorimétrico do MTT em 24 e 48 horas;
- monocultura de células endoteliais humanas (Grupo 1) e de células musculares lisas de aorta humana (Grupo 2) na presença de stens convencionais ou farmacológicos em 24 e 48 horas;
- cocultura de células endoteliais humanas e de células musculares lisas de aorta humana na presença de stens convencionais ou farmacológicos em 24 e 48 horas (Grupos 3 e 4, Modelo-I e Modelo-II);
- cocultura de células endoteliais humanas e de células musculares lisas de aorta humana com soro rico em plaquetas na presença de stens convencionais ou farmacológicos em 24 e 48 horas (Grupos 5 e 6, Modelo-I e Modelo-II).

4.3.1 Determinação da formação de peróxidos lipídicos no teste colorimétrico do MTT

4.3.1.1 Células endoteliais humanas tratadas com sirolimo no teste colorimétrico do MTT

A taxa de produção de peróxidos lipídicos gerados pelas células endoteliais humanas tratadas com concentrações inferiores a 14,85 µM de sirolimo no teste colorimétrico do MTT apresentou um aumento significativo após o período de 48 horas de tratamento quando comparado ao experimento controle. (Figuras 33 a 35)

Os valores de MDA refletindo a formação de peróxidos lipídicos poli-insaturados para células endoteliais humanas tratadas com everolimo no teste colorimétrico do MTT comparadas ao experimento controle, após os períodos de tratamento, encontra-se na Tabela 3.

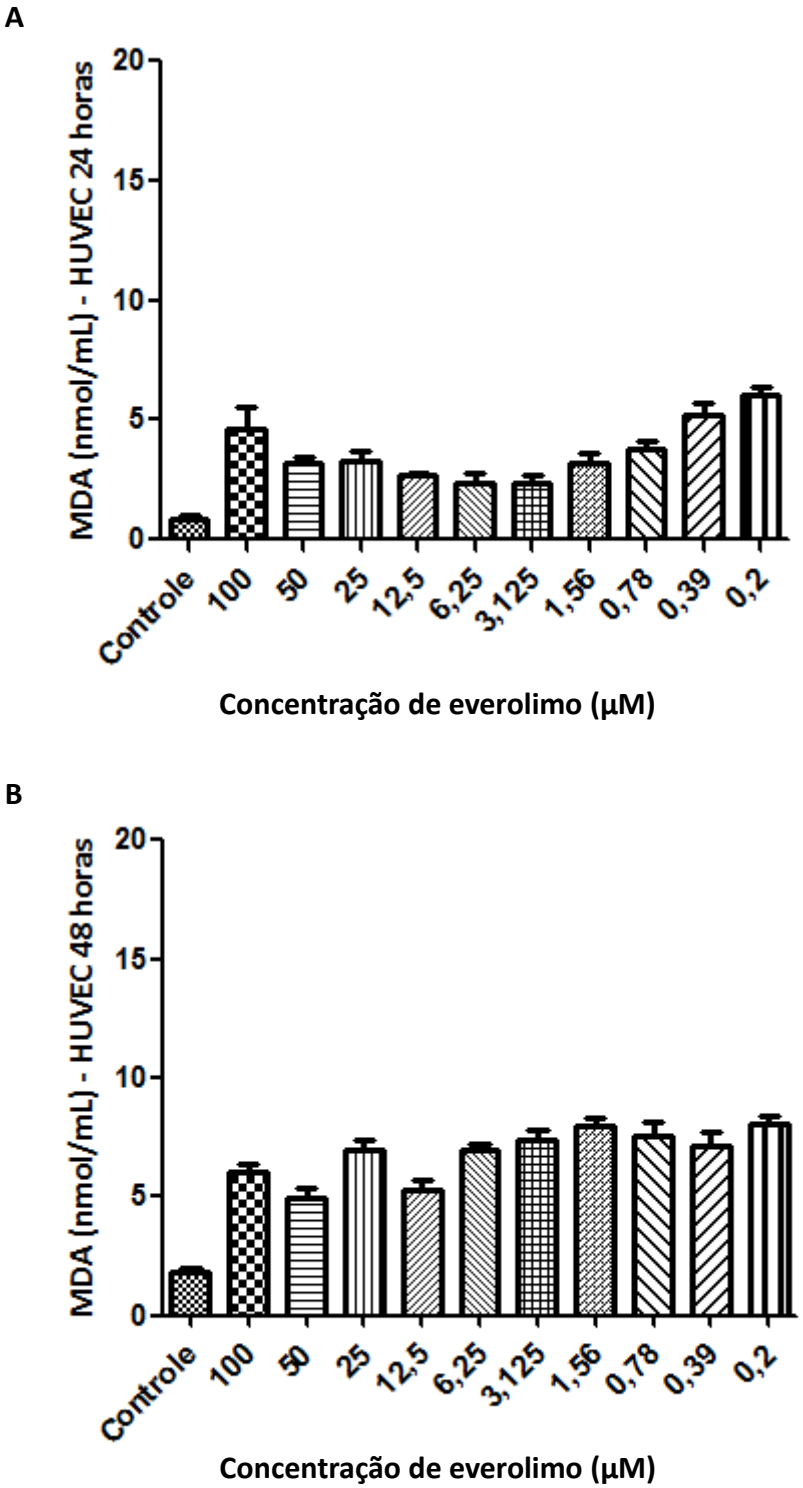


Figura 34- Produção de peróxidos lipídicos por células endoteliais humanas em monocultura tratadas com diferentes concentrações de everolimo durante ensaio colorimétrico do MTT, nos períodos de 24 **(A)** e 48 horas **(B)**. MDA: malondialdeido.

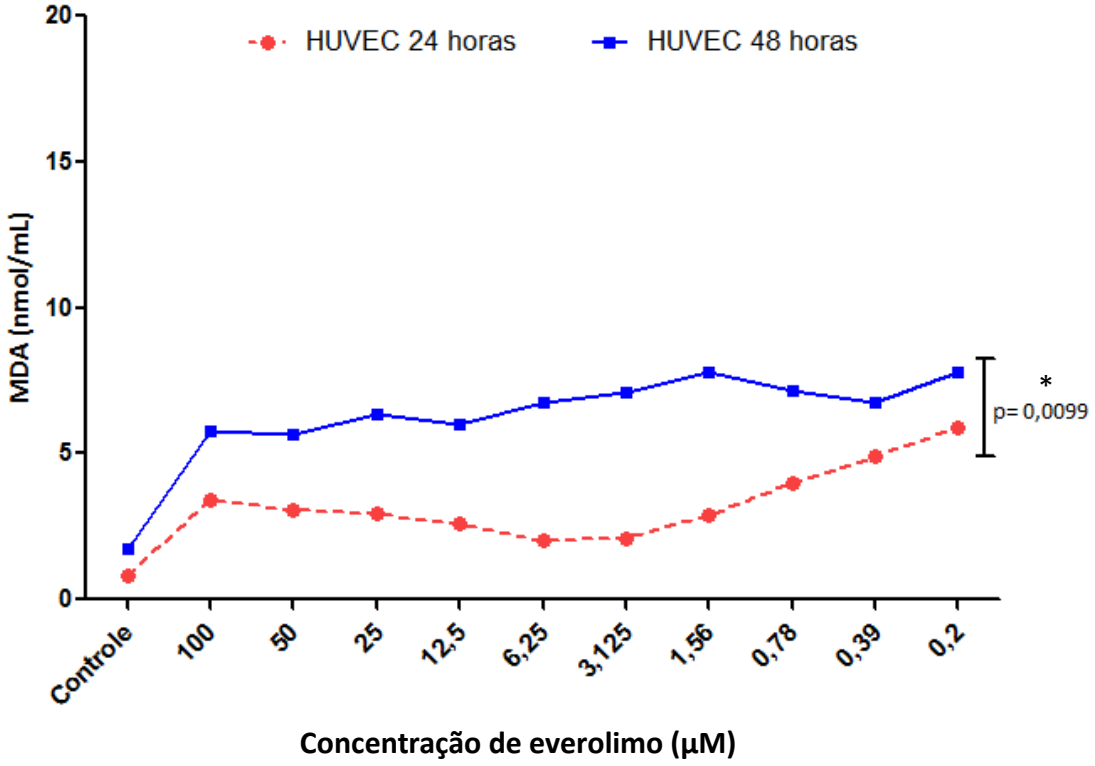


Figura 35- Correlação da produção de peróxidos lipídicos por células endoteliais humanas em monocultura tratadas com diferentes concentrações de everolimo durante ensaio colorimétrico de viabilidade celular (MTT). As duas curvas estão representadas no mesmo gráfico nos períodos de 24 horas (em vermelho) e 48 horas (em azul), evidenciando que a partir de concentrações inferiores a 14,85 µm de everolimo no teste colorimétrico do MTT houve um aumento significativo da produção de peróxidos lipídicos no período de 48 horas. MDA: malondialdeido, HUVEC: células endoteliais humanas. Grau de significância estatística * $p < 0,05$.

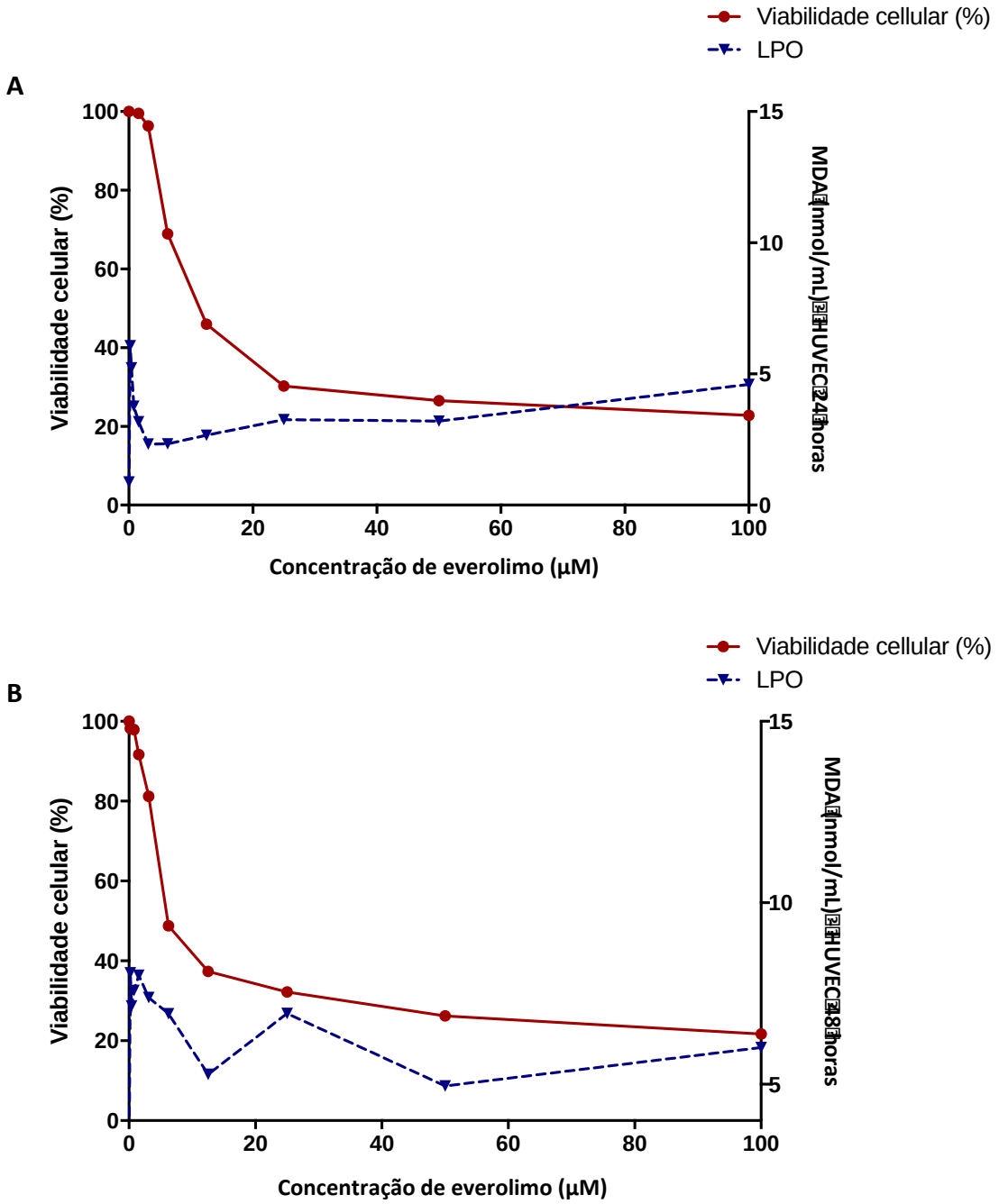


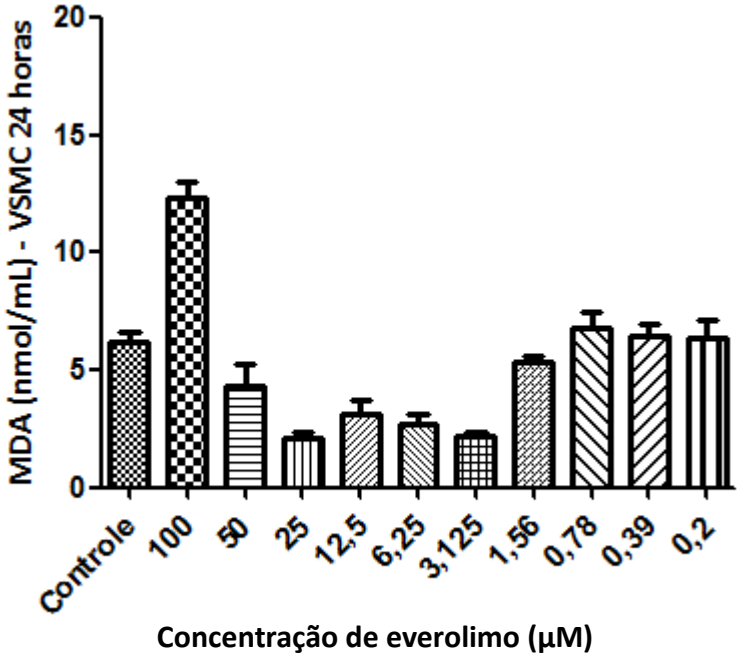
Figura 36- Correlação da produção de peróxidos lipídicos por células endoteliais humanas em monocultura tratadas com diferentes concentrações de everolimo durante ensaio colorimétrico de viabilidade celular (MTT) x produção de peróxidos lipídicos. As duas curvas estão representadas e correlacionadas entre si e com a viabilidade celular nos períodos de 24 **(A)** e 48 horas **(B)**, evidenciando que a partir de concentrações inferiores a 14,85 µm de sirolimo no teste colorimétrico do MTT houve um aumento significativo da produção de peróxidos lipídicos no período de 48 horas acompanhado da diminuição da viabilidade celular. MDA: malondialdeido, HUVEC: células endoteliais humanas, LPO: lipoperoxidação lipídica.

4.3.1.2 Células musculares lisas de aorta humana tratadas com sirolimo no teste colorimétrico do MTT

A taxa de produção de peróxidos lipídicos gerados pelas células musculares lisas de aorta humana tratadas com sirolimo no teste colorimétrico do MTT não apresentou diferença significativa após os períodos de tratamento quando comparado ao experimento controle. (Figuras 36 a 38)

Os valores de MDA refletindo a formação de peróxidos lipídicos poli-insaturados para musculares lisas de aorta humana tratadas com sirolimo no teste colorimétrico do MTT comparadas ao experimento controle, após os períodos de tratamento, encontra-se na Tabela 3.

A



B

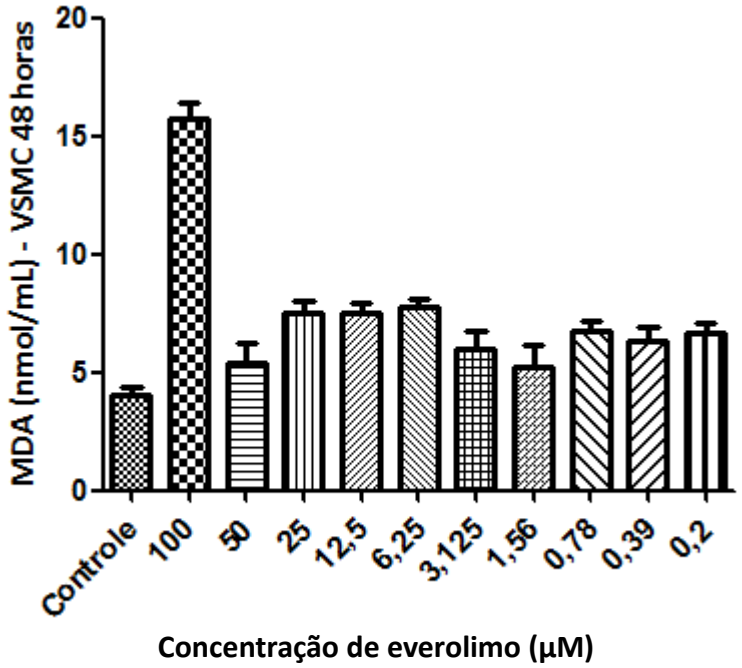


Figura 37- Produção de peróxidos lipídicos por células musculares lisas de aorta humana em monocultura tratadas com diferentes concentrações de everolimo durante ensaio colorimétrico do MTT, nos períodos de 24 **(A)** e 48 horas **(B)**. MDA: malondialdeido.

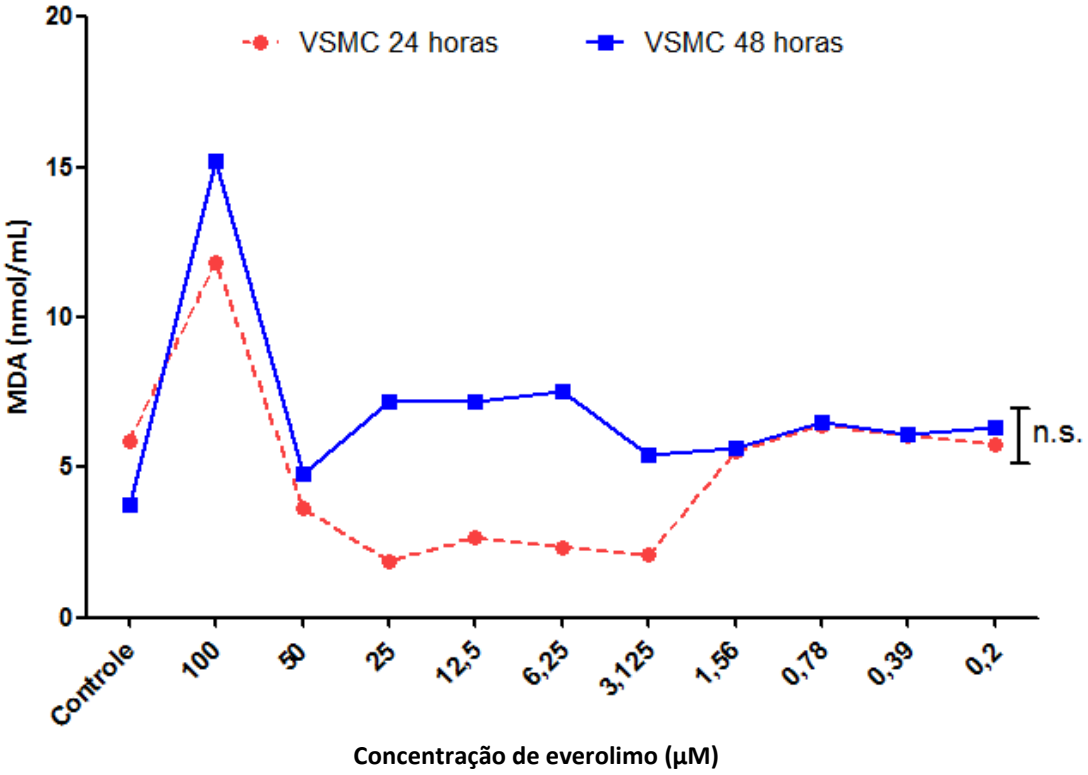


Figura 38- Correlação da produção de peróxidos lipídicos por células musculares lisas de aorta humana em monocultura tratadas com diferentes concentrações de everolimo durante ensaio colorimétrico de viabilidade celular (MTT). As duas curvas representadas no mesmo gráfico nos períodos de 24 horas (em vermelho) e 48 horas (em azul), evidenciando que no teste colorimétrico do MTT não houve diferença significativa da produção de peróxidos lipídicos nos dois períodos. MDA: malondialdeido, HUVEC: células endoteliais humanas. n.s.= não significativo.

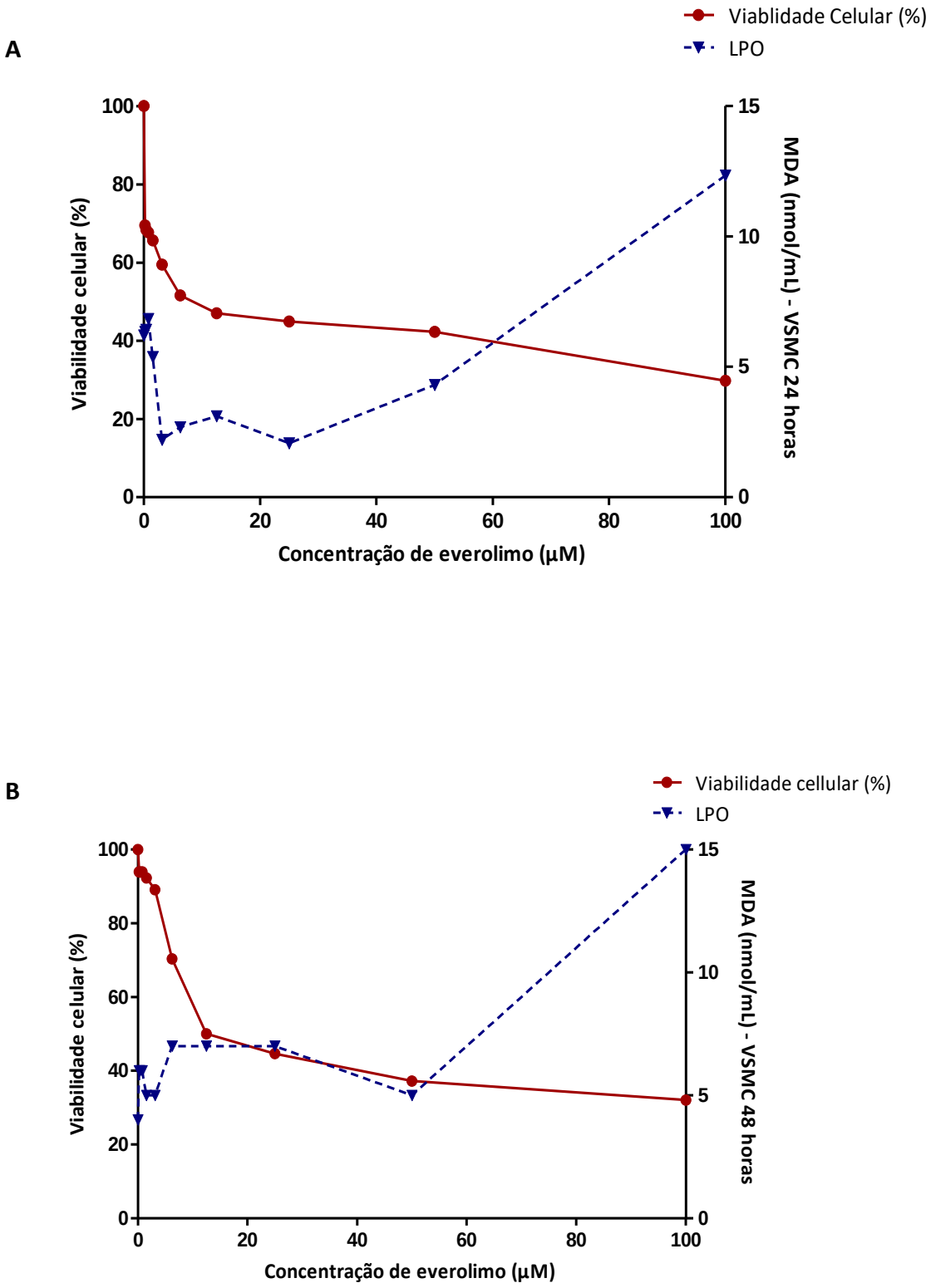


Figura 39- Correlação da produção de peróxidos lipídicos por células musculares lisas de aorta humana em monocultura tratadas com diferentes concentrações de everolimo durante ensaio colorimétrico de viabilidade celular (MTT) x produção de peróxidos lipídicos. As duas curvas estão representadas e correlacionadas entre si e com a viabilidade celular nos períodos de 24 **(A)** e 48 horas **(B)**. MDA: malondialdeido, HUVEC: células endoteliais humanas, LPO: lipoperoxidação lipídica.

Tabela 3- Valores de MDA evidenciando a formação de peróxidos lipídicos poli-insaturados para células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana tratadas com sirolimo no teste colorimétrico do MTT comparadas ao experimento controle nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas.

	MDA (nmol/mL)			
	HUVEC 24 h	HUVEC 48 h	VSMC 24 h	VSMC 48 h
Controle	0,883	1,861	6,203	4
100 µM	4,6	6,012	12,34	15,74
50 µM	3,208	4,952	4,301	5,374
25 µM	3,258	6,953	2,065	7,53
12,5 µM	2,667	5,277	3,107	7,505
6,25 µM	2,34	6,942	2,676	7,761
3,125 µM	2,329	7,389	2,2	5,971
1,56 µM	3,177	8	5,378	5,268
0.78 µM	3,767	7,582	6,829	6,788
0,39 µM	5,231	7,159	6,415	6,381
0,2 µM	6,077	8,069	6,338	6,665

MDA: malondialdeido; HUVEC: células endoteliais humanas; VSMC: células musculares lisas de aorta humana.

4.3.2 Determinação da formação de peróxidos lipídicos na monocultura com células endoteliais humanas (Grupo 1)

A taxa de produção de ácido tiobarbitúrico (TBARS) predominantemente o malondialdeido (MDA) gerados pelas células endoteliais humanas em monocultura (na concentração celular de 2 x 10^5 cel/mL) tratadas com *stent* convencional ou *stent* farmacológico (Grupo 1), após os períodos de tratamento, apresentou no período de 24 horas uma diminuição significativa do grupo com *stent* farmacológico em comparação ao grupo controle e do grupo com *stent* farmacológico em comparação ao grupo com *stent* convencional. No período de 48 horas, não houve diferença significativa entre os grupos controle, com *stent* convencional e com *stent* farmacológico, conforme Figuras 39 e 40.

Com relação ao montante de sirolimo que cada grupo recebeu, a concentração total e ajustada por quantidade celular na cultura, temos que no período de 24 horas, o grupo da monocultura celular com células endoteliais humanas com *stent* farmacológico (grupo 1 – DES 24h) recebeu respectivamente 276 µg e 19,38 µg do fármaco. No período de 48 horas no grupo com *stent* farmacológico (grupo 1 – DES 48h) a concentração total média de sirolimo foi 176,62 µg e a concentração ajustada por quantidade celular na cultura foi 12,40 µg.

O cálculo da taxa da formação de peróxidos lipídicos poli-insaturados no experimento com as células endoteliais humanas em monocultura com *stent* convencional ou *stent* farmacológico e o grupo controle, após os períodos de tratamento, encontra-se na Tabela 4.

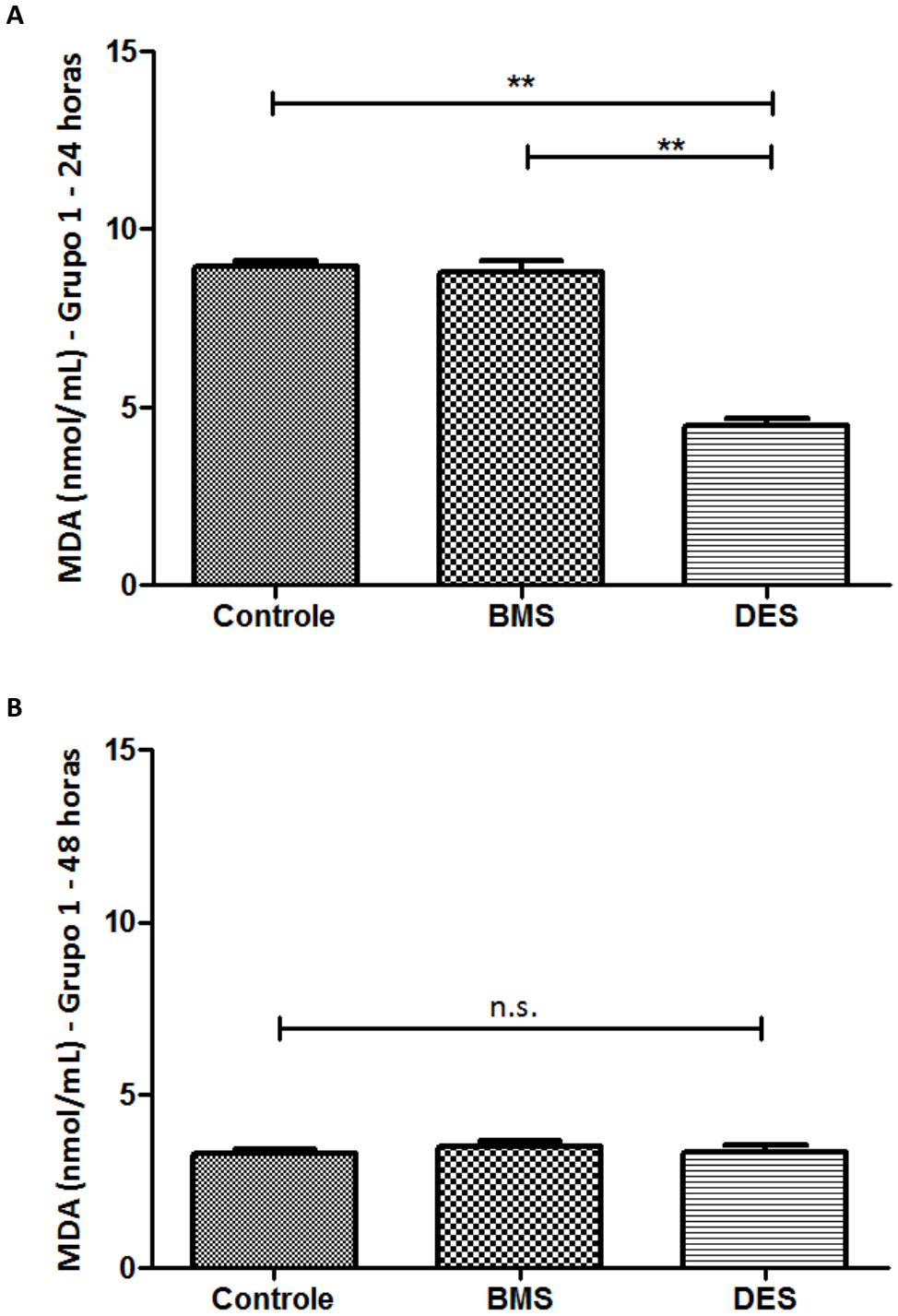


Figura 40- Produção de peróxidos lipídicos por células endoteliais humanas em monocultura (grupo 1) tratadas com *stent* convencional ou *stent* farmacológico nos períodos de 24 **(A)** e 48 **(B)** horas. Observa-se uma redução significativa no período de 24 horas na produção de MDA do grupo com *stent* farmacológico em comparação ao grupo controle e do grupo com *stent* farmacológico em comparação ao grupo com *stent* convencional. MDA: malondialdeido, HUVEC: células endoteliais humanas, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. Grau de significância estatística ** $p < 0,01$ e n.s.= não significativo.

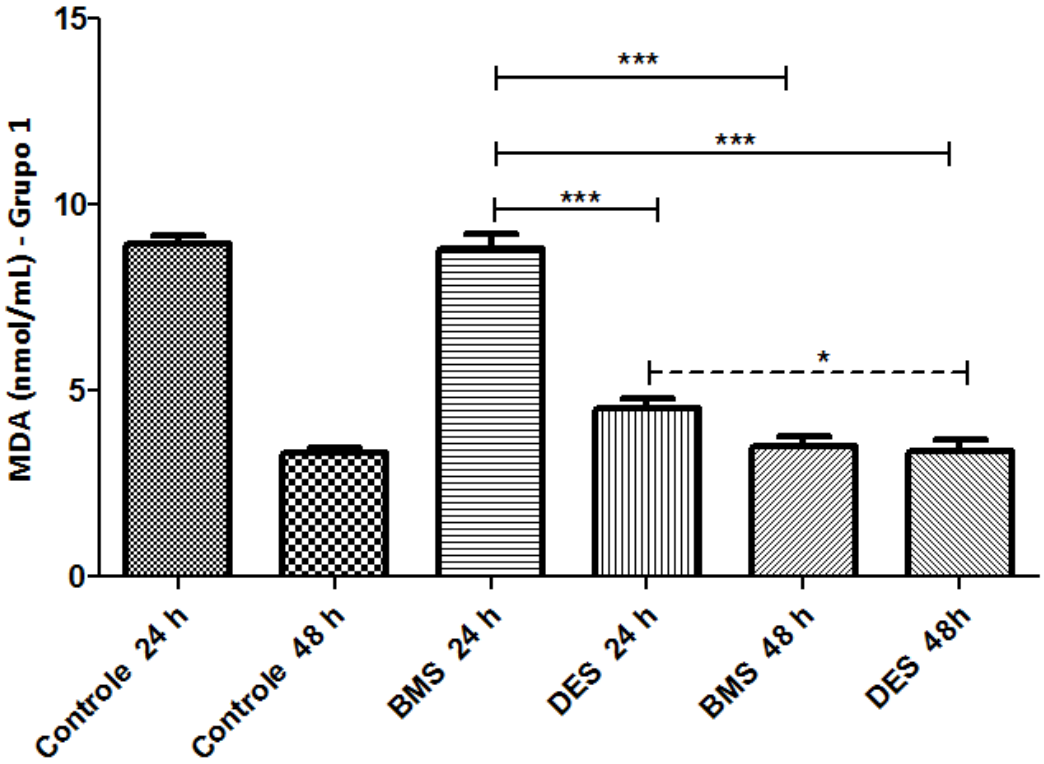


Figura 41- Produção de comparativa de peróxidos lipídicos por células endoteliais humanas em monocultura (Grupo 1) tratadas com *stent* convencional ou *stent* farmacológico nos períodos de 24 e 48 horas. Observa-se uma redução significativa na produção de MDA dos grupos com *stent* farmacológico em comparação aos grupos com *stent* convencional e dos grupos de *stent* convencional e farmacológico nos períodos de 48 horas. MDA: malondialdeido, HUVEC: células endoteliais humanas, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. Grau de significância estatística * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

4.3.3 Determinação da formação de peróxidos lipídicos na monocultura com células musculares lisas de aorta humana (Grupo 2)

A taxa de produção de peróxidos lipídicos gerados pelas células musculares lisas de aorta humana em monocultura tratadas com *stent* convencional ou *stent* farmacológico (Grupo 2), após os períodos de tratamento, apresentou em 24 horas uma diminuição significativa do grupo com *stent* farmacológico em comparação ao grupo controle e do grupo com *stent* farmacológico em comparação ao grupo com *stent* convencional. No período de 48 horas, não houve diferença significativa entre os grupos controle, com *stent* convencional e com *stent* farmacológico, conforme Figuras 41 e 42.

Com relação ao montante de sirolimo que cada grupo recebeu, concentração total e ajustada por quantidade celular na cultura, temos que no período de 24 horas, o grupo da monocultura celular de células musculares lisas de aorta humana com *stent* farmacológico (Grupo 2 – DES 24h) recebeu respectivamente 376 µg e 26,41 µg do fármaco. No período de 48 horas no grupo com *stent* farmacológico (Grupo 2 – DES 48h) a concentração total média de sirolimo foi 257,48 µg e ajustada por quantidade celular na cultura foi 18,08 µg.

O cálculo da taxa da formação de peróxidos lipídicos poli-insaturados no experimento com as células musculares lisas de aorta humana em monocultura com *stent* convencional ou *stent* farmacológico e o grupo controle, após os períodos de tratamento, encontra-se na Tabela 4.

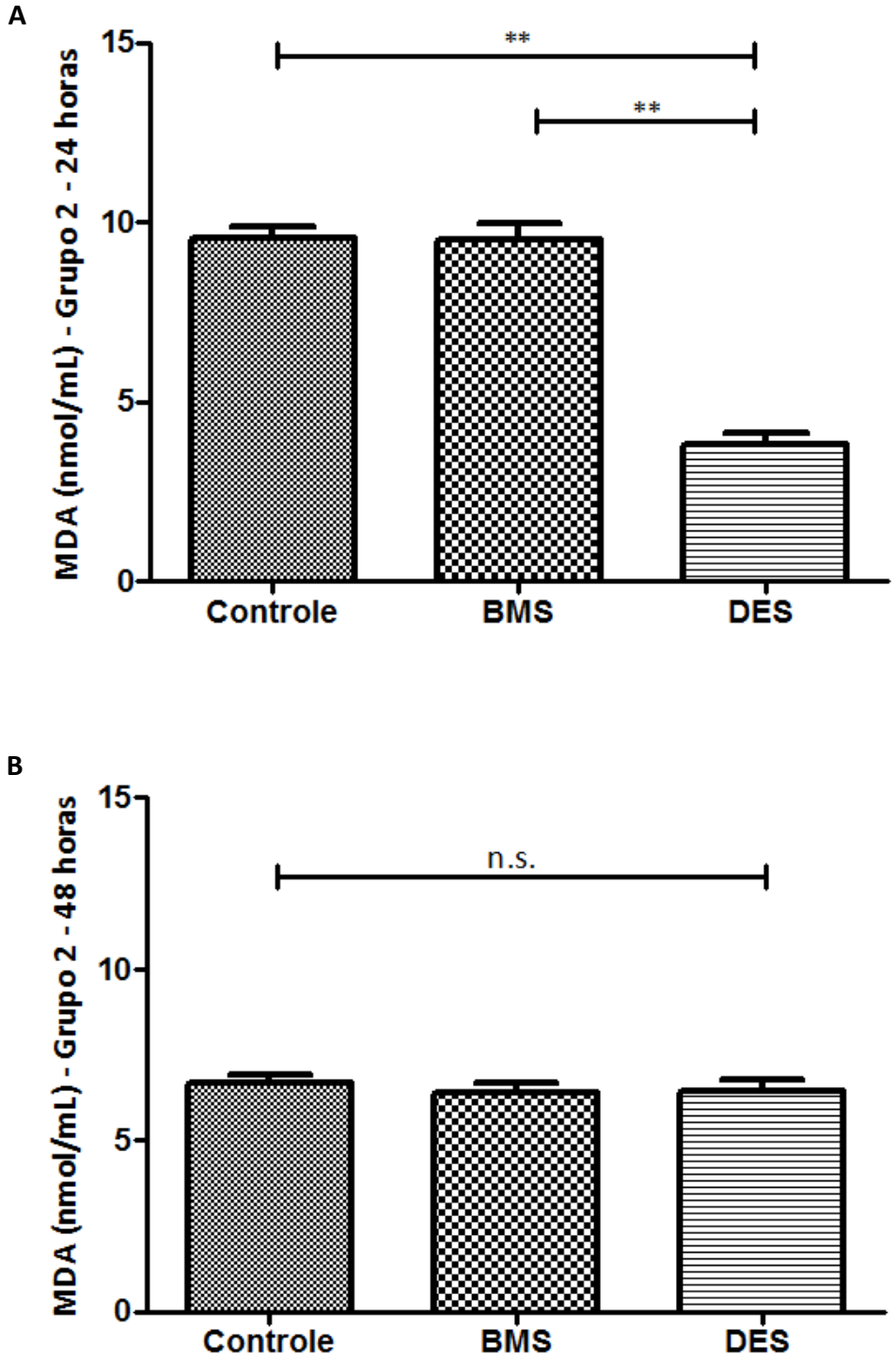


Figura 42- Produção de peróxidos lipídicos por células musculares lisas de aorta humana em monocultura (grupo 2) tratadas com *stent* convencional ou *stent* farmacológico nos períodos de 24 **(A)** e 48 **(B)** horas. Observa-se uma redução significativa no período de 24 horas na produção de MDA do grupo com *stent* farmacológico em comparação ao grupo controle e do grupo com *stent* farmacológico em comparação ao grupo com *stent* convencional. MDA: malondialdeido, VSMC: células musculares lisas de aorta humana, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. Grau de significância estatística ** $p < 0,01$. n.s.= não significativo.

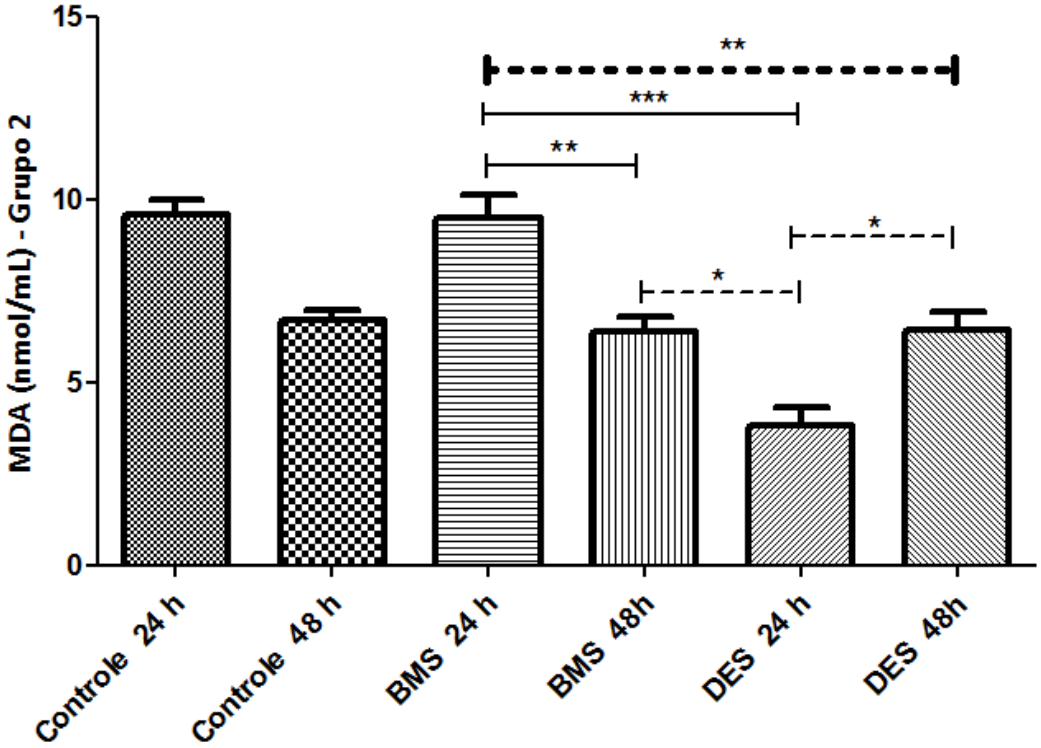


Figura 43- Produção de comparativa de peróxidos lipídicos por por células musculares lisas de aorta humana em monocultura (grupo 2) tratadas com *stent* convencional ou *stent* farmacológico nos períodos de 24 e 48 horas. Observa-se uma redução significativa no período de 24 horas na produção de MDA do grupo com *stent* farmacológico em comparação ao grupo controle e do grupo com *stent* farmacológico em comparação ao grupo com *stent* convencional, redução significativa no período de 48 horas no grupo *stent* convencional e aumento significativo no período de 48 horas no grupo do *stent* farmacológico. MDA: malondialdeido, VSMC: células musculares lisas de aorta humana, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. Grau de significância estatística * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Tabela 4 - Cálculo da média da taxa da formação de peróxidos lipídicos poli-insaturados no experimento com as células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura com *stent* convencional ou *stent* farmacológico após os períodos de tratamento de 24 e 48 horas.

Grupos do experimento	MDA (nmol/mL)			Concentração Sirolimo (µg)	
	Controle	BMS	DES	Total	Ajustada
Grupo 1 - 24 h	8,94	8,79	4,49	276	19,38
Grupo 1 - 48 h	3,31	3,48	3,34	176,62	12,4
Grupo 2 - 24 h	9,57	9,5	3,79	376	26,41
Grupo 2 - 48 h	6,69	6,36	6,41	257,48	18,08

MDA: malondialdeido; BMS: *stent* convencional; DES: *stent* farmacológico.

4.3.4 Determinação da formação de peróxidos lipídicos na cocultura de células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana no Grupo 3 (Modelo-II)

Realizamos o cálculo da produção de peróxidos lipídicos gerados no Grupo 3, que corresponde a cocultura celular realizada com células endoteliais humanas na concentração de 0,5 x 10^5 cel/mL e células musculares lisas de aorta humana na concentração de 0,062 x 10^5 cel/mL (Modelo-II de cocultura celular), tratadas com *stent* farmacológico ou *stent* convencional em comparação ao grupo controle. O subgrupo do Grupo 3 que recebeu *stent* farmacológico (Grupo 3 – DES) recebeu a dose de 63,27 µg de sirolimo.

Não houve diferença a taxa de produção de ácido tiobarbitúrico (TBARS) predominantemente o malondialdeido (MDA) gerados no Grupo 3 entre o subgrupo que recebeu *stent* farmacológico (Grupo 3 – DES), o subgrupo que recebeu *stent* convencional (Grupo 3 – BMS) e o controle após os períodos de tratamento (Figura 43).

O cálculo da taxa da formação de peróxidos lipídicos poli-insaturados no experimento com as células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em cocultura no Grupo 3 (Modelo-II) com *stent* convencional ou *stent* farmacológico após os períodos de tratamento, encontra-se na Tabela 5.

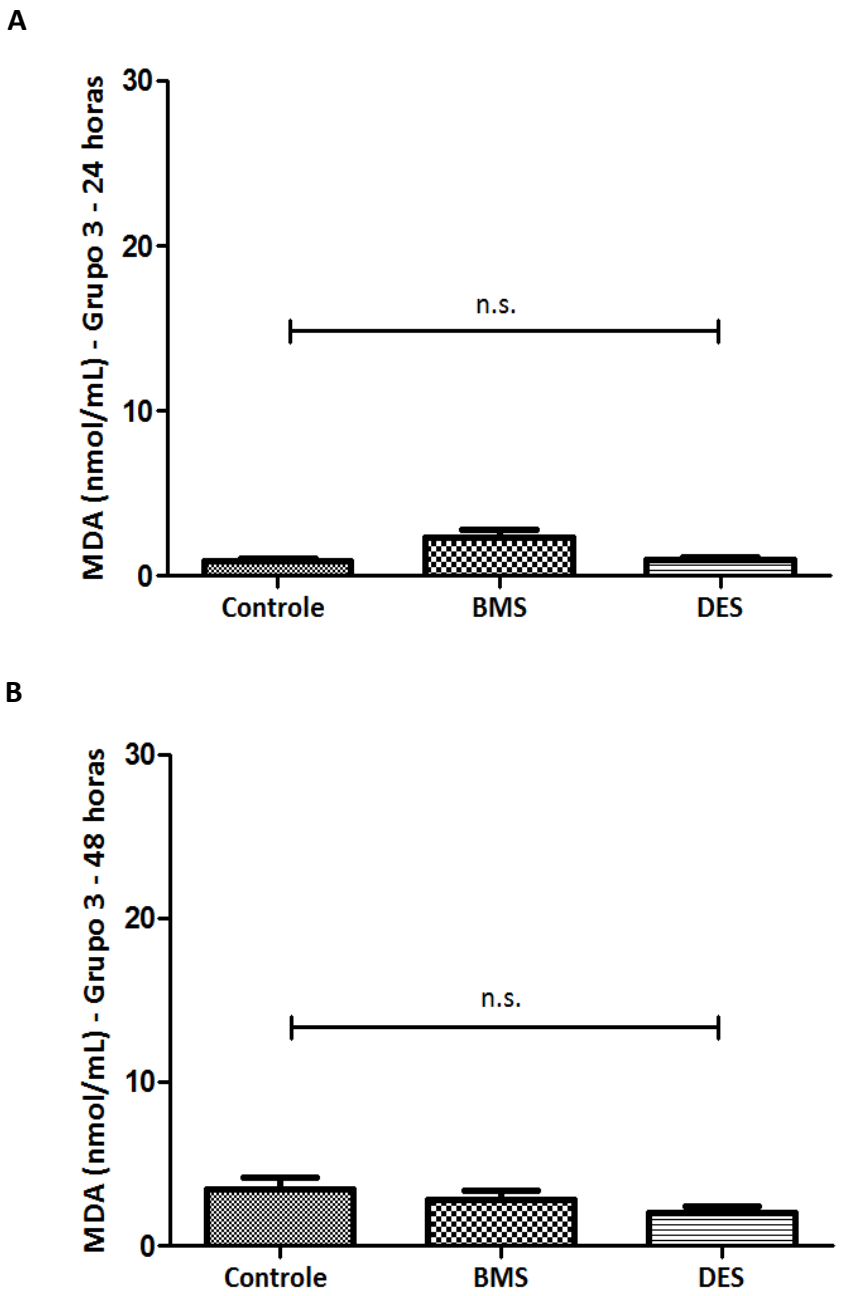


Figura 44- Produção de peróxidos lipídicos pelo Grupo 3: cocultura celular realizada com células endoteliais humanas na concentração de 0,5 x 10^5 cel/mL e células musculares lisas de aorta humana na concentração de 0,062 x 10^5 cel/mL (Modelo-II de cocultura celular), tratadas com *stent* farmacológico ou *stent* convencional em comparação ao grupo controle. Não houve diferença a taxa de produção de ácido tiobarbitúrico (TBARS) predominantemente o malondialdeido (MDA) gerados no Grupo 3 entre o subgrupo que recebeu *stent* farmacológico (Grupo 3 – DES), o subgrupo que recebeu *stent* convencional (Grupo 3 – BMS) e o controle após os períodos de tratamento. MDA: malondialdeido, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. n.s.= não significativo.

4.3.5 Determinação da formação de peróxidos lipídicos na cocultura de células musculares lisas de aorta humana células endoteliais humanas no Grupo 4 (Modelo-I)

A produção de peróxidos lipídicos gerados no grupo 4, que corresponde a cocultura celular realizada com células musculares lisas de aorta humana na concentração de 0,5 x 10^5 cel/mL e células endoteliais humanas na concentração de 0,062 x 10^5 cel/mL (Modelo-II de cocultura celular), tratadas com *stent* farmacológico ou *stent* convencional em comparação ao grupo controle foi calculada, evidenciando que não houve diferença a taxa de produção de ácido tiobarbitúrico (TBARS) predominantemente o malondialdeido (MDA) gerados no grupo 4 entre o subgrupo que recebeu *stent* farmacológico (grupo 4 – DES), o subgrupo que recebeu *stent* convencional (grupo 4 – BMS) e o controle após os períodos de tratamento (Figuras 44 e 45).

O subgrupo do grupo 4 que recebeu *stent* farmacológico (grupo 4 – DES) recebeu a dose de 63,27 µg de sirolimo.

O cálculo da taxa da formação de peróxidos lipídicos poli-insaturados no experimento com as células na cocultura celular de células musculares lisas de aorta humana e células endoteliais grupo 4 (Modelo-I) com *stent* convencional ou *stent* farmacológico e o grupo controle, após os períodos de tratamento, encontra-se na Tabela 5.

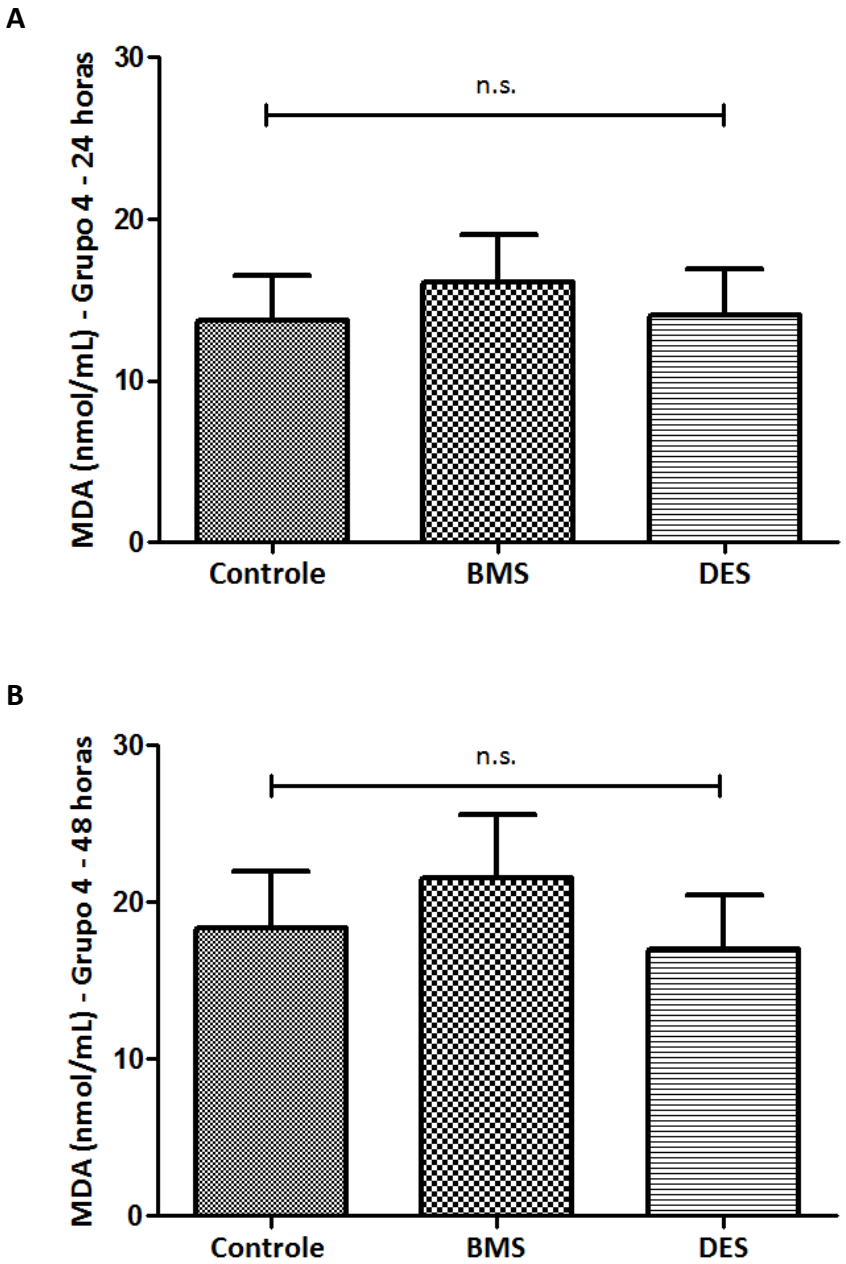


Figura 45- Produção de peróxidos lipídicos pelo grupo 4: consiste na cocultura celular realizada com células musculares lisas de aorta humana na concentração de 0,5 x 10^5 cel/mL e células células endoteliais humanas na concentração de 0,062 x 10^5 cel/mL (Modelo-II de cocultura celular), tratadas com *stent* farmacológico ou *stent* convencional em comparação ao grupo controle. Não houve diferença a taxa de produção de ácido tiobarbitúrico (TBARS) predominantemente o malondialdeido (MDA) gerados no grupo 3 entre o subgrupo que recebeu *stent* farmacológico (grupo 4 – DES), o subgrupo que recebeu *stent* convencional (grupo 4 – BMS) e o controle após os períodos de tratamento. MDA: malondialdeido, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. n.s.= não significativo.

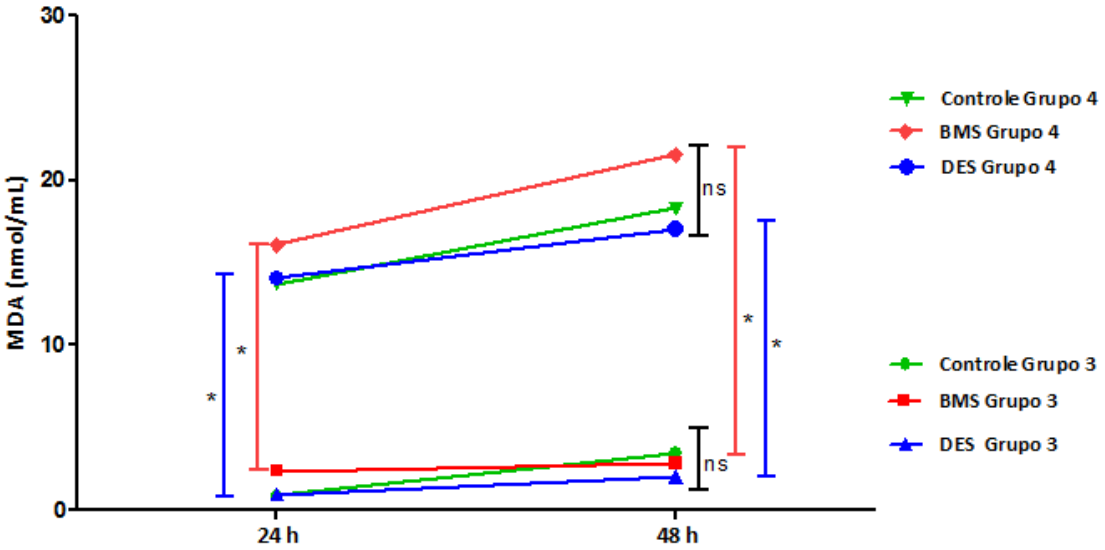


Figura 46- Comparação da produção de peróxidos lipídicos pelos grupos 3 e 4 tratados com *stent* farmacológico ou *stent* convencional em comparação ao grupo controle. MDA: malondialdeido, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. Grau de significância estatística * $p < 0,05$. n.s.= não significativo.

Tabela 5 - Cálculo da média da taxa da formação de peróxidos lipídicos poli-insaturados no experimento com as células na cocultura celular no Grupo 3 (Modelo-II) e Grupo 4 (Modelo-I) com *stent* convencional ou *stent* farmacológico após os períodos de tratamento de 24 e 48 horas.

Grupos do experimento	MDA (nmol/mL)			Concentração Sirolimo(µg)
	Controle	BMS	DES	
Grupo 3 - 24 h	0,86	2,36	0,94	63,27
Grupo 3 - 48 h	3,47	2,83	2,02	63,27
Grupo 4 - 24 h	13,73	16,08	14,04	63,27
Grupo 4 - 48 h	18,3	21,56	17,03	63,27

MDA: malondialdeido; BMS: *stent* convencional; DES: *stent* farmacológico.

4.3.6 Determinação da formação de peróxidos lipídicos na cocultura de células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana no Grupo 5 com soro rico em plaquetas à 10% (Modelo-II)

A produção de peróxidos lipídicos gerados no Grupo 5, que corresponde a cocultura celular com células endoteliais humanas na concentração de 0,5 x 10^5 cel/mL e células musculares lisas de aorta humana na concentração de 0,062 x 10^5 cel/mL (Modelo-II de cocultura celular), realizada com adição do soro rico em plaquetas à 10%, tratadas com *stent* farmacológico ou *stent* convencional em comparação ao grupo controle foi calculada, evidenciando que houve um aumento significativo na taxa de produção do malondialdeido (MDA) gerados entre o subgrupo que recebeu *stent* farmacológico sem soro rico em plaquetas à 10% e o subgrupo que recebeu *stent* farmacológico com soro rico em plaquetas à 10% em ambos os períodos de tratamento, 24 e 48 horas. Observamos aumento significativo também no subgrupo que recebeu *stent* convencional com soro rico em plaquetas à 10% entre os períodos de 24 e 48 horas (Figura 46).

O subgrupo do Grupo 5 que recebeu *stent* farmacológico (Grupo 5 – DES) recebeu a dose de 38,85 µg de sirolimo.

O cálculo da taxa da formação de peróxidos lipídicos poli-insaturados no experimento com as células na cocultura celular de com células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana Grupo 5 (Modelo-II) com *stent* convencional ou *stent* farmacológico e o grupo controle, após os períodos de tratamento, encontra-se na Tabela 6.

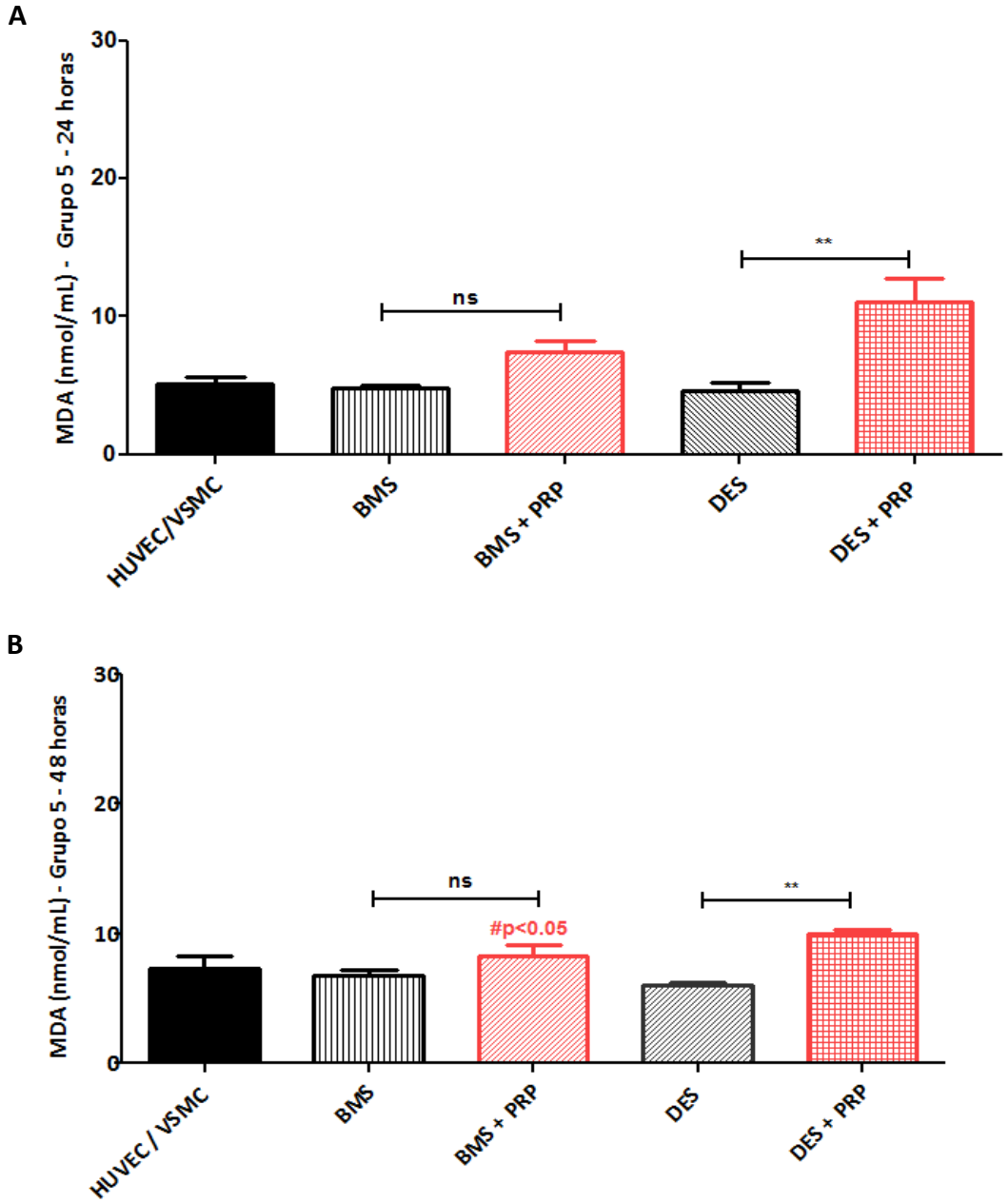


Figura 47- Produção de peróxidos lipídicos pelo Grupo 5: cocultura celular realizada com células endoteliais humanas na concentração de 0,5 x 10^5 cel/mL e células musculares lisas de aorta humana na concentração de 0,062 x 10^5 cel/mL (Modelo-II de cocultura celular), acrescidas do soro rico em plaquetas à 10%, tratadas com *stent* farmacológico ou *stent* convencional em comparação ao grupo controle. Observamos maior produção significativa na taxa de malondialdeido (MDA) gerado no Grupo 5 entre o subgrupo que recebeu *stent* farmacológico (Grupo 5 – DES) na presença do soro rico em plaquetas à 10% quando comparado ao mesmo subgrupo sem adição do soro rico em plaquetas, nos dois períodos de tratamento, **(A)** 24 e **(B)** 48 horas. #: é a diferença estatística obtida pelo teste não paramétrico de variância de ANOVA entre os períodos de 24 e 48 horas no Grupo 5-BMS com PRP à 10%. MDA: malondialdeido, HUVEC: células endoteliais humanas, VSMC: células musculares lisas de aorta humana, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico; PRP: soro rico em plaquetas à 10%. Grau de significância estatística ** $p < 0,01$. n.s.= não significativo.

4.3.7 Determinação da formação de peróxidos lipídicos na cocultura celular de células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana no Grupo 6 com soro rico em plaquetas (Modelo-I)

A produção de peróxidos lipídicos gerados no Grupo 6, que corresponde a cocultura celular com células musculares lisas de aorta humana na concentração de 0,5 x 10^5 cel/mL e células endoteliais humanas na concentração de 0,062 x 10^5 cel/mL (Modelo-II de cocultura celular), realizada com adição do soro rico em plaquetas à 10%, tratadas com *stent* farmacológico ou *stent* convencional em comparação ao grupo controle foi calculada, evidenciando que houve um aumento significativo na taxa de produção do malondialdeido (MDA) gerados no Grupo 6 entre o subgrupo que recebeu *stent* farmacológico (Grupo 6 – DES) sem soro rico em plaquetas e o subgrupo que recebeu *stent* farmacológico (Grupo 6 – DES) com soro rico em plaquetas à 10%, em ambos os períodos de tratamento, 24 e 48 horas (Figura 47).

O subgrupo do Grupo 6 que recebeu *stent* farmacológico (Grupo 6 – DES) recebeu a dose de 38,85 µg de sirolimo.

O cálculo da taxa da formação de peróxidos lipídicos poli-insaturados no experimento com as células na cocultura celular de com células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana Grupo 6 (Modelo-I) com *stent* convencional ou *stent* farmacológico e o grupo controle, após os períodos de tratamento, encontra-se na Tabela 6.

Tabela 6- Cálculo da média da taxa da formação de peróxidos lipídicos poli-insaturados no experimento com as células na cocultura celular no Grupo 5 (Modelo-II) e Grupo 6 (Modelo-I) com *stent* convencional ou *stent* farmacológico após os períodos de tratamento de 24 e 48 horas.

Grupos do experimento	MDA (nmol/mL)			Concentração Sirolimo(µg)
	Controle	BMS	DES	
Grupo 5 - 24 h	5,14	7,42	11,02	38,85
Grupo 5 - 48 h	7,28	8,26	9,97	38,85
Grupo 6 - 24 h	12,6	15,88	18,72	38,85
Grupo 6 - 48 h	15,28	20,92	22,92	38,85

MDA: malondialdeído; BMS: *stent* convencional; DES: *stent* farmacológico.

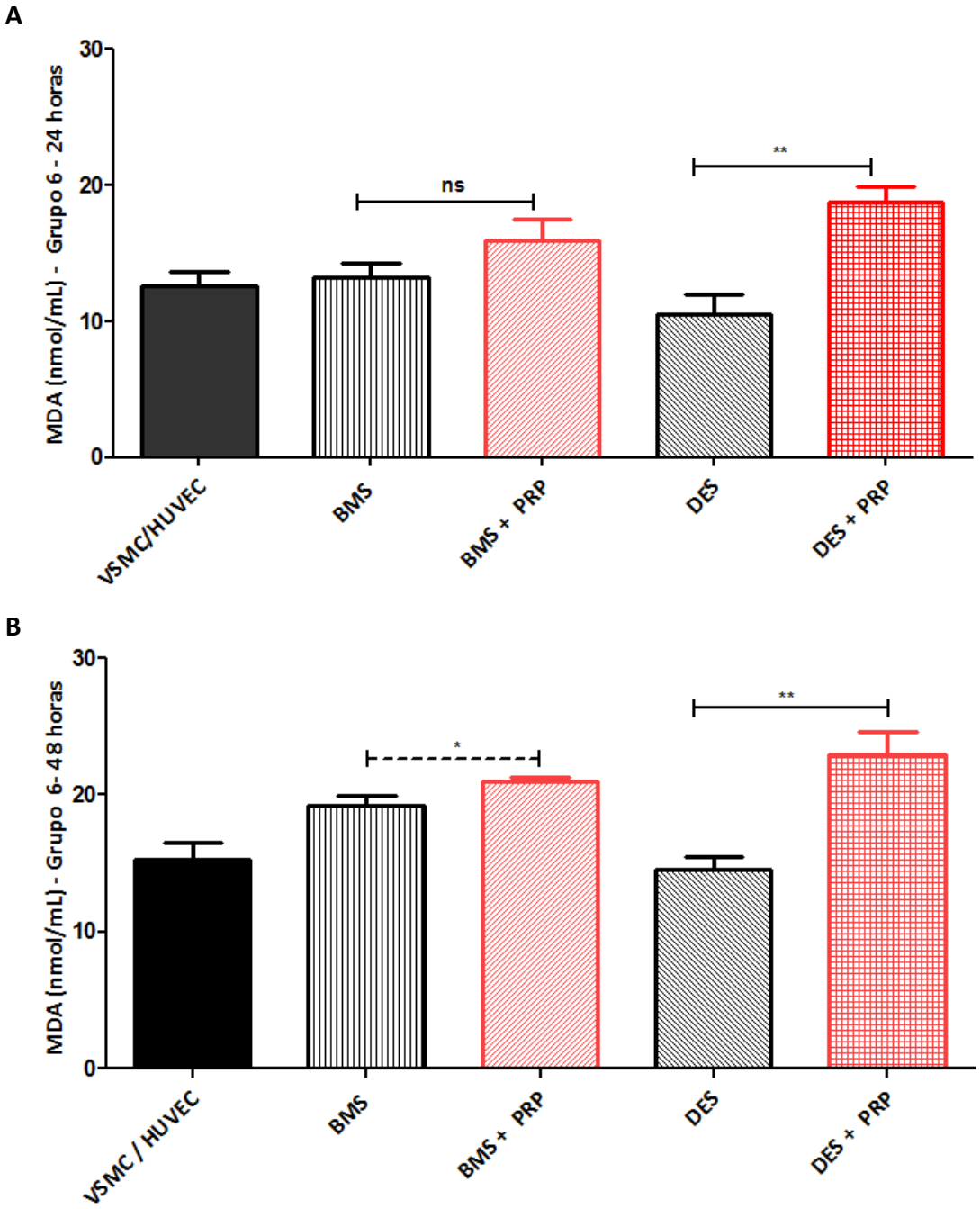
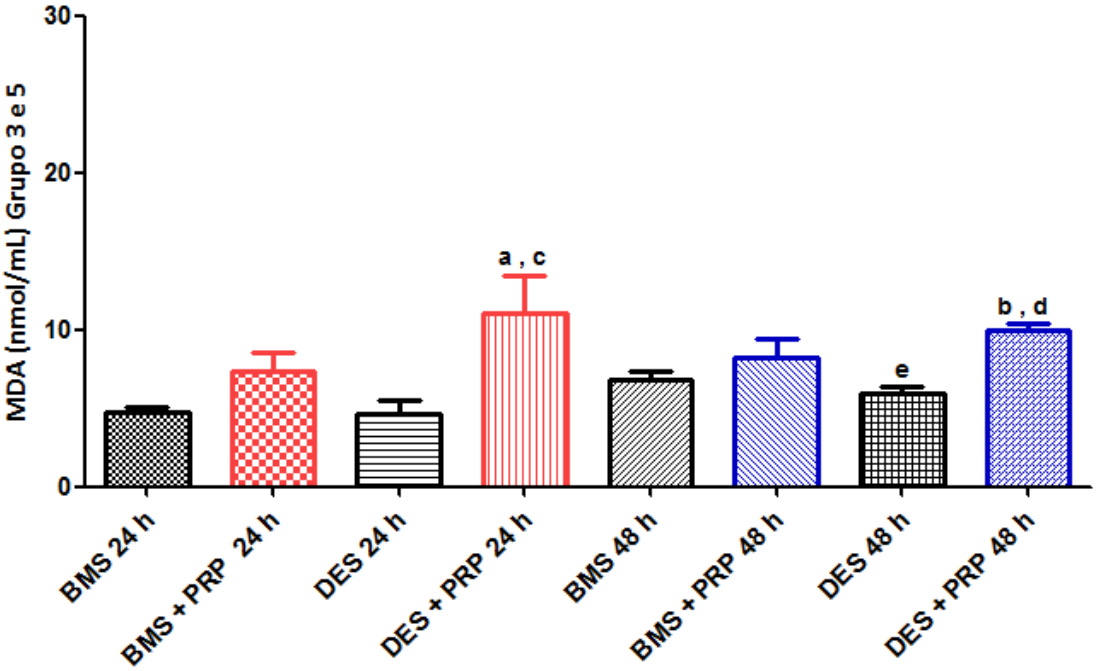


Figura 48- Produção de peróxidos lipídicos pelo Grupo 6: cocultura celular realizada com células musculares lisas de aorta humana na concentração de 0,5 x 10^5 cel/mL e células endoteliais humanas na concentração de 0,062 x 10^5 cel/mL (Modelo-II de cocultura celular), tratadas com *stent* farmacológico ou *stent* convencional em comparação ao grupo controle. Observamos maior produção significativa na taxa de malondialdeido (MDA) gerado no Grupo 6 entre o subgrupo que recebeu *stent* farmacológico (Grupo 6 – DES) na presença do soro rico em plaquetas à 10% quando comparado ao mesmo subgrupo sem adição do soro rico em plaquetas à 10%, nos dois períodos de tratamento, **(A)** 24 e **(B)** 48 horas. MDA: malondialdeido, VSMC: células musculares lisas de aorta humana, HUVEC: células endoteliais humanas, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico, PRP: soro rico em plaquetas à 10%. Grau de significância estatística * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. n.s.= não significativo.

4.3.8 Comparação da determinação da formação de peróxidos lipídicos na cocultura celular intergrupos de cocultura com a mesma base celular com ou sem adição do soro rico em plaquetas à 10%

4.3.8.1 Comparação da determinação da formação de peróxidos lipídicos na cocultura celular entre os Grupo 3 e 5 (Modelo-II)

A comparação entre os grupos com relação à produção de peróxidos lipídicos gerados nos vários subgrupos dos Grupos 3 e 5, ou seja, entre os grupos de cocultura celular com células endoteliais humanas na concentração de 0,5 x 10^5 cel/mL e células musculares lisas de aorta humana na concentração de 0,062 x 10^5 cel/mL (Modelo-II de cocultura celular), realizadas respectivamente sem e com adição do soro rico em plaquetas à 10%, tratadas com *stent* farmacológico ou *stent* convencional em comparação ao grupo controle foi calculada, e evidenciou que a taxa de produção de ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi predominantemente maior nos subgrupos que receberam *stent* farmacológico e soro rico em plaquetas à 10% e no período de tratamento de 48 horas (Figura 48).



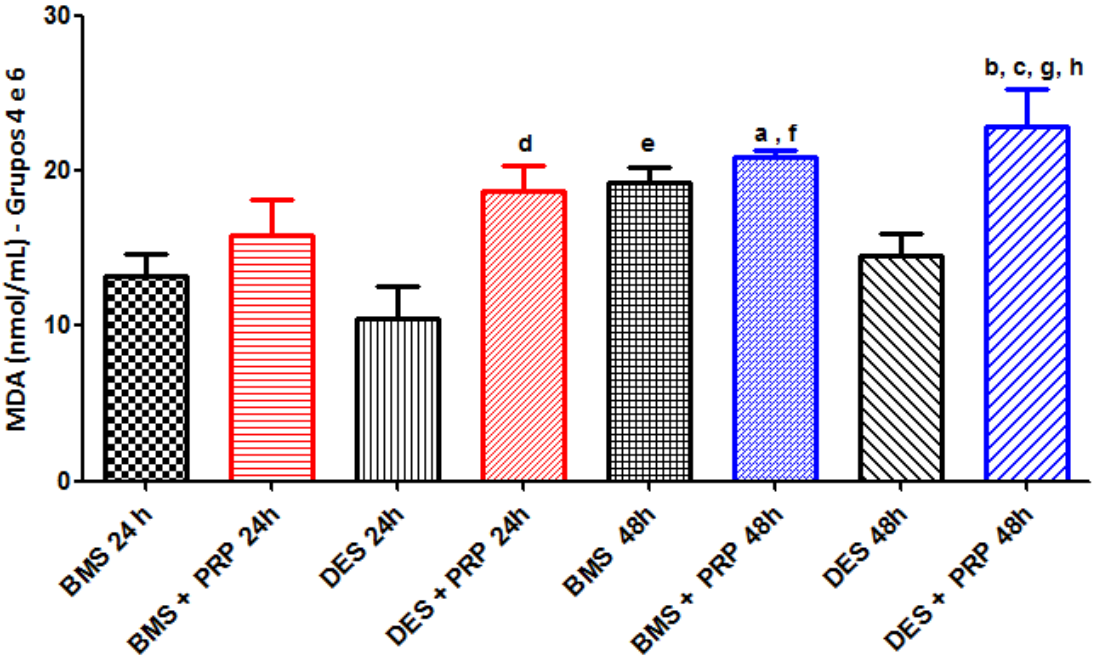
Diferença estatística obtida pelo teste não paramétrico de ANOVA, seguido pelo pos-test de Tukey, entre os grupos:

a - ** BMS 24 h x DES + PRP 24 h
b - * BMS 24 h x DES + PRP 48 h
c - * DES 24 h x DES + PRP 24 h
d - * DES 24 h x DES + PRP 48 h
e - ** DES + PRP 24 h x DES 48 h

Figura 49– Comparação da produção de peróxidos lipídicos pelos grupos 3 e 5. Grupos de cocultura celular com células endoteliais humanas na concentração de 0,5 x 10^5 cel/mL e células musculares lisas de aorta humana na concentração de 0,062 x 10^5 cel/mL (Modelo-II de cocultura celular), realizadas respectivamente sem e com adição do soro rico em plaquetas à 10%, tratados com *stent* farmacológico ou *stent* convencional. MDA: malondialdeido, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico, PRP: do soro rico em plaquetas à 10%. Grau de significância estatística * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.3.8.2 Comparação da determinação da formação de peróxidos lipídicos na cocultura celular entre os Grupo 4 e 6 (Modelo-I)

A comparação entre os grupos com relação à produção de peróxidos lipídicos gerados nos vários subgrupos dos Grupos 4 e 6, ou seja, entre os grupos de cocultura celular com células musculares lisas de aorta humana na concentração de 0,5 x 10^5 cel/mL e células endoteliais humanas na concentração de 0,062 x 10^5 cel/mL (Modelo-I de cocultura celular), realizadas respectivamente sem e com adição do soro rico em plaquetas à 10%, tratadas com *stent* farmacológico ou *stent* convencional em comparação ao grupo controle foi calculada, e evidenciou que a taxa de produção de ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi predominantemente maior nos subgrupos que receberam *stent* farmacológico e soro rico em plaquetas à 10% e no período de tratamento de 48 horas (Figura 49).



Diferença estatística obtida pelo teste não paramétrico de ANOVA, seguido pelo pos-test de Tukey, entre os grupos:

a - * BMS 24 h x BMS + PRP 48 h
b - ** BMS 24 h x DES + PRP 48 h
c - * BMS + PRP 24 h x DES + PRP 48 h
d - * DES 24 h x DES + PRP 24 h
e - ** DES 24 h x BMS 48 h
f - * DES 24 h x BMS + PRP 48 h
g - ** DES 24 h x DES + PRP 48 h
h - * DES 48 h x DES + PRP 48h

Figura 50- Comparação da produção de peróxidos lipídicos pelos grupos 4 e 6. Grupos de cocultura celular com células musculares lisas de aorta humana na concentração de 0,5 x 10^5 cel/mL e células endoteliais humanas na concentração de 0,062 x 10^5 cel/mL (Modelo-II de cocultura celular), realizadas respectivamente sem e com adição do soro rico em plaquetas à 10%, tratados com *stent* farmacológico ou *stent* convencional. MDA: malondialdeido, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico, PRP: do soro rico em plaquetas à 10%. Grau de significância estatística * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.4 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

Usando a metodologia proposta por Hsieh, Hernández-Ledesma e Lumen,[70] a citometria de fluxo foi aplicada nesse estudo para determinar os parâmetros cinéticos das populações celulares e obter a porcentagem de células nas fases G0/G1, S, G2/M e apoptose (DNA fragmentado). Os experimentos foram realizados utilizando as células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana nas seguintes concentrações, de acordo com o tipo de cultura descrito no delineamento experimental.

Os histogramas das Figuras 50 e 51 representam a distribuição das fases do ciclo celular obtido por citometria de fluxo. Os quadrantes obtidos pelo programa de análise destacados na figura representam respectivamente as seguintes fases do ciclo: M1: fase G2/M; M2: fase S; M3: fase G0/G1 e M4: DNA fragmentado.

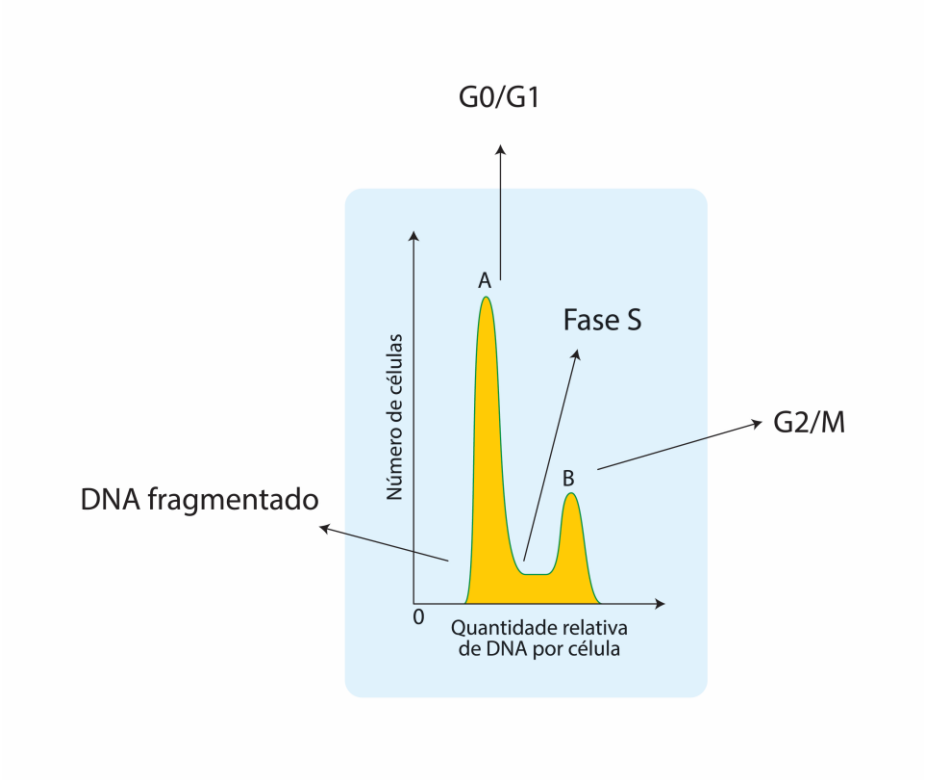


Figura 51- Histograma representativo das fases do ciclo celular. As células no pico B contêm o dobro de DNA do que aquelas do pico A, indicando que elas contêm DNA replicado, ao passo que as células do pico A contêm DNA não replicado. Portanto, o pico A contêm células que estão em G1, e o pico B contêm células que estão em G2 e mitose. As células na fase S começaram mas não terminaram, a síntese de DNA. Portanto, elas têm quantidades intermediárias de DNA e são encontradas nas regiões entre os dois picos. Nesse exemplo, a maioria das células estão em G1, indicando que é a fase mais longa nessa hipotética população celular.

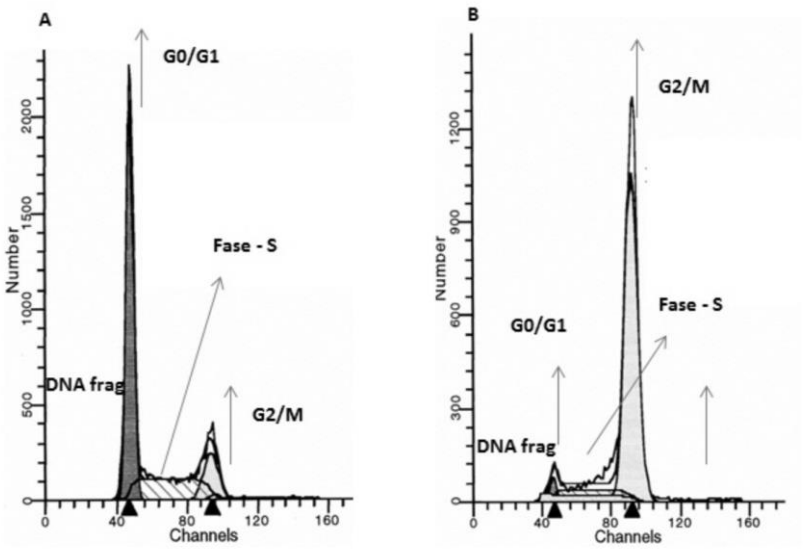


Figura 52– Exemplos de histogramas representativos das fases do ciclo celular obtido pelo citômetro de fluxo FACSCalibur. Analisado Wind mdi.

4.4.1 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo na monocultura celular de células endoteliais humanas (Grupo 1)

A avaliação da distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular das células endoteliais humanas em monocultura tratadas com *stent* convencional (Grupo 1 – BMS) ou *stent* farmacológico (Grupo 1 – DES) evidenciou que no período de 24 horas houve uma diminuição significativa de células nas fases G0/G1 e aumento significativo das fases G2/M no Grupo 1 – DES, caracterizando um estímulo inibitório nas fases iniciais do ciclo (Figura 52-A).

No período de 48 horas, para o Grupo 1 – BMS houve um aumento significativo das células nas fases do ciclo celular de síntese e preparação para divisão celular da fase S e G2/M, caracterizando um estímulo de proliferação celular em resposta ao estímulo inflamatório à presença de um corpo estranho. No Grupo 1 – DES no período de 48 horas manteve-se o resultado encontrado em 24 horas no que diz respeito as fases G2/M. (Figura 52-B).

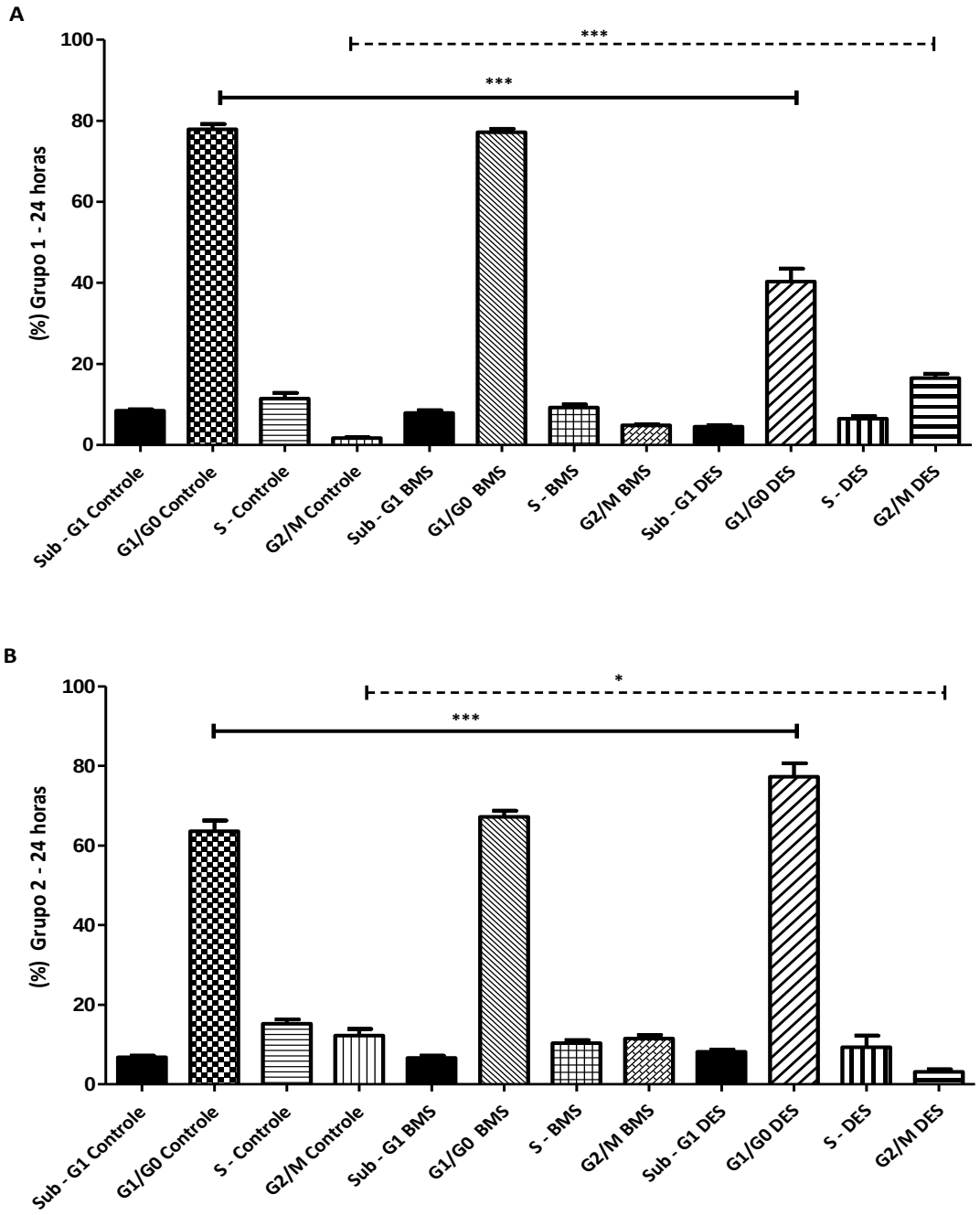


Figura 53- Distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular do Grupo 1: células endoteliais humanas em monocultura tratadas com stent convencional (Grupo 1 – BMS) ou stent farmacológico (Grupo 1 – DES) nos períodos de tratamento de 24 **(A)** e 48 horas **(B)**. Grau de significância estatística * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

4.4.2 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo na monocultura células musculares lisas de aorta humana (Grupo 2)

A avaliação da distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular de células musculares lisas de aorta humana em monocultura tratadas com *stent* convencional (Grupo 2 – BMS) ou *stent* farmacológico (Grupo 2 – DES) evidenciou que no período de 24 horas houve um aumento significativo de células na fase G0/G1 e diminuição significativa de células na fase G2/M no Grupo 2 – DES em relação ao grupo controle, caracterizando um estímulo inibitório nas fases iniciais do ciclo celular (Figura 53-A).

No período de 48 horas houve um aumento significativo na distribuição da população celular na fase G2/M no Grupo 2 – DES em relação ao grupo controle, sem alteração das demais fases, caracterizando inibição do ciclo na fase tardia (Figura 53-B).

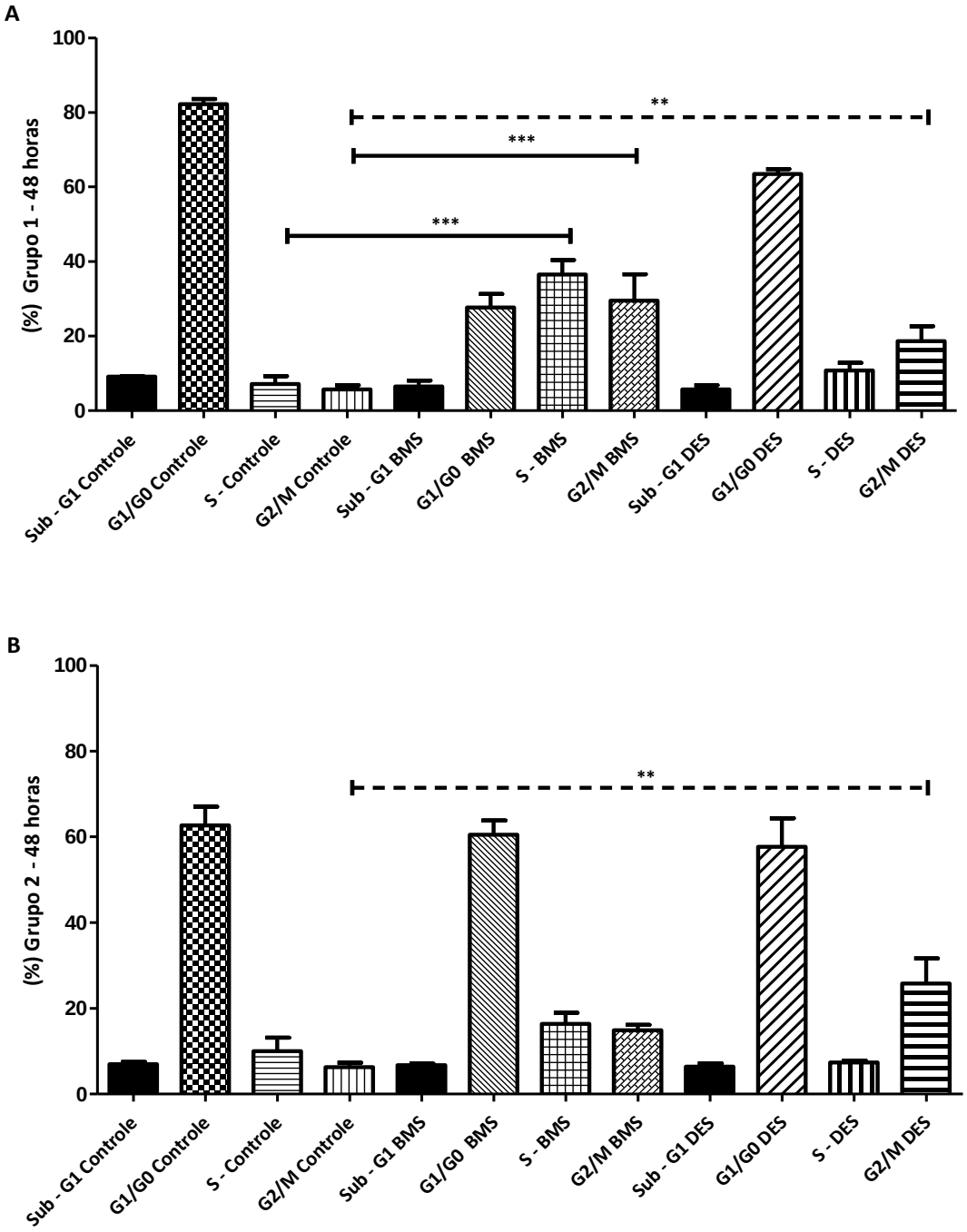


Figura 54- Distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular do Grupo 2: células musculares lisas de aorta humana em monocultura tratadas com stent convencional (Grupo 2–BMS) ou stent farmacológico (Grupo 2 – DES) nos períodos de tratamento de 24 **(A)** e 48 horas **(B)**. Grau de significância estatística ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.4.3 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo na cocultura celular Grupo 3 (Modelo-II)

A avaliação da distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular de células do Grupo 3 e Modelo-II (células endoteliais humanas na concentração 0,5 x 10^5 cél/mL e células musculares lisas de aorta humana na concentração 0,062 x 10^5 cél/mL) em cocultura de células tratadas com *stent* convencional (Grupo 3 – BMS) ou *stent* farmacológico (Grupo 3 – DES) evidenciou que no período de 24 horas no Grupo 3 – DES houve aumento da população celular nas fases G2/M do ciclo celular em relação ao grupo controle. No período de 48 horas esse resultado se manteve, evidenciando que a presença do DES nesse modelo de cocultura, caracterizou um estímulo inibitório nas fases tardias do ciclo celular (Figura 54).

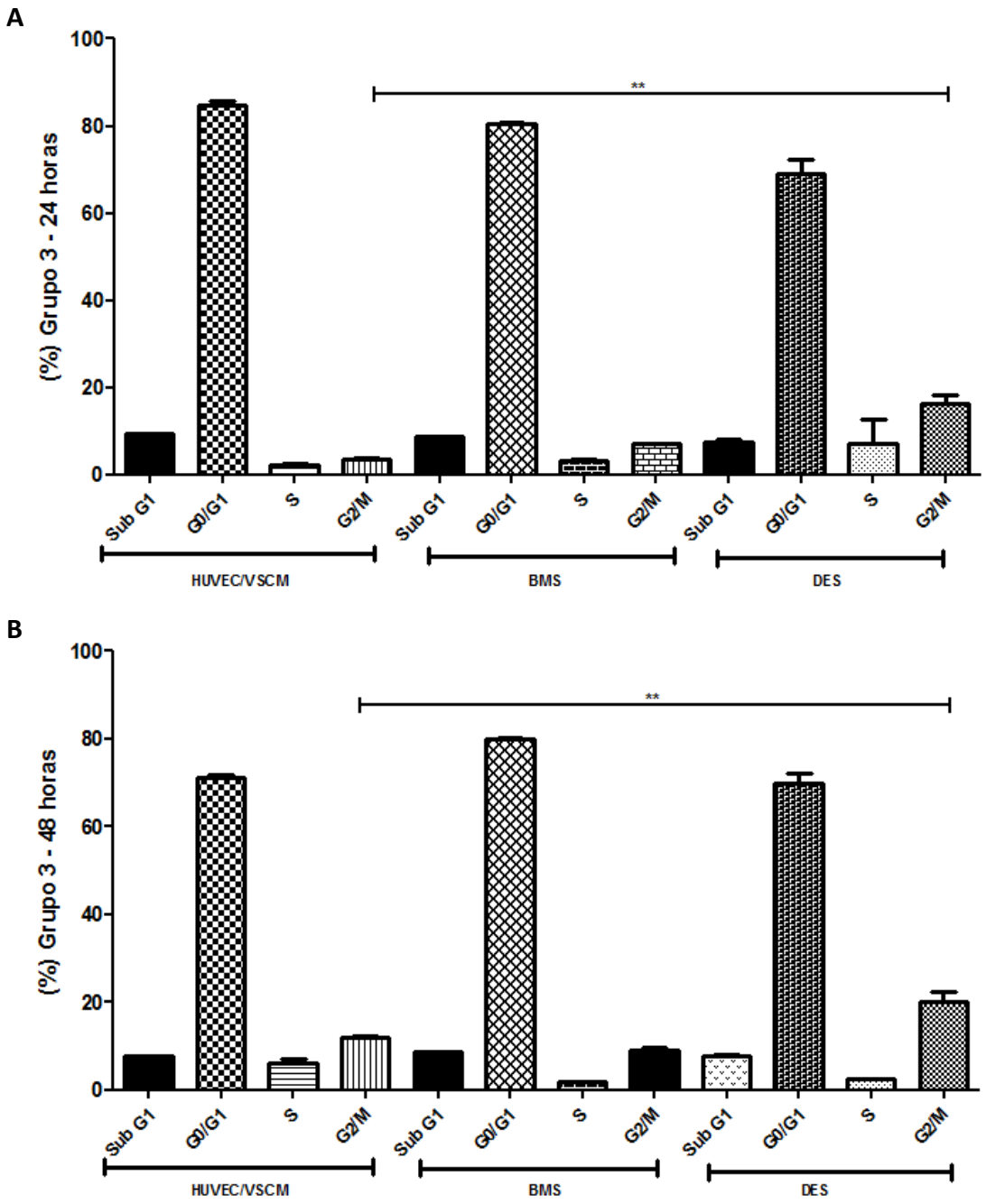


Figura 55- Distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular da cocultura Grupo 3: células endoteliais humanas na concentração de 0,5 x 10^5 cél/mL e células musculares lisas de aorta humana na concentração de 0,062 x 10^5 cél/mL (Modelo-II) tratadas com *stent* convencional (Grupo 3 – BMS) ou *stent* farmacológico (Grupo 3 – DES) nos períodos de tratamento de 24 **(A)** e 48 horas **(B)**. HUVEC: células endoteliais humanas, VSMC: células musculares lisas de aorta humana, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. Grau de significância estatística ** $p < 0,01$.

4.4.4 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo na cocultura Grupo 4 (Modelo-I)

A análise da distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular de células do Grupo 4 e Modelo-I (células musculares lisas de aorta humana na concentração de 0,5 x 10^5 cél/mL e células endoteliais humanas na concentração de 0,062 x 10^5 cél/mL) em cocultura de células tratadas com *stent* convencional (Grupo 4 – BMS) ou *stent* farmacológico (Grupo 4 – DES) evidenciou que no período de 24 horas no Grupo 4 – DES houve aumento da população celular nas fases G2/M do ciclo celular em relação ao grupo controle caracterizando um estímulo inibitório nas fases tardias do ciclo celular.

No período de 48 horas, houve diminuição significativa da população celular nas fases G0/G1 no Grupo 4 – BMS e também no Grupo 4 – DES, e aumento da população celular nas fases G2/M no Grupo 4 – DES evidenciando mais uma vez estímulo inibitório nas fases tardias do ciclo celular (Figura 55).

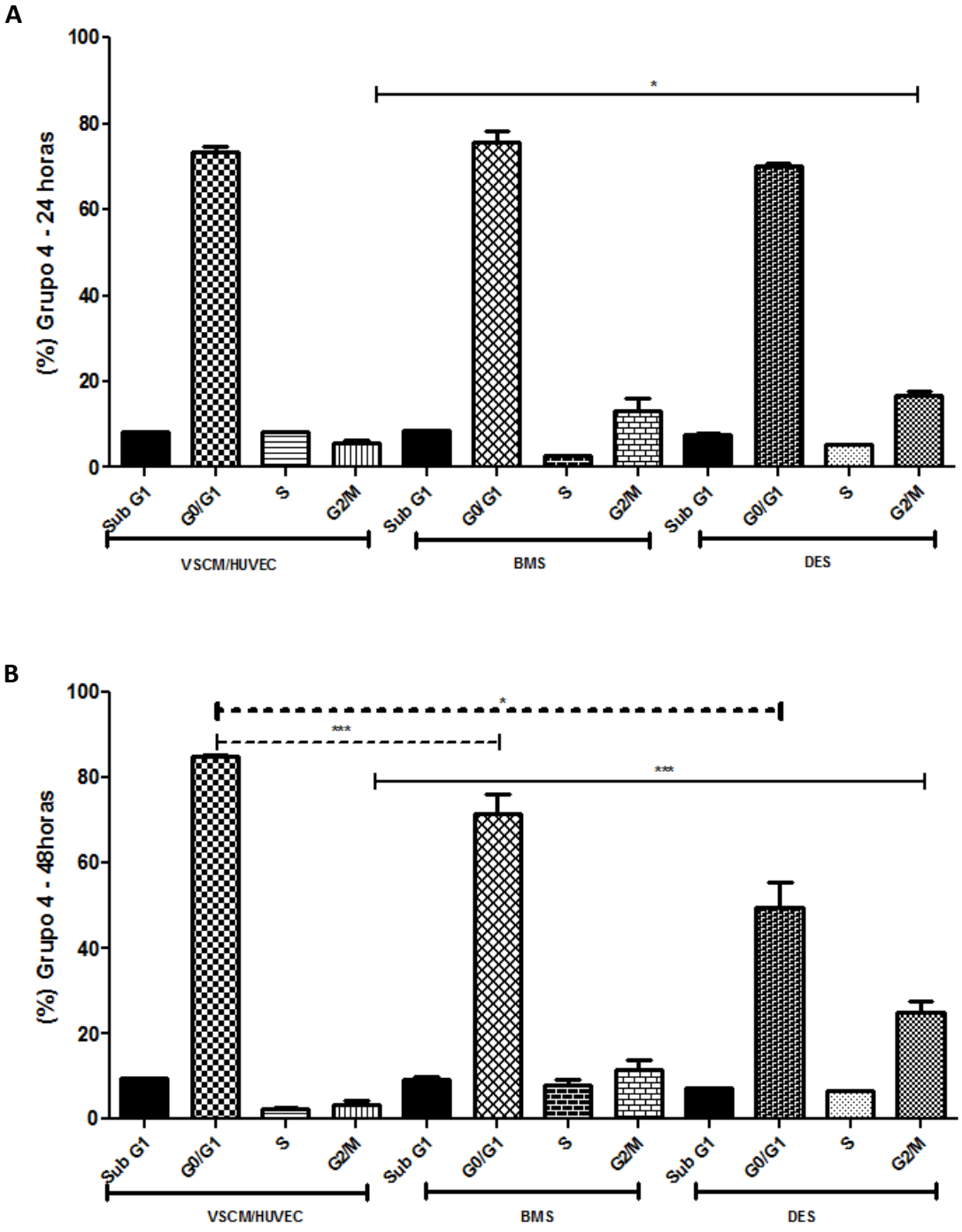


Figura 56- Distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular da cocultura Grupo 4: células musculares lisas de aorta humana na concentração de 0,5 x 10^5 cél/mL e células endoteliais humanas na concentração de 0,062 x 10^5 cél/mL (Modelo-I) tratadas com *stent* convencional (Grupo 4 – BMS) ou *stent* farmacológico (Grupo 4 – DES) nos períodos de tratamento de 24 **(A)** e 48 horas **(B)**. HUVEC: células endoteliais humanas, VSMC: células musculares lisas de aorta humana, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. Grau de significância estatística * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

4.4.4.1 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo na cocultura celular Grupo 5 (Modelo-II)

A avaliação da distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular de células do Grupo 5 e Modelo-II com adição do soro rico em plaquetas (células endoteliais humanas na concentração 0,5 x 10^5 cél/mL e células musculares lisas de aorta humana na concentração 0,062 x 10^5 cél/mL) em cocultura de células tratadas com *stent* convencional (Grupo 5 – BMS) ou *stent* farmacológico (Grupo 5 – DES) evidenciou que no período de 24 horas houve um aumento significativo de células na fase S no Grupo 5 – BMS em comparação ao controle e também em comparação ao Grupo 5 – DES. Com relação ao Grupo 5 – DES, houve uma diminuição significativa de células na fase S em relação ao controle e também em relação ao grupo 5 – BMS e aumento significativo de células na fase G0/G1 evidenciando inibição do ciclo na fase de síntese e aumento de células nas fases iniciais refletindo parada do ciclo celular na fase G0/G1. No período de 48 horas, não houve diferença nas populações celulares nos diferentes grupos (Figura 56).

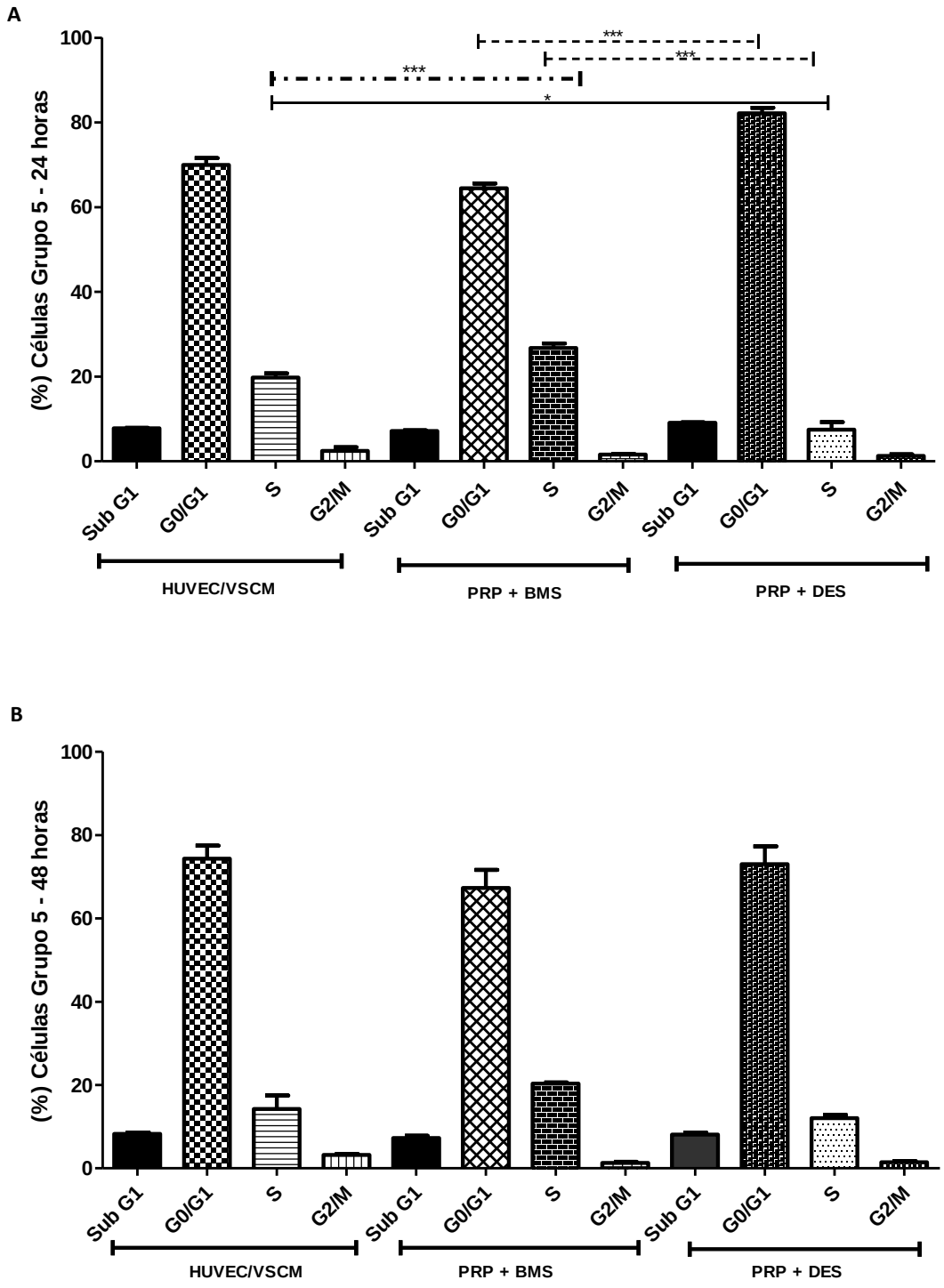


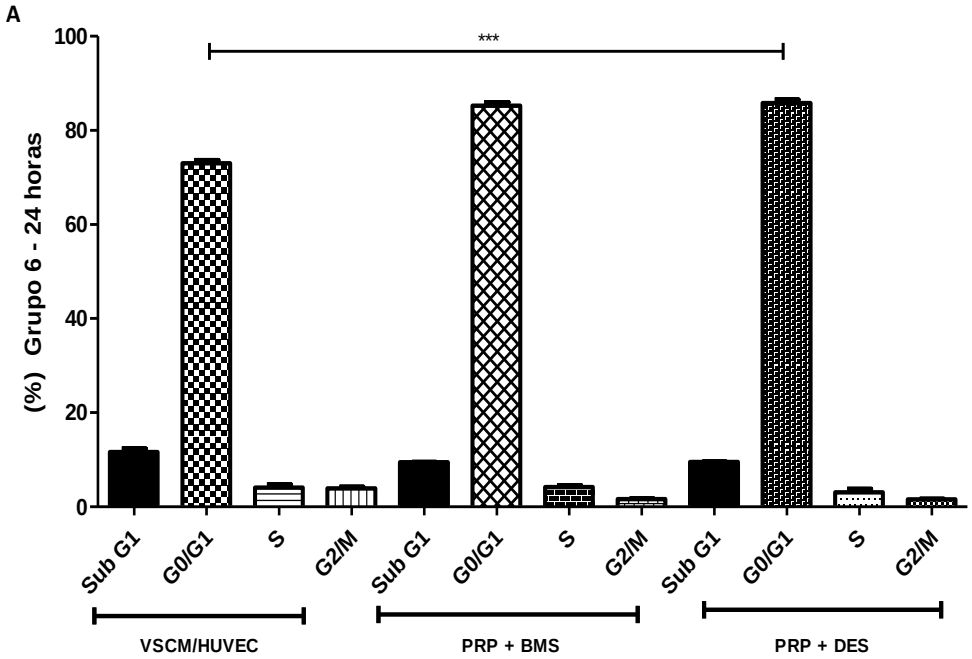
Figura 57- Distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular da cocultura Grupo 5: células endoteliais humanas na concentração de 0,5 x 10^5 cél/mL e células musculares lisas de aorta humana na concentração de 0,062 x 10^5 cél/mL (Modelo-I) com soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent* convencional (Grupo 5 – BMS) ou *stent* farmacológico (Grupo 5 – DES) nos períodos de tratamento de 24 **(A)** e 48 horas **(B)**. BMS:

stent convencional, DES: *stent* farmacológico, PRP: soro rico em plaquetas à 10%. Grau de significância estatística * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

4.4.4.2 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo na cocultura celular Grupo 6 (Modelo-I)

A análise da distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular de células do Grupo 6 e Modelo-I com adição do soro rico em plaquetas (células musculares lisas de aorta humana na concentração de $0,5 \times 10^5$ cél/mL e células endoteliais humanas na concentração de $0,062 \times 10^5$ cél/mL) em cocultura de células tratadas com *stent* convencional (Grupo 6 – BMS) ou *stent* farmacológico (Grupo 6 – DES) evidenciou que no período de 24 horas houve aumento da população celular nas fases G0/G1 em ambos os grupos em comparação ao controle, nos mostrando que com adição do PRP a 10% na cultura houve inibição do ciclo nas fases iniciais.

No período de 48 horas no Grupo 6 – DES houve um aumento significante das células nas fases G0/G1 e uma diminuição na população celular na fase S e na fase G2/M em comparação ao grupo controle e ao Grupo 6 – BMS, refletindo uma inibição da capacidade proliferativa. Ocorreu ainda aumento na população celular na fase G2/M acompanhado por uma diminuição no número de células na fase G0/G1 no Grupo 6 – BMS (Figura 57).



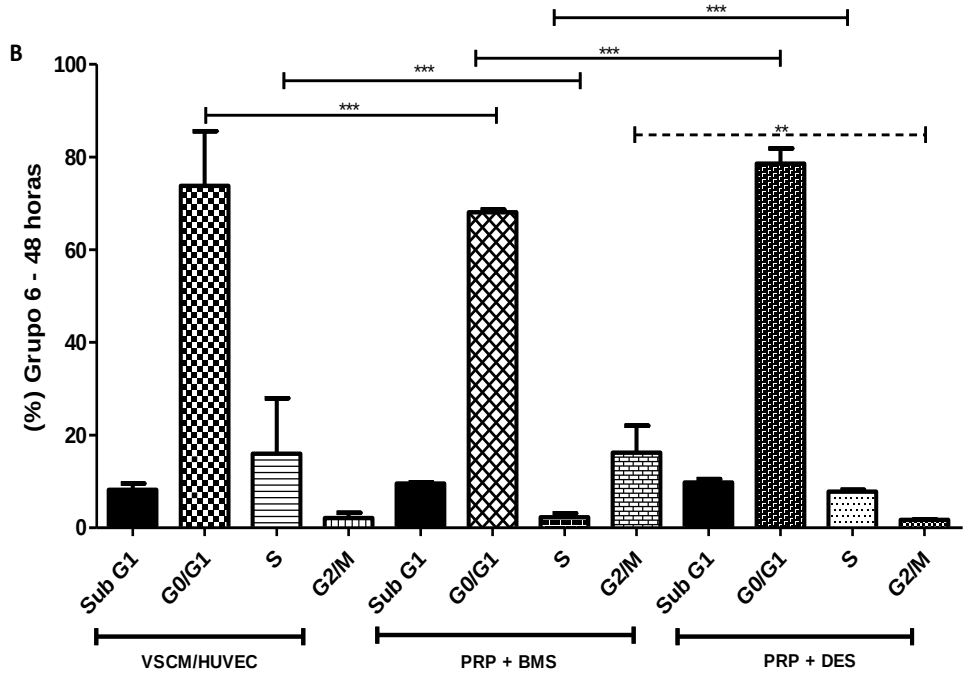


Figura 58- Distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular da cocultura Grupo 6: células musculares lisas de aorta humana na concentração de 0,5 x 10^5 cél/mL e células endoteliais humanas na concentração de 0,062 x 10^5 cél/mL (Modelo-I) com soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent* convencional (Grupo 6 – BMS) ou *stent* farmacológico (Grupo 6 – DES) nos períodos de tratamento de 24 **(A)** e 48 horas **(B)**. BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico, PRP: soro rico em plaquetas à 10%. rau de significância estatística ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.5. Análise da expressão de marcadores celulares

4.5.1 Análise da expressão de marcadores celulares envolvidos nas vias de apoptose e controle de proliferação celular

Análise da expressão de marcadores celulares envolvidos nas vias de apoptose e controle de proliferação celular foi realizada estudando o perfil de expressão dos marcadores caspase-3, PCNA, p-27 e ciclina D1 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura e cocultura celular na presença ou ausência de soro rico em plaquetas a 10% tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas.

Não houve diferença na taxa de produção dos marcadores celulares envolvidos nas vias de apoptose e controle de proliferação celular nas diferentes condições de cultura, evidenciando que o sirolimo não induziu apoptose ou necrose nas células endoteliais humanas e nas células musculares lisas de aorta humana caracterizando ausência de efeito citotóxico nas concentrações do fármaco utilizadas. Os resultados estão expressos em porcentagem de expressão média dos respectivos marcadores e estão expressos nas Figuras 58 a 61.

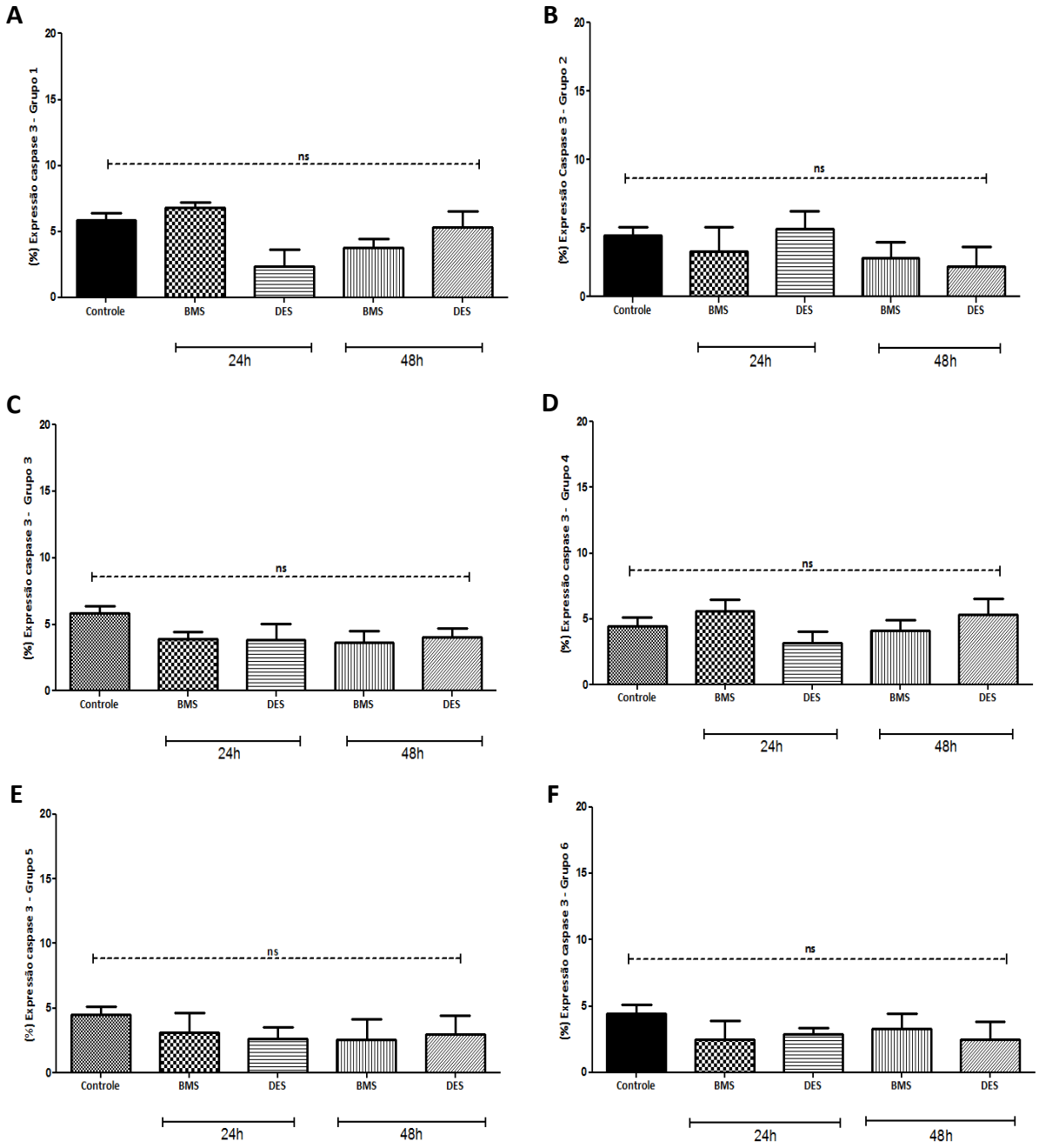


Figura 59- Expressão do marcador celular envolvido nas vias de apoptose e controle de proliferação celular caspase-3 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura (**A** e **B**) e cocultura celular na ausência (**C** e **D**) e na presença (**E** e **F**) de soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas. BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. n.s.= não significativo.

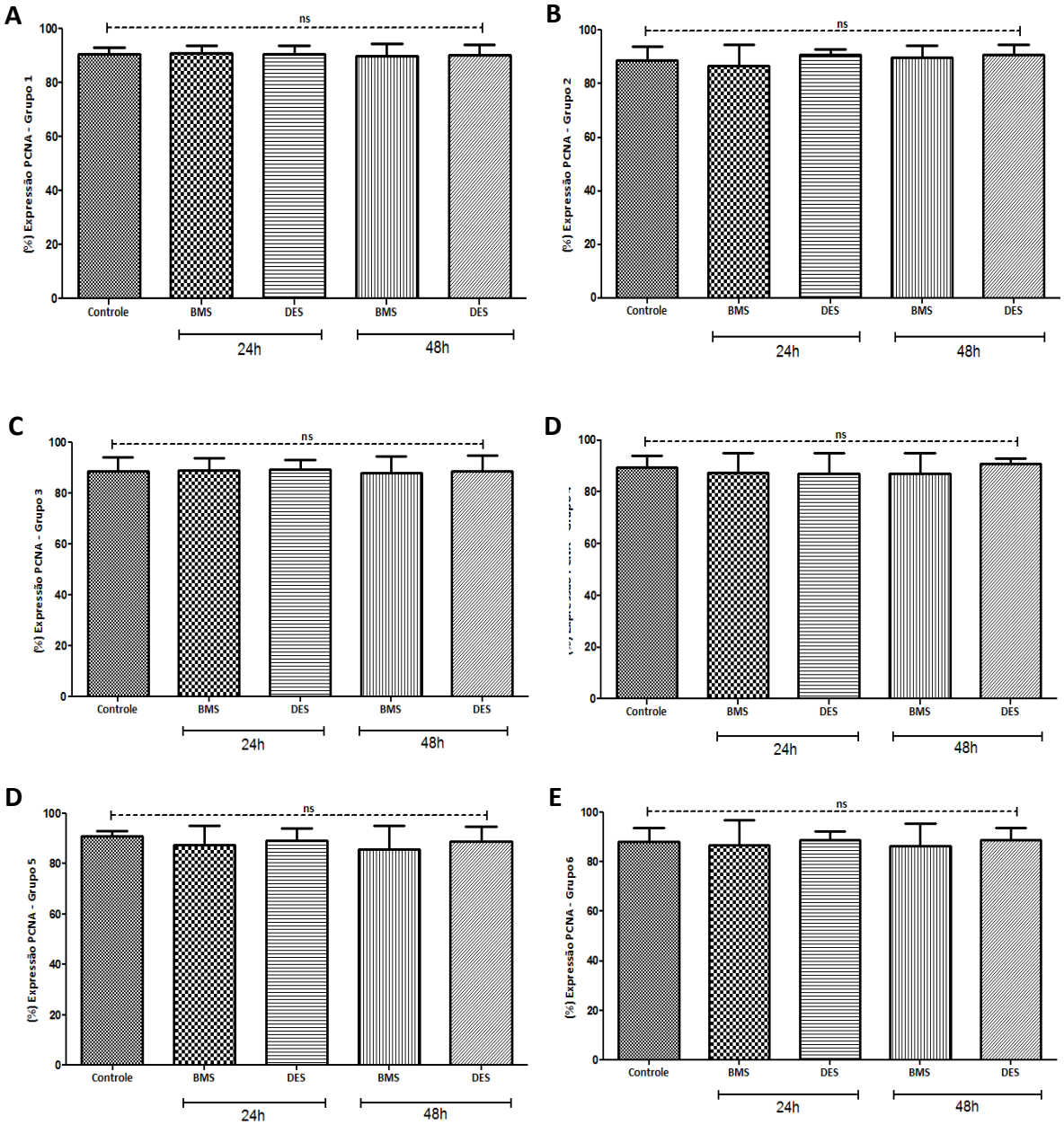


Figura 60- Expressão do marcador celular envolvido nas vias de controle de proliferação celular PCNA nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura (**A** e **B**) e cocultura celular na ausência (**C** e **D**) e na presença (**E** e **F**) de soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas. PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. n.s.= não significativo.

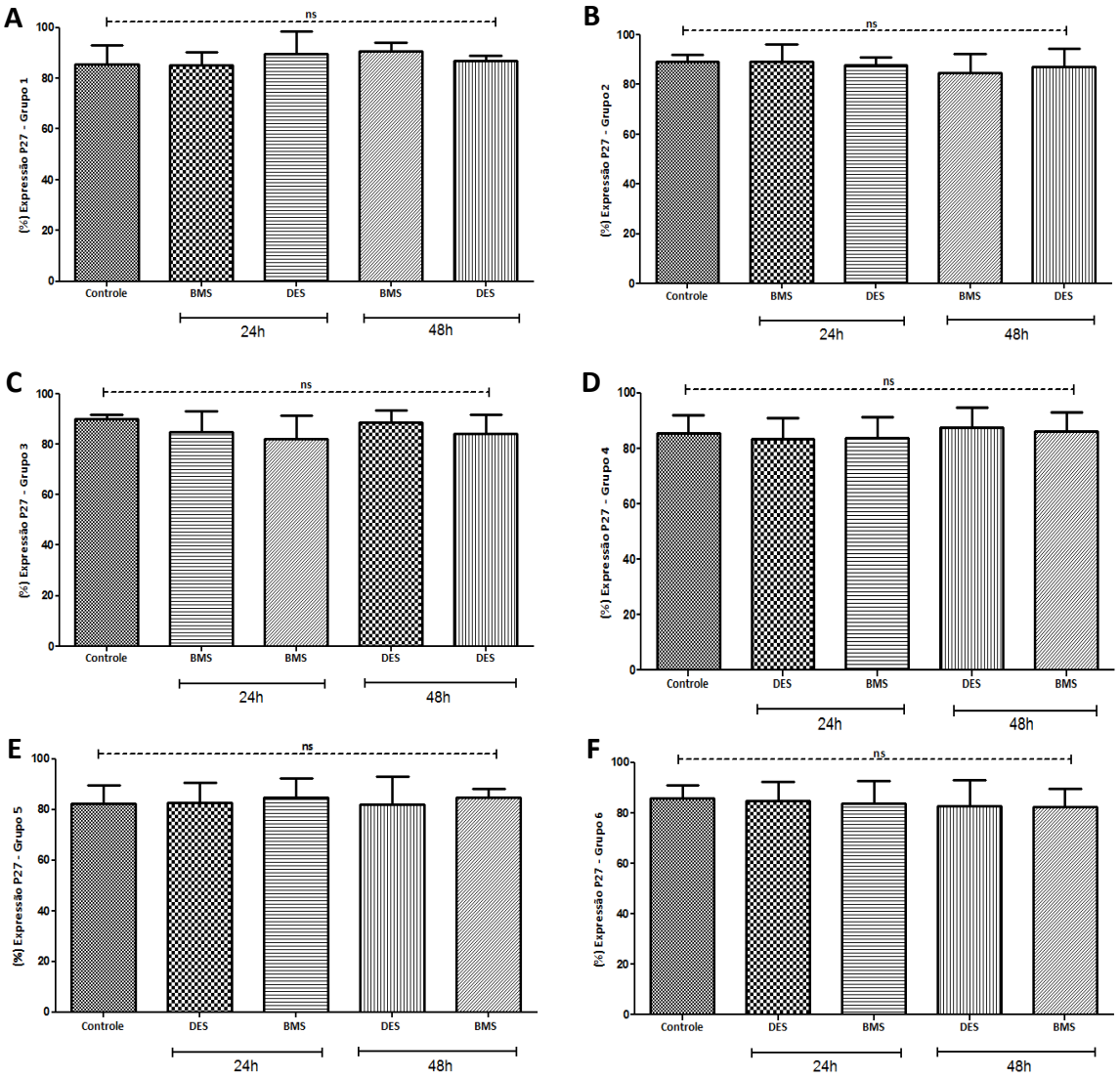


Figura 61- Expressão do marcador celular envolvido nas vias de controle de proliferação celular p-27 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura (**A** e **B**) e cocultura celular na ausência (**C** e **D**) e na presença (**E** e **F**) de soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas. BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. n.s.= não significativo.

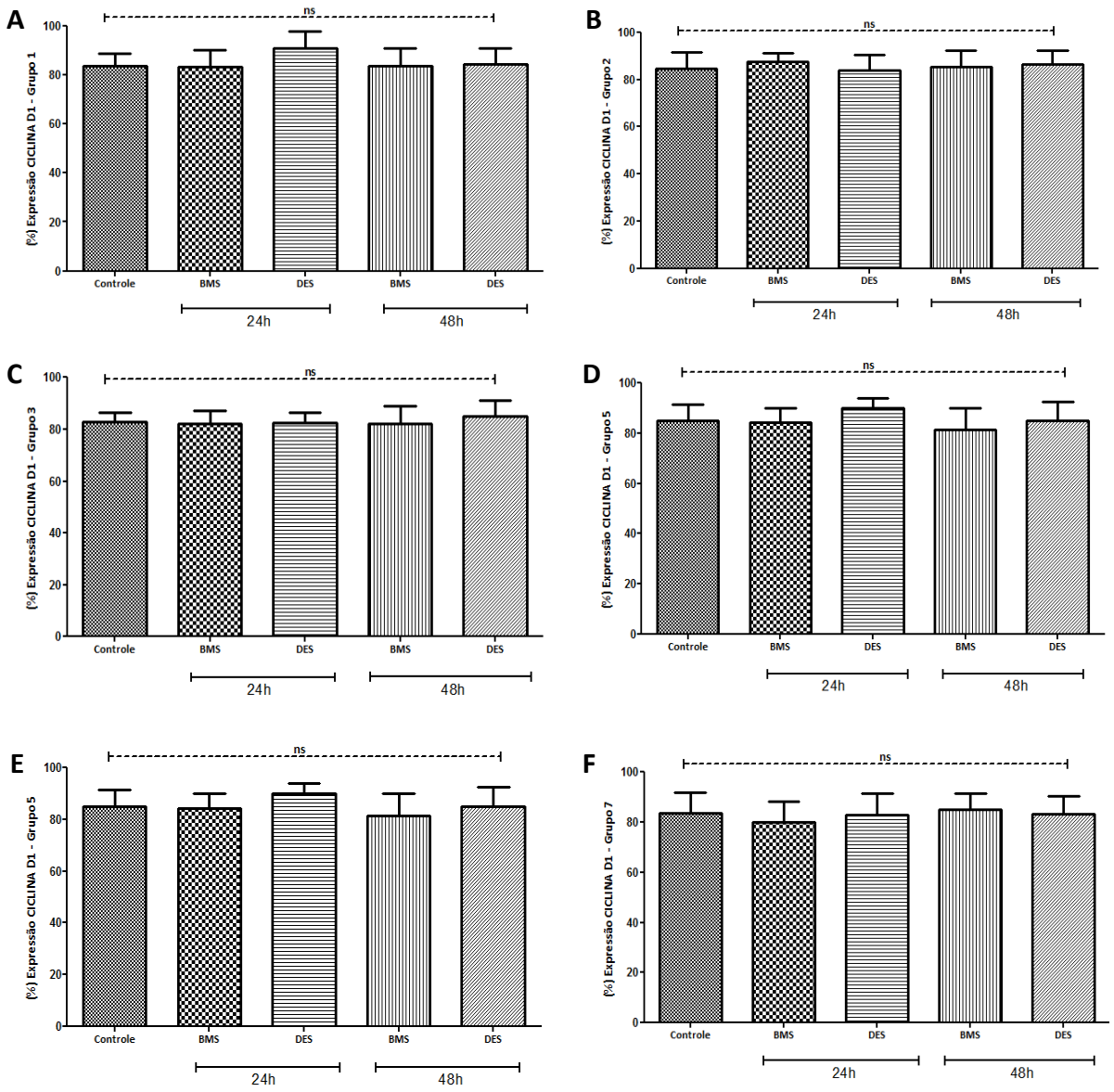


Figura 62- Expressão do marcador celular envolvido nas vias de controle de proliferação celular ciclina-D1 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura (**A** e **B**) e cocultura celular na ausência (**C** e **D**) e na presença (**E** e **F**) de soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas. BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. n.s.= não significativo.

4.5.2 Análise da expressão de marcadores celulares envolvidos processo inflamatório

Análise da expressão de marcadores celulares envolvidos no processo inflamatório ICAM-1, IL-1 beta, TNF-DR4, IL-6 e MCP-1 e do marcador VEGF-R1 envolvido também na angiogênese foi realizada nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura e cocultura celular na presença ou ausência de soro rico em plaquetas a 10% tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas.

Com relação ao marcador ICAM-1 (Figuras 62 e 63), houve uma diminuição significativa da expressão na monocultura de células endoteliais humanas nos períodos de 24 e 48 horas quando comparadas ao controle. Houve expressão significativa na cocultura no Grupo 4 – DES quando comparado ao Grupo 6 – BMS no período de 24 horas, no Grupo 4 – BMS quando comparado ao Grupo 6 – BMS no período de 48 horas e no grupo 4 – DES em relação ao grupo 6 – DES no período de 48 horas. Dessa forma é possível analisar que houve uma maior expressão do marcador ICAM-1 nos grupos na ausência do soro rico em plaquetas à 10% nos dois períodos de tempo avaliados.

Analisando a expressão do marcador TNF-DR4 (Figuras 64 e 65), observamos que houve maior produção no Grupo 5 – DES em comparação ao Grupo – 3 DES no período de 24 horas e maior expressão no Grupo 5 – DES 24 horas quando comparado ao Grupo 3 – DES 48 horas, evidenciando uma maior expressão e modulação nos grupos que receberam a adição do soro rico em plaquetas à 10%.

Com relação ao marcador celular envolvido no processo inflamatório IL-6 (Figura 66), houve as seguintes diferenças estatísticas:

- Maior expressão na monocultura de células endoteliais humanas no grupo que recebeu o *stent* farmacológico em relação ao grupo controle, como também no grupo que recebeu o *stent* convencional no período de 48 horas, evidenciando que a resposta inflamatória na célula endotelial na presença do *stent* farmacológico possui resposta mais precoce que na presença do *stent* convencional;

- Maior expressão na cocultura no Grupo 3 – DES quando comparada ao Grupo – 3 BMS no período de 24 horas e ao Grupo 3 – DES no período de 48 horas, evidenciando maior expressão deste marcador nos grupos que receberam *stent* farmacológico;

- Os resultados foram significativos para a cocultura no Grupo – 4 DES em 24 horas comparados ao Grupo – 4 DES em 48 horas e no Grupo – 4 BMS quando comparado ao Grupo – 4 DES em 48 horas, evidenciando que a resposta foi maior na presença de *stent* farmacológico no período mais precoce nessa condição de cocultura;

- A expressão do IL-6R foi maior no Grupo – 5 DES período 24 horas e Grupo – 5 DES período 48 horas quando comparado ao Grupo – 5 BMS em 24 horas, no Grupo 5 – BMS 24 horas comparado ao Grupo – 5 BMS em 48 horas e no Grupo 5 – DES em 24 horas em relação ao Grupo 5 – DES 48 horas, mostrando que na presença do soro rico em plaquetas à 10% houve um aumento da resposta inflamatória nos grupos que receberam *stent* convencional, e essa resposta tornou-se mais precoce. Por outro lado, para os *stents* farmacológicos a produção foi maior na presença do soro rico em plaquetas à 10% no período de 48 horas para essa condição de cocultura;

- Maior expressão no Grupo 6 – DES comparado ao Grupo 6 – BMS no período de tempo de 24 e 48 horas, ou seja, nessa condição de cocultura com adição do soro rico em plaquetas à 10%, sua expressão foi maior nos grupos que receberam *stents* farmacológicos;

- Quando submetidos às análises estatísticas comparativas intergrupos, na maioria das condições testadas, como é possível observar na Figura 67, houve maior expressão deste marcador nas condições de cocultura que receberam soro rico em plaquetas à 10% para ambos os *stents*.

Não houve diferença na expressão dos marcadores celulares envolvidos no processo inflamatório MCP-1, IL-1 beta e VEGF-R1 entre os diferentes grupos nos períodos de tempo analisados (Figuras 68 a 70).

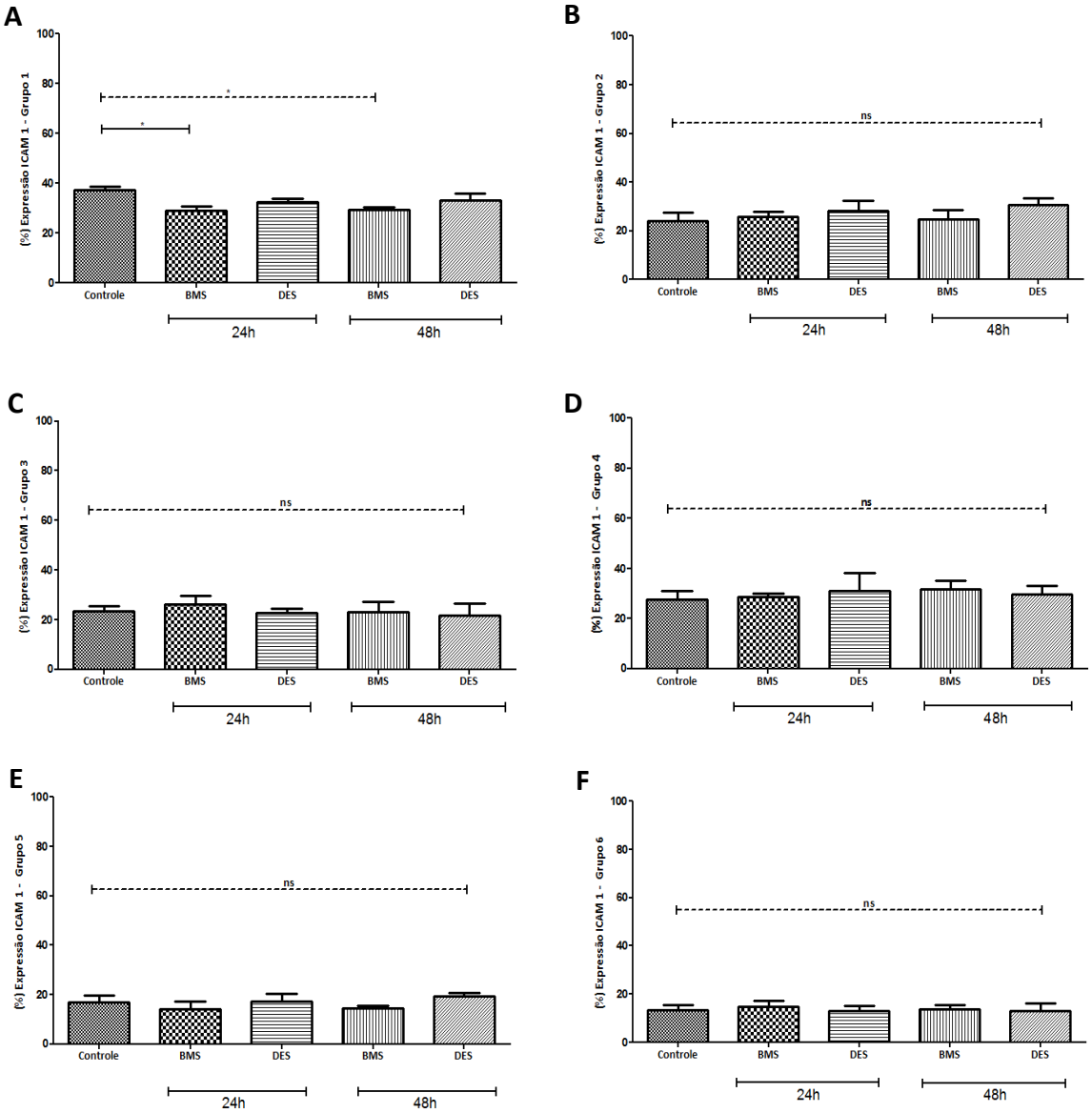


Figura 63- Expressão do marcador celular envolvido nas vias de processo inflamatório ICAM-1 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura (**A** e **B**) e cocultura celular na ausência (**C** e **D**) e na presença (**E** e **F**) de soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas. ICAM-1: molécula de adesão intercelular 1, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. n.s.= não significativo.

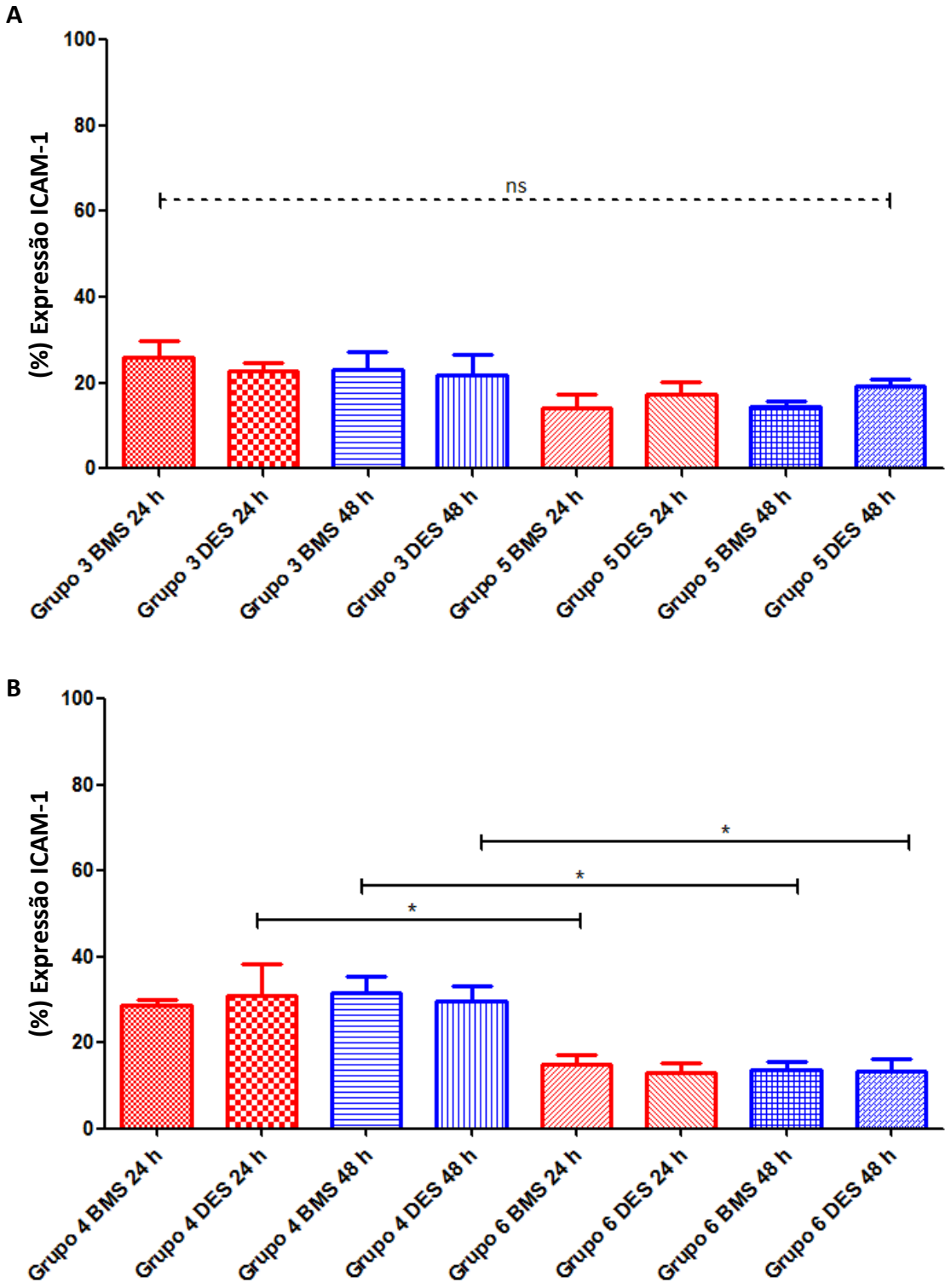


Figura 64– Comparação da expressão do marcador celular envolvido nas vias de processo inflamatório ICAM-4 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em cocultura celular tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas: **(A)** Grupos 3 e 5 (Modelo-II sem e com soro rico em plaquetas à 10%) e **(B)** Grupos 4 e 6 (Modelo-I sem e com soro rico em plaquetas à 10%). ICAM-4: molécula de adesão intercelular 4, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. Grau de significância estatística * $p < 0,05$. n.s.= não significativo.

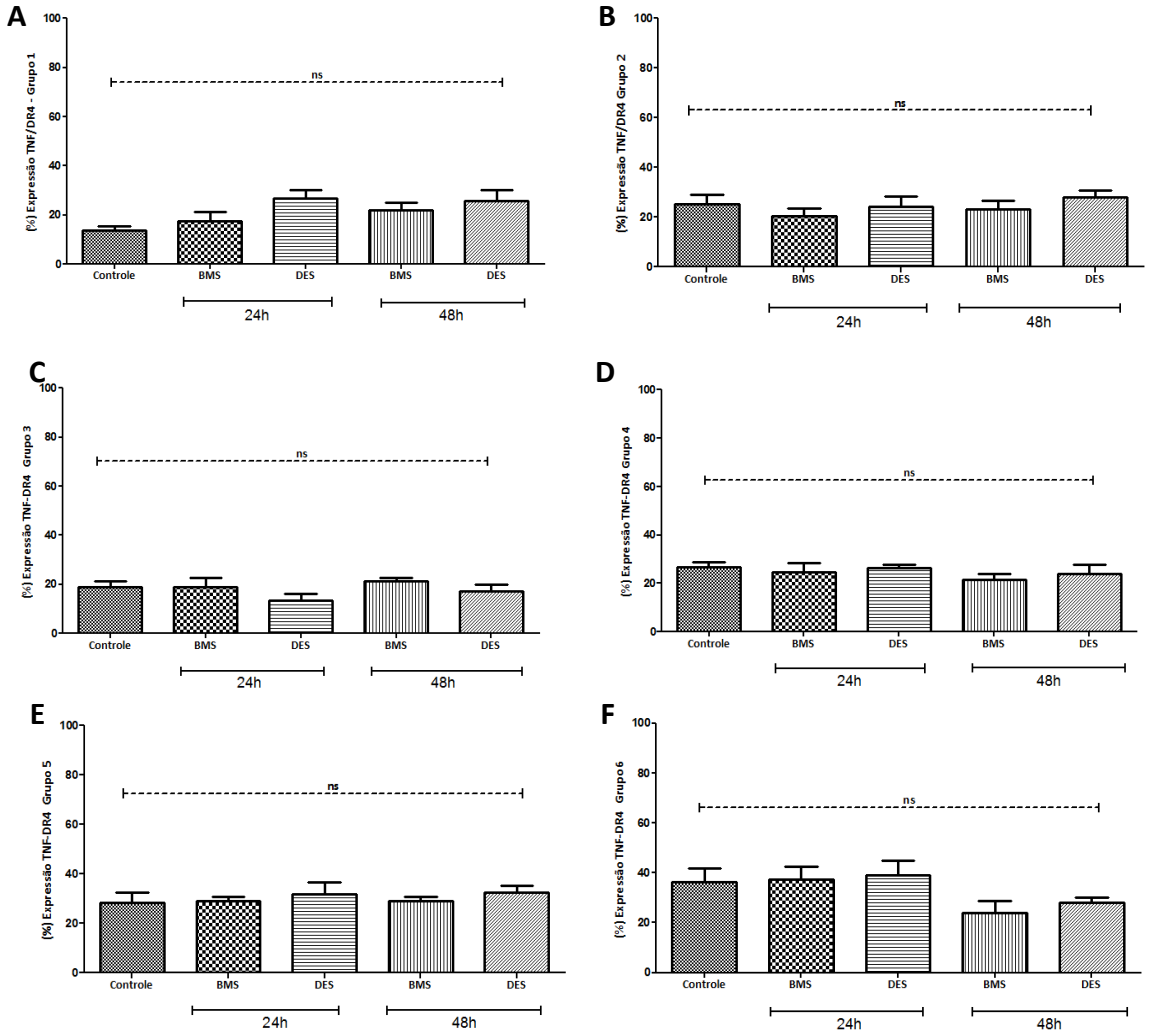


Figura 65- Expressão do marcador celular envolvido nas vias de processo inflamatório TNF-DR4 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura (**A** e **B**) e cocultura celular na ausência (**C** e **D**) e na presença (**E** e **F**) de soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas. TNF-DR4: receptor 4 do fator de necrose tumoral, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. n.s.= não significativo.

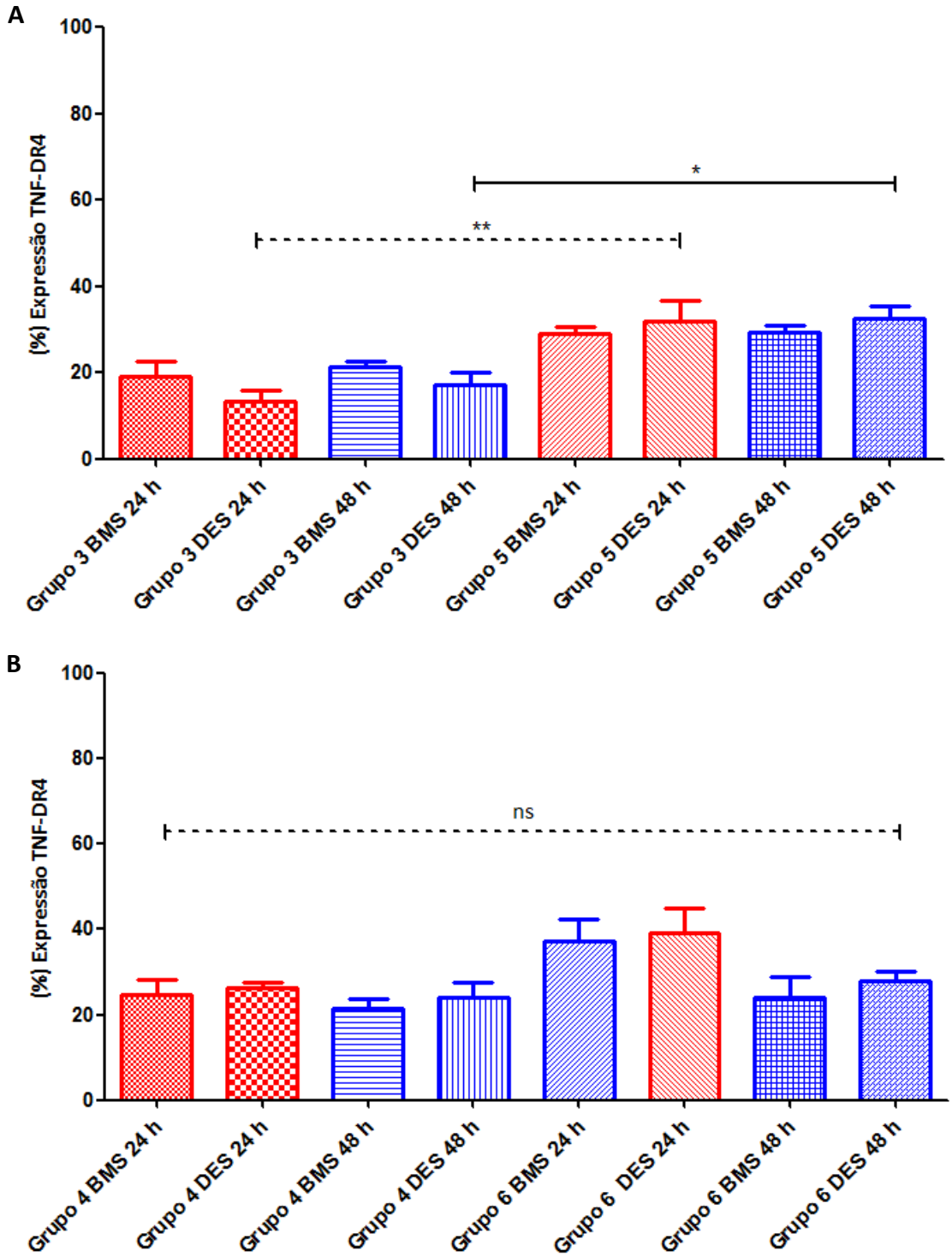


Figura 66– Comparação da expressão do marcador celular envolvido nas vias de processo inflamatório TNF-DR4 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em cocultura celular tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas: **(A)** Grupos 3 e 5 (Modelo-II sem e com soro rico em plaquetas à 10%) e **(B)** Grupos 4 e 6 (Modelo-I sem e com soro rico em plaquetas à 10%). TNF-DR4: receptor 4 do fator de necrose tumoral, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. Grau de significância estatística * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. n.s.= não significativo.

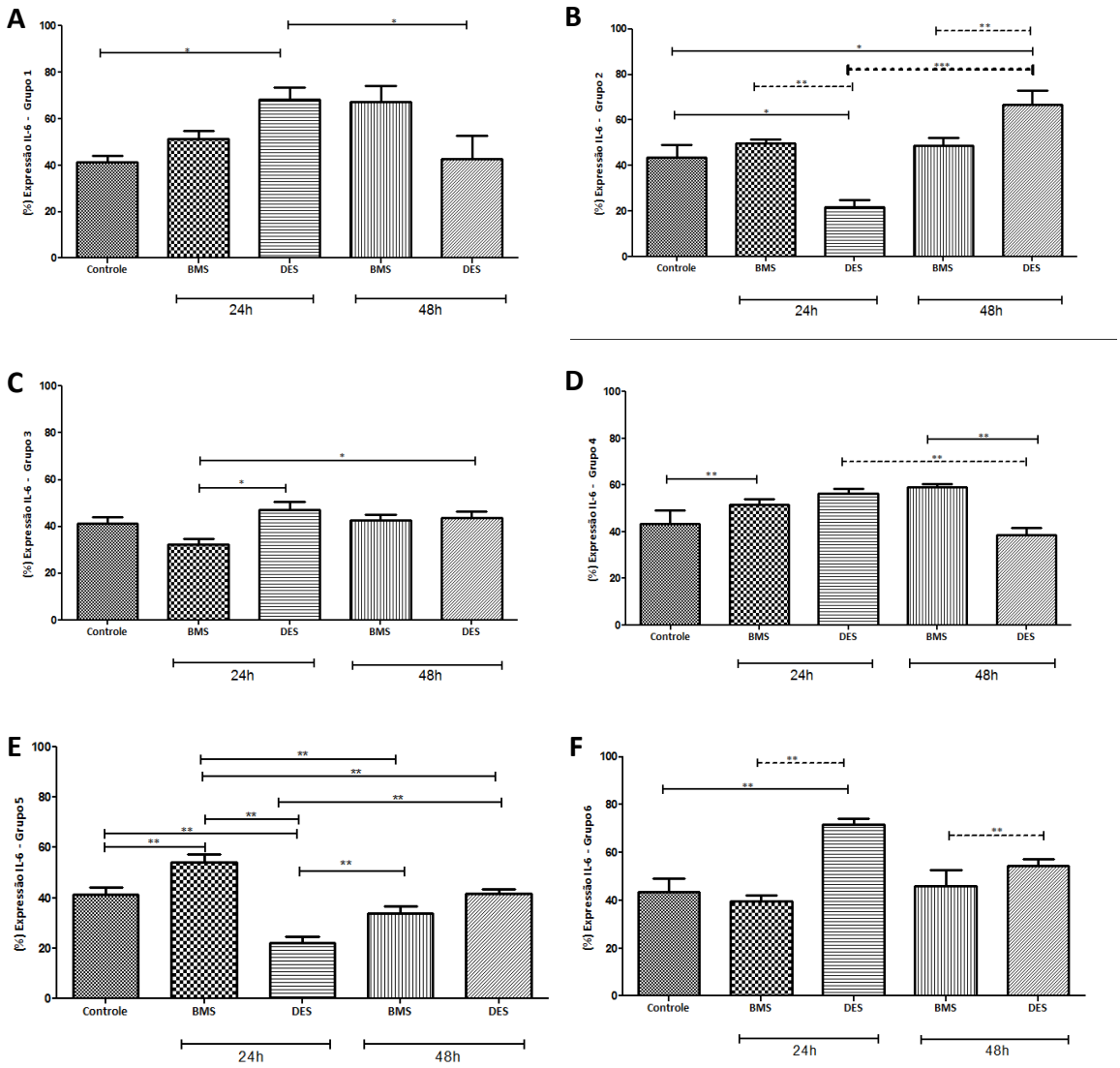


Figura 67- Expressão do marcador celular envolvido nas vias de processo inflamatório IL-6 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura (**A** e **B**) e cocultura celular na ausência (**C** e **D**) e na presença (**E** e **F**) de soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas. IL-6: interleucina-6, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. Grau de significância estatística * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. n.s.= não significativo.

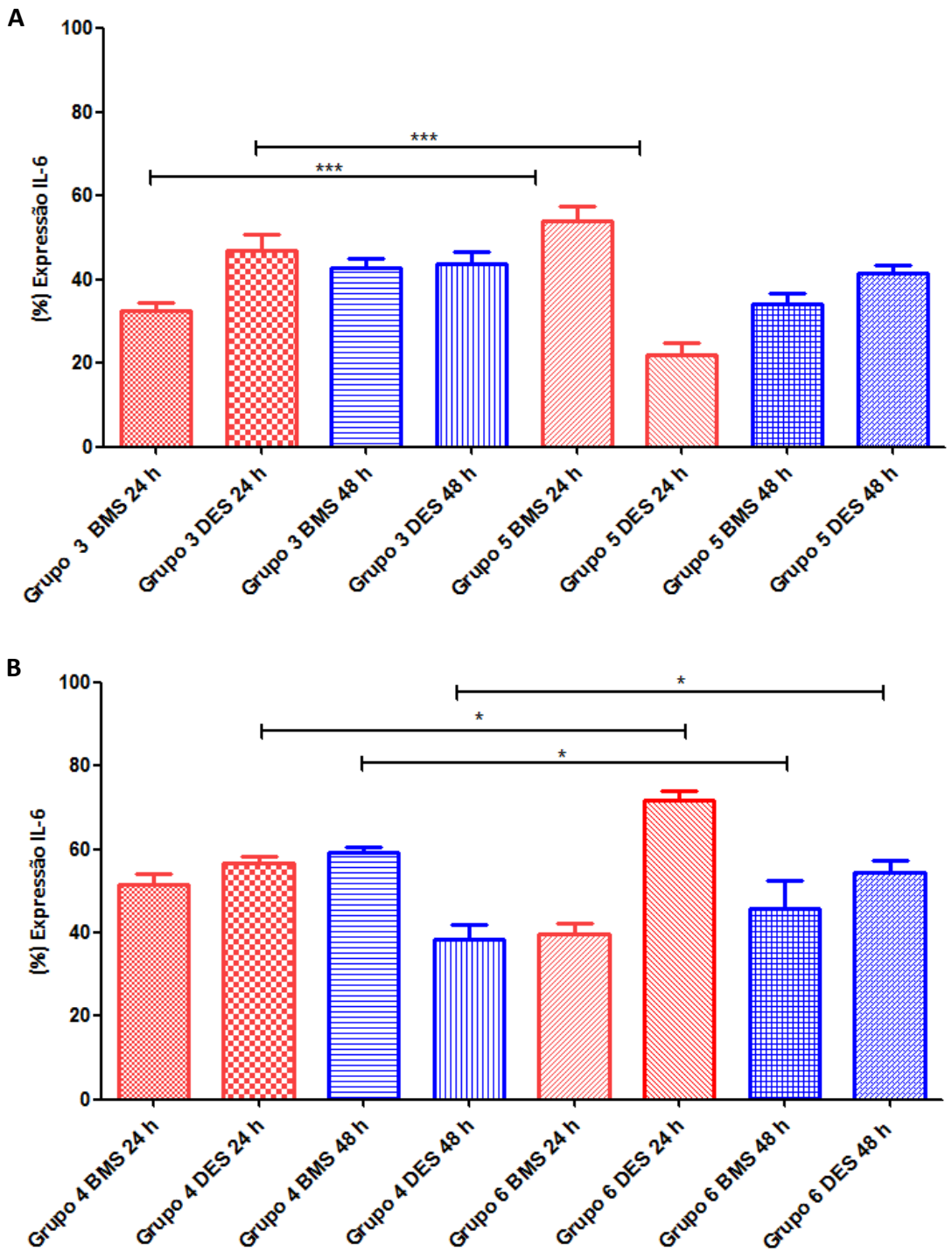


Figura 68– Comparação da expressão do marcador celular envolvido nas vias de processo inflamatório IL-6 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em cocultura celular tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas: **(A)** Grupos 3 e 5 (Modelo-II sem e com soro rico em plaquetas à 10%) e **(B)** Grupos 4 e 6 (Modelo-I sem e com soro rico em plaquetas à 10%). IL-6: interleucina-6, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. Grau de significância estatística * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

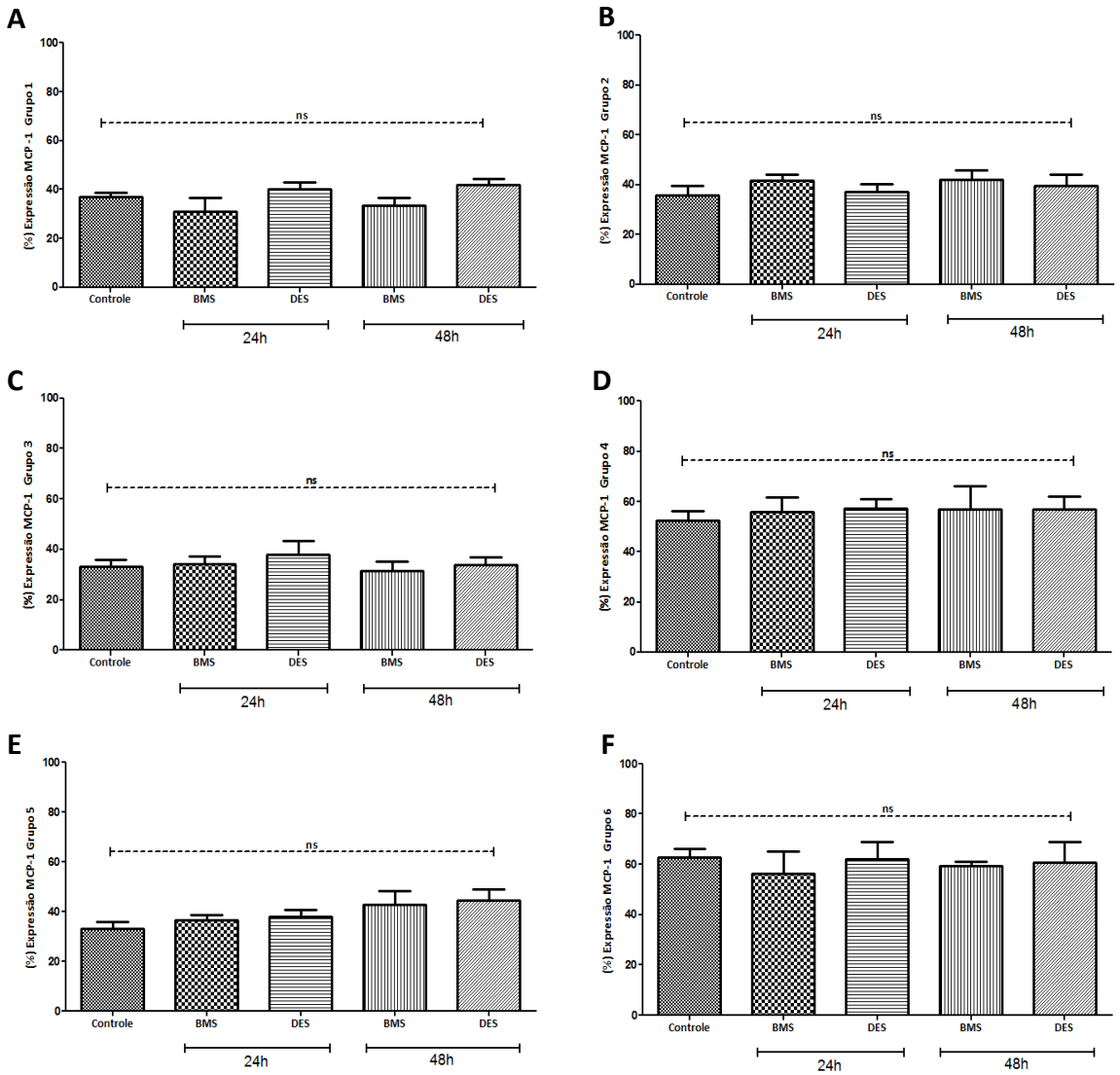


Figura 69- Expressão do marcador celular envolvido nas vias de processo inflamatório MCP-1 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura (**A** e **B**) e cocultura celular na ausência (**C** e **D**) e na presença (**E** e **F**) de soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas. MCP-1: proteína quimioatrativa de monócito-1, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. n.s.= não significativo.

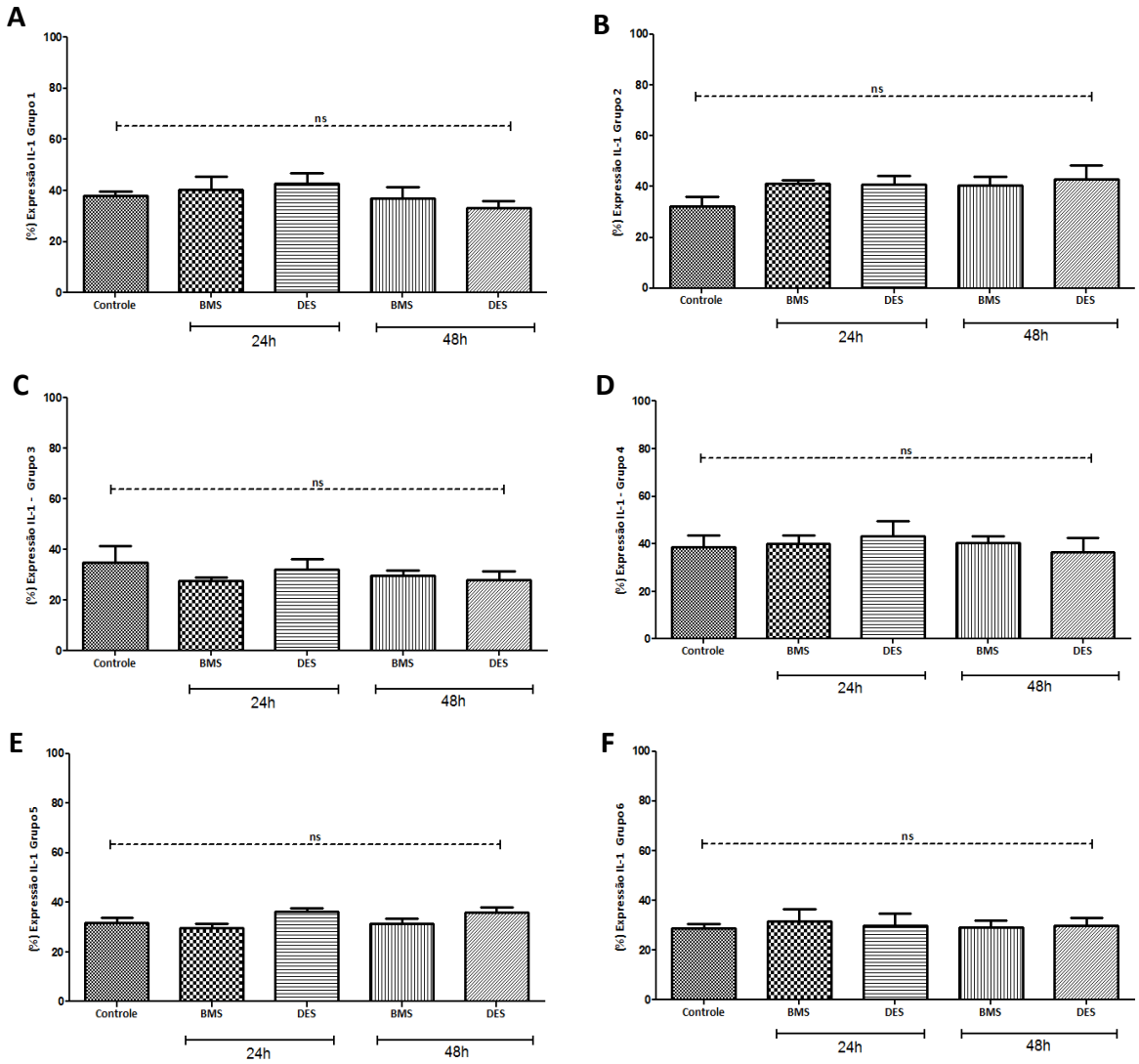


Figura 70- Expressão do marcador celular envolvido nas vias de processo inflamatório IL-1 beta nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura (**A** e **B**) e cocultura celular na ausência (**C** e **D**) e na presença (**E** e **F**) de soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas. IL-1 beta: interleucina-1 beta, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. n.s.= não significativo.

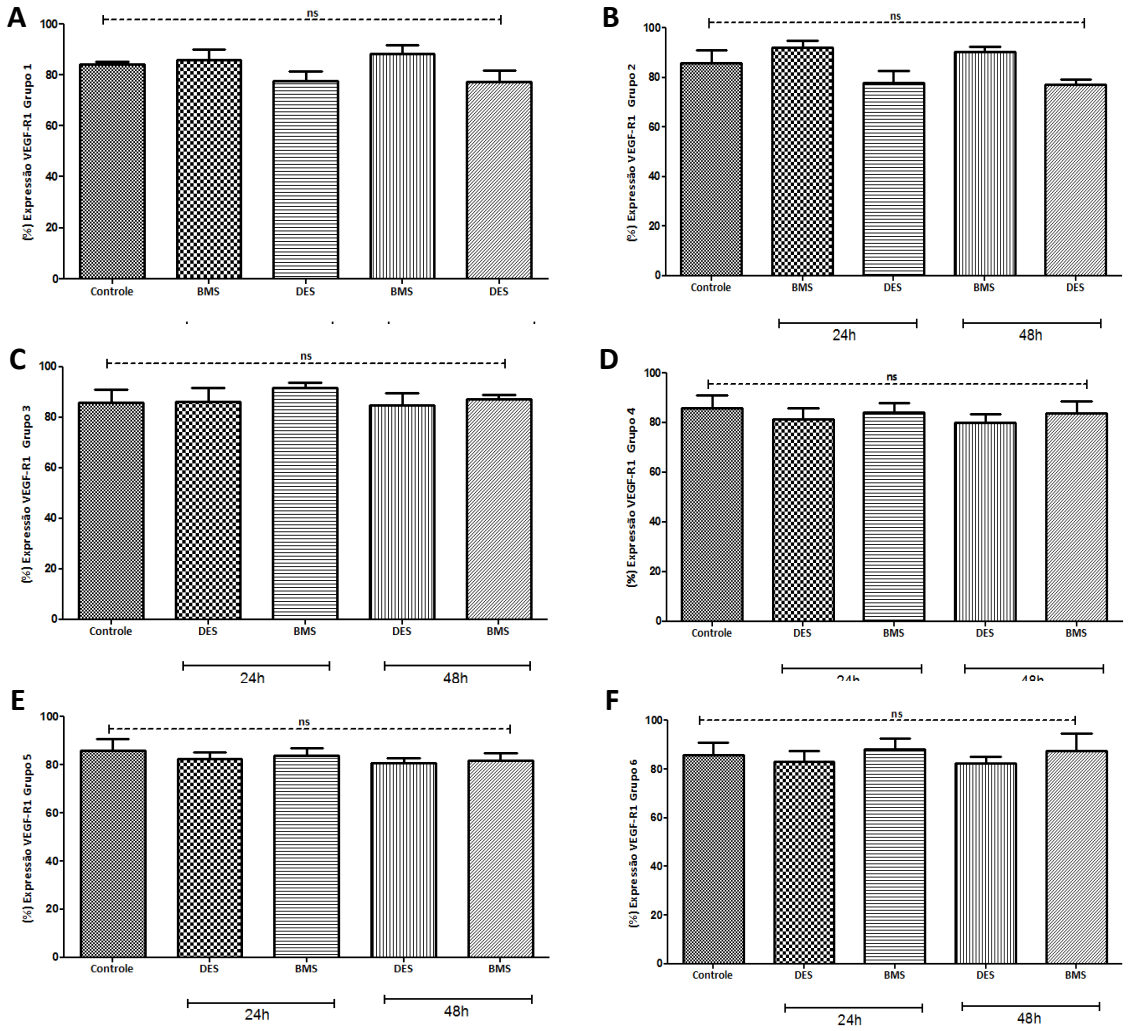


Figura 71- Expressão do marcador celular envolvido nas vias de processo inflamatório VEGF-R1 nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana em monocultura (**A** e **B**) e cocultura celular na ausência (**C** e **D**) e na presença (**E** e **F**) de soro rico em plaquetas à 10% tratadas com *stent* convencional ou farmacológico nos períodos de tratamento de 24 e 48 horas. VEGF-R1: receptor do fator de crescimento endotelial 1, BMS: *stent* convencional, DES: *stent* farmacológico. n.s.= não significativo.

5 Discussão

A hiperplasia neointimal decorrente da injúria na parede da artéria coronária causada pelo implante dos *stents*, e a consequente reestenose intra*stent*, limitavam os resultados da revascularização miocárdica através da intervenção coronária percutânea (ICP). Associa-se a isso o fato de que os *stents* eluidores de fármacos, principalmente os de primeira geração, estão associados com taxas de trombose subaguda e disfunção endotelial, ambos decorrentes de reendotelização insatisfatória.

Com o advento dos *stents* farmacológicos, que eluem principalmente as drogas inibidoras da mTOR, sirolimo e seus análogos (*rapalogs*), a hiperplasia neointimal foi limitada melhorando as taxas de reestenose intra*stent* no seguimento dos pacientes submetidos à ICP. Embora sirolimo e seus análogos sejam efetivos agentes antireestenóticos quando aplicados luminalmente através dos *stents*, seus efeitos em culturas celulares de células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana não foram muitos estudados, e o impacto da entrega local do fármaco sobre o ciclo celular, proliferação celular e nas alterações apoptóticas tem recebido pouca atenção na literatura. O presente estudo avaliou a atividade do sirolimo e seu análogo everolimo nas culturas celulares de células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana, no que diz respeito à proliferação celular, estresse oxidativo, ciclo celular e expressão de marcadores relacionados ao controle da proliferação e inflamação.

Determinamos a IC_{50} do everolimo, nas duas linhagens celulares, nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana, com valores maiores para as últimas, evidenciando a menor sensibilidade das células musculares lisas de aorta humana ao fármaco, quando comparadas com as células endoteliais. A IC_{50} do everolimo no nosso estudo para as células endoteliais humanas em 24 e 48 horas foi entre 10,47 a 14,85 µM (1,04 a 1,48 x 10^{-5} M) e para células musculares lisas de aorta humana em 24 e 48 horas foi de 9,48 a 22,24 µM (0,94 a 2,22 x 10^{-5} M). Não encontramos na literatura estudos que descrevessem a IC_{50} do everolimo nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana, apenas do sirolimo e de maneira semelhante ao nosso estudo, de um de seus anólogos, o tacromilus. No estudo de Matter *et al.*,[71] os autores demonstraram que a IC_{50} do tacrolimo nas células endoteliais humanas e musculares lisas, foi para as células endoteliais humanas 0,23 x 10^{-5} M (para o sirolimo nas mesmas células 7,1 x 10^{-10} M) e para as células musculares lisas de veia safena humanas foi 3,8 x 10^{-7} M (para o sirolimo nas mesmas células 4,1 x 10^{-9} M), evidenciando tal qual o nosso estudo, uma menor sensibilidade das células musculares lisas

ao inibidor da mTOR que quando comparado com as células endoteliais. Também corroborando com o estudo citado, a IC_{50} do derivado do sirolimo (no nosso caso o everolimo e no estudo citato o tacrolimo) foi de 10^2 a 10^4 vezes maior que o sirolimo, mostrando que o everolimo como o tacrolimo é menos potente que o sirolimo para inibir a proliferação e migração das células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana.[71,72]

Com relação ao estresse oxidativo, nos diferentes grupos celulares em monocultura tratados com *stents* farmacológicos, houve diminuição na produção de TBARS no período de 24 horas. Nos grupos celulares em cocultura, com a adição do soro rico em plaquetas à 10%, houve aumento na produção das espécies reativas de oxigênio nos grupos que receberam os dois tipos de *stents*, porém essa alteração foi significativa nos grupos com *stents* farmacológicos. Este achado evidencia que as plaquetas potencializam o estresse oxidativo gerado pela presença dos *stents,* possivelmente por ampliar o ambiente inflamatório.

O sirolimo é um antibiótico macrocíclico imunossupressor e atua por parar o ciclo celular no ponto de transição da fase G1 para S. O mecanismo molecular pelo qual o sirolimo age é ligando-se à proteína-12 de ligação à imunofilina FK-506 (FKBP-12), e o complexo resultante sirolimo/FKBP-12 inibe a atividade da quinase do mTOR, subsequentemente reduzindo a atividade de múltiplas quinases associadas com a proliferação celular mitógeno-induzida. Postula-se que essa redução na atividade da quinase é mediada por níveis aumentados do inibidor da quinase dependente de ciclina p27. O efeito resultante do complexo sirolimo/FKBP-12 sobre as vias mTOR associadas seria a parada do ciclo celular no ponto de transição G1/S. A proliferação e migração celular podem compartilhar mecanismos moleculares semelhantes, portanto, agentes que possuem como mecanismo de ação primário o bloqueio da proliferação celular podem também ter impacto na migração celular, que é o processo envolvido na formação neointimal após o implante dos *stents*.[73,74]

Analisando as fases do ciclo celular no nosso estudo, observamos que o efeito mais consi*stent*e causado pelo sirolimo sobre o ciclo celular em ambas as células nos diversos experimentos sem o soro rico em plaquetas à 10%, tanto para o período de 24 como para 48 horas, foi um aumento na porcentagem relativa de células na fase G2/M, sem aumento do número de células na fase de DNA fragmentado, ou seja, sem causar morte celular. Em nosso estudo o sirolimo inibiu tanto as células endoteliais humanas como as células musculares lisas de aorta humana. Quando adicionamos plaquetas nos modelos de cocultura, houve aumento

da porcentagem relativa de células na fase G0/G1 e diminuição da porcentagem relativa de células na fase G2/M, sem aumento do número de células na fase de DNA fragmentado, ou seja, sem causar morte celular, causando a parada do ciclo celular numa fase mais precoce.

Para compreender os mecanismos antiproliferativos do sirolimo nas duas linhagens celulares do presente estudo ao nível do ciclo celular, examinamos a expressão de marcadores celulares envolvidos nas vias de apoptose e controle de proliferação celular estudando o perfil de expressão dos marcadores caspase-3, PCNA, p-27 e ciclina D1 para as vias de necrose e da análise da expressão de marcadores celulares envolvidos no processo inflamatório ICAM-1, IL-1 beta, TNF-DR4, IL-6 e MCP-1 e do marcador VEGF-R1 envolvido na angiogênese.

Não houve diferença na taxa de expressão dos marcadores celulares e seus receptores envolvidos nas vias de apoptose e controle de proliferação celular nas diferentes condições de cultura, evidenciando que o sirolimo não induziu apoptose ou necrose nas células endoteliais humanas e nas células musculares lisas de aorta humana caracterizando ausência de efeito citotóxico nas concentrações do fármaco utilizada nesse estudo.

Examinamos também a expressão de marcadores celulares envolvidos nas vias do processo inflamatório ICAM-1, IL-1 beta, TNF-DR4, IL-6 e MCP-1 e do marcador VEGF-R1 envolvido na angiogênese. Não houve diferença na expressão dos marcadores celulares envolvidos no processo inflamatório MCP-1, IL-1 beta e VEGF-R1 entre os diferentes grupos nos períodos de tempo analisados. Por outro lado, houve maior expressão do marcador ICAM-1, TNF-DR4 nos grupos em cocultura na ausência do soro rico em plaquetas à 10% nos dois períodos de tempo avaliados, evidenciando que o fenômeno do aumento da expressão e modulação do ICAM-1 está relacionado com a presença das plaquetas ao meio de cultura do que com tipo de *stent* utilizado. Com relação ao marcador celular envolvido no processo inflamatório IL-6 a sua maior expressão relacionou-se, na maioria das condições testadas, quando submetidos às análises estatísticas comparativas intergrupos, houve maior expressão deste marcador nas condições de cocultura que receberam soro rico em plaquetas à 10% para ambos os *stents*, estando sua maior expressão da mesma maneira que o ICAM-1 relacionada com a presença das plaquetas que ao tipo de *stent* recebido.

Parry *et al.*,[72] demonstraram que o sirolimo em potência de concentrações baixas em escala nanomolar, ocasionou parada do ciclo celular na fase G0/G1, efeito dependente da

dose e sem induzir morte celular. Tais autores ainda demonstraram que o efeito foi reversível pois com a retida da droga da cultura lavando as células, as mesmas reassumiram sua proliferação vários dias após. Eles demonstraram também que o sirolimo não teve efeito antimigratório nas células endoteliais, apenas nas células musculares lisas. Considerando que a migração de células musculares lisas é um fator na formação da neoíntima após lesão vascular e que a repopulação da íntima lesada com células endoteliais funcionais é necessária para reduzir a propensão de formação de trombo na região revascularizada e com *stent* da artéria coronária. A migração de células endoteliais é fundamental para o restabelecimento de um endotélio funcional após implante de *stent* coronariano.[75] A atividade antimigratória do sirolimo em células musculares lisas no estudo de Parry *et al.* foi menor do que a relatada em outros estudos,[76,77] onde a incubação de células musculares lisas com sirolimo mais prolongada foi usada (22. vs 48 h).

Nossos achados com relação à expressão do p27 estão diferentes da literatura, pois vários autores descrevem que a inibição da proliferação de células musculares lisas pelo sirolimo é associada com a regulação positiva do inibidor do ciclo celular p27, com descrição do mecanismo de ação do sirolimo que atua após entrar na célula através da ligação com o FKBP-12 o complexo resultante sirolimo/FKBP-12 inibe a atividade da quinase do mTOR, subsequentemente reduzindo a atividade de múltiplas quinases associadas com a proliferação celular e essa redução na atividade da quinase é mediada por níveis aumentados do inibidor da quinase dependente de ciclina p27. [78,79]

Kawamata *et al.*,[80] examinaram os eventos intracelulares após o tratamento com sirolimo em células T em crescimento exponencial e descreveram que o sirolimo regulou positivamente um inibidor de cdks, o p27, em ambos os níveis de RNAm e proteína em células sensíveis ao sirolimo, evidenciando que o efeito antiproliferativo do sirolimo foi principalmente atribuído à inibição da atividade da ciclina E/cdk2 quinase através da formação do complexo ciclina E/cdk2-p27 em vez da inibição da atividade da p70S6 quinase, que era o mecanismo proposto até então. Sugeriram a presença de um nível limiar putativo de p27 na fase tardia G1 em células já cicladas, concluindo que o sirolimo pode causar parada de G1 aumentando a quantidade de p27 além do limite em algumas células sensíveis ao sirolimo que estão crescendo exponencialmente.

Uma possível explicação para não ter ocorrido aumento do p27 no nosso estudo, é que parece que o aumento do p27 está relacionado com a parada do ciclo celular na fase G1, e no nosso estudo, a parada do ciclo celular na maioria dos experimentos ocorreu na fase G2/M, também diferentemente do relatado na literatura. Além disso, em nosso estudo, as concentrações utilizadas maiores que as descritas na literatura. Postulamos, que essa diferença pode ser atribuída à concentração do sirolimo utilizada em nosso estudo. Utilizamos no presente experimento na monocultura, concentrações de sirolimo de 98,91 µg a 326,56 µg, na cocultura sem PRP à 10% a concentração de sirolimo foi 63,27 µg e na cocultura com PRP à 10% a concentração de sirolimo foi 38,85 µg, todas constituem valores bem elevados do fármaco. Habib *et al.* descreveram que o sirolimo atinge concentração tissular de 500 nmol/L após implante de *stents* eluidores de sirolimo. Convertendo esse valor através da massa molar do sirolimo (914,172 g/mol) para µg por litro temos um valor de 457 µg/L ou 0,457 µg/mL, ou seja, os valores adicionados foram bem mais elevados que a concentração tissular do sirolimo eluido pelos *stents* farmacológicos. Ainda com relação à concentração do sirolimo, Marx *et al.*[78] descrevem que concentrações tão baixas de sirolimo quanto 1 ng/ml tem a capacidade de inibir o crescimento celular. Esse valor corresponde à 0,001 µg/mL, bem menor do que o utilizado no nosso estudo. Porém esse mesmo grupo descreveu ausência de inibição da proliferação de células musculares lisas após o FK520, uma droga da mesma família do tacrolimo, e em outro estudo relataram a falta de ações antimigratórias sobre células musculares lisas pelo próprio tacrolimo.[76] Já no estudo de Matter *et al.*,[71] os autores descrevem que se concentrações equipotentes para inibir a proliferação de células musculares lisas forem usadas, o tacrolimo pode exibir uma especificidade melhorada para as células musculares lisas e, assim, permitir uma melhor reendotelização. Eles também investigaram os efeitos do tacrolimo ou do sirolimo no ciclo celular e encontraram uma sobrerregulação de p27 após exposição de células musculares lisas estimulada por PDGF tanto ao tacrolimo como sirolimo. A expressão de p27 foi menos pronunciada após o tacrolimo do que após o sirolimo. Outros potenciais alvos do ciclo celular do tacrolimo, como p16 e p21, não foram afetados pela droga em seu estudo.

Porém quando adicionamos plaquetas às culturas, houve parada do ciclo celular na fase G0/G1, em concordância com a literatura. A liberação de PGDF pelas plaquetas no meio de cultura pode ter estimulado a migração das células musculares lisas e esse fator pode ter influenciado a fase do ciclo celular inibida pelo siromilus. Outra possível justificativa para esse

achado é que os grupos do experimento em cocultura com PRP à 10% receberam a menor concentração de sirolimo quando comparada a todos os outros grupos do presente estudo. Efeito similar é descrito na literatura para o paclitaxel, porém por mecanismos de ação diferentes. O principal mecanismo de ação do paclitaxel é interferir com a dinâmica dos microtúbulos, impedindo sua despolimerização, o que causa uma atividade multicelular dose dependente, com propriedades antiproliferativas e antineoplásicas, reduzindo a migração das células musculares lisas, bloqueando a citocina e a atividade e liberação do fator de crescimento, interferindo com processos secretórios, efeitos antiangiogênicos e enfraquecendo o sinal da transdução. Em baixas doses como as utilizadas nos DES, o paclitaxel atua nas fases G0/G1 e G1/S, resultando em efeito citostático sem a morte celular. Em altas concentrações, o paclitaxel promove a bloqueio do ciclo celular na fase G2/M e consequentemente a apoptose.

Nosso estudo é o primeiro da literatura que cultivou as células endoteliais humanas e as células musculares lisas de aorta humana em modelo de cocultura com acréscimo de plaquetas a esses modelos. Também não encontramos na literatura outro estudo que adicionou o *stent* farmacológico diretamente no poço de cultura e o comparou com sua contraparte o *stent* convencional. Os trabalhos descritos na literatura geralmente adicionam o fármaco na cultura e o comparam com os controles sem a droga. Portanto, as discrepâncias dos achados em nosso experimento com os da literatura e dos achados da literatura entre si podem ser resultado de diferentes protocolos experimentais, diferentes tipos de células, testando diferentes fármacos (sirolimo, FK520, tacrolimo/FK506) ou avaliando os efeitos dos fármacos em concentrações diversas.

6 Conclusão

Com a determinação da IC_{50} do everolimo, análogo do sirolimo, nas células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana, demonstramos a citotoxicidade do everolimo com valores maiores para as células musculares lisas de aorta humana, evidenciando a menor sensibilidade dessas células quando comparadas com as células endoteliais. A IC_{50} do derivado everolimo foi de 10^2 a 10^4 vezes maior que o a descrita na literatura para o sirolimo, mostrando que o everolimo é menos potente que o sirolimo para inibir a proliferação e migração das células endoteliais humanas e células musculares lisas de aorta humana.

Com relação ao estresse oxidativo, nos grupos celulares em monocultura tratados com *stents* farmacológicos, houve diminuição na produção de TBARS no período de 24 horas. Nos grupos em cocultura, com a adição do soro rico em plaquetas à 10% nos modelos, houve um aumento na produção das espécies reativas de oxigênio nos grupos que receberam os dois tipos de *stents*, porém essa alteração foi mais significativa nos grupos com *stents* farmacológicos. Este achado evidencia que as plaquetas potencializam o estresse oxidativo gerado pela presença dos *stents* possivelmente por ampliar o ambiente inflamatório.

Analisando as fases do ciclo celular, observamos que o efeito mais consi*stent*e causado pelo sirolimo sobre o ciclo celular em ambas as células nos diversos experimentos sem o soro rico em plaquetas à 10%, tanto para o período de 24 como para 48 horas, foi um aumento na porcentagem relativa de células na fase G2/M, sem aumento do número de células na fase de DNA fragmentado, ou seja, sem causar dano celular. Em nosso estudo o sirolimo inibiu tanto as células endoteliais humanas como as células musculares lisas de aorta humana, em todas as concentrações testadas. Quando adicionamos plaquetas nos modelos de cocultura, houve aumento da porcentagem relativa de células na fase G0/G1 e diminuição da porcentagem relativa de células na fase G2/M, sem aumento do número de células na fase de DNA fragmentado, ou seja, sem causar morte celular, sugerindo que o sirolimo exerce seus efeitos anti-inflamatórios nessas linhagens celulares e consequentemente reduz a hiperplasia neointimal através de um mecanismo citostático.

Não houve diferença na expressão dos marcadores celulares caspase-3, PCNA, p-27 e ciclina D envolvidos nas vias de apoptose e controle de proliferação celular nas diferentes condições de cultura, evidenciando que o sirolimo não induziu apoptose ou necrose nas células endoteliais humanas e nas células musculares lisas de aorta humana caracterizando ausência de efeito citotóxico nas concentrações do fármaco utilizada.

Não houve diferença na expressão de marcadores celulares envolvidos nas vias do processo inflamatório ICAM-1, IL-1 beta, MCP-1 e VEGF-R1. Por outro lado, houve diferença na expressão dos marcadores celulares ICAM-1, TNF-DR4 e IL-6 nos grupos em cocultura com soro rico em plaquetas à 10% nos períodos de tempo avaliados, para ambos os *stents*, estando sua maior expressão relacionada com a presença das plaquetas que ao tipo de *stent* recebido.

7 Referências Bibliográficas

1. Gaziano TA, Prabhakaran D, Gaziano JM. Global Burden of Cardiovascular Disease. In: Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Mann DL, Tomaselli GF, editors. *Braunwald's Heart Disease E-Book: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 11th ed. Philadelphia: Elsevier; 2018. ISBN 978-0-323-46342-3. Disponível em: <http://www.amazon.com.br>. Acesso em: 10/03/2018.

2. Doenças Cardiovasculares nos Últimos Cinco Anos no Brasil. *Arq Bras Cardiol*. 2017 Jul; 109(1):39-46.

3. Duncan BB, Stevens A, Schmidt MI. Mortalidade por doenças crônicas no Brasil: situação em 2010. In: *Ministério da Saúde. Saúde Brasil 2011: uma análise da situação de saúde e a vigilância da saúde da mulher*. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise de Situação de Saúde; 2012. p. 93-104. ISBN 978-85-334-1962. Disponível em:<http://www.saude.gov.br/ editora>. Acesso em: 16/04/2018.

4. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (IBGE). *Mapa da população. IBGE.* [Online] [Cited in 2016 abr 10]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 13/04/2018.

5. Duncan BB, Stevens A, Iser BPM, Malta DC, Azevedo e Silva G, Schmidt MI. Mortalidade por doenças crônicas no Brasil: situação em 2009 e tendência de 1991 a 2009. In: *Ministério da Saúde. Saúde Brasil 2010: uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde*. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde.2010.

6. Writing Group M, Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* 2016;133(4):e38-360.

7. Garg S, Serruys PW. Coronary *stents*: current status. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(10 Suppl):S1-42.

8. Guimaraes JI, Sousa JE, Ribeiro E, Mattos LA, Sousa AG, Nunes GL, *et al.* [Guidelines for the indications and use of percutaneous interventions and intracoronary *stent* in clinical practice]. *Arq Bras Cardiol.* 2003;80 Suppl 1:1- 14.

9. Guérios EE, Bueno RRL, Andrade PMP, Nercolini DC, Pacheco ALA. *Stents*. Uma Revisão da Literatura. *Arq Bras Cardiol.* 1998;71:77-87.

10. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, *et al.*, for the Benestent Study Group. A comparison of balloon-expandable-*stent* implanta- tion with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 1994;331:489–495.

11. Fischman DL, Leon MB, Baim DS, *et al.*, for the *Stent* Restenosis Study Investigators. A randomized comparison of coronary-*stent* placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. *N Engl J Med*. 1994;331:496–501.

12. Moliterno DJ. Healing Achilles—sirolimus versus paclitaxel. *N Engl J Med.* 2005;353:724–727.

13. Barragan P, Sainsous J, Silvestri M, *et al.* Ticlopidine and subcuta- neous heparin as an alternative regimen following coronary *stent*ing. *Catheter Cardiovasc Diagn*. 1994;32:133–38.

14. Schomig A, Neumann FJ, Kastrati A, *et al.* A randomized compar- ison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery *stents*. *N Engl J Med*. 1996;334:1084–1089.

15. Cutlip DE, Leon MB, Ho KK, *et al.* Acute and nine-month clinical outcomes after "suboptimal" coronary *stent*ing: results from the *Stent* Anti-thrombotic Regimen Study (STARS) registry. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:698–706.

16. Colombo A, Hall P, Nakamura S, *et al.* Intracoronary *stent*ing without anticoagulation accomplished with intravascular ultrasound guidance. *Circulation*. 1995;91:1676 – 1688.

17. Serruys PW, Kutryk MJ, Ong AT. Coronary-artery *stents*. *N Engl J Med.* 2006;354:483–495.

18. Karas SP, Gravanis MB, Santoian EC, Robinson KA, Anderberg KA, King SB III. Coronary intimal proliferation after balloon injury and *stent*ing in swine: an animal model of restenosis. *J Am Coll Cardiol*. 1992;20:467–474.

19. Gordon PC, Gibson CM, Cohen DJ, Carrozza JP, Kuntz RE, Baim DS. Mechanisms of restenosis and redilation within coronary *stents*—quantitative angiographic assessment. *J Am Coll Cardiol.* 1993;21:1166 –1174.

20. Hoffmann R, Mintz GS, Dussaillant GR, *et al.* Patterns and mechanisms of in-*stent* restenosis. A serial intravascular ultrasound study. *Circulation*. 1996;94:1247–1254.

21. Byrne RA, Iijima R, Mehilli J, Pinieck S, Bruskina O, Schömig A, *et al.* Durability of antirestenotic efficacy in drug-eluting *stents* with and without permanent polymer. *JACC Cardiovasc Interv*. 2009;2:291-299.

22. Cook S, Ladich E, Nakazawa G, Eshtehardi P, Neidhart M, Vogel R *et al.* Correlation of intravascular ultrasound findings with histopathological analysis of thrombus aspirates in patients with very late drug-eluting *stent* thrombosis. *Circulation.* 2009;120: 391-399.

23. Marchini JF, Esteves V, Lemos PA. Reparação Endotelial Pós-intervenções Percutâneas. In: Luz PL, Libby P, Chagas ACP, Laurindo FRM, editores. *Endotélio e Doenças Cardiovasculares: biologia vascular e síndromes clínicas*. 1a ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2016. p. 623-628.

24. Costa MA, Simon DI. Molecular basis of restenosis and drug-eluting *stents*. *Circulation.* 2005: 111(17):2257-73.

25. Costa Jr. JR, Chamie D, Souza JE, Abizaid A. *Stents* e Endotélio. In: Luz PL, Libby P, Chagas ACP, Laurindo FRM, editores. *Endotélio e Doenças Cardiovasculares: biologia vascular e síndromes clínicas*. 1a ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2016. p. 629-640.

26. Pakala R, Benedict c. Synergy between trombin and serotonin in inducing vascular smooth muscle cell proliferation. *J Lab Clin Med.* 1999; 134:659-667.

27. Finn AV, Nakazawa G, Joner M, Kolodgie FD, Mont EK, Gold HK, Virmani R. Vascular responses to drug eluting *stents*: importance of delayed healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(7):1500-1510.

28. Welt FG, Rogers C. Inflammation and restenosis in the *stent* era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(11):1769-1776.

29. Kirtane AJ, Stone GW. In: Moscucci M, editor. *Grossman & Baim's Cardiac Catheterization, Angiography and Intervention.* 8 th ed. Florida: Lippincott Williams & Wilkins. 2013. p. 710-759.

30. Bourantas CV, Garcia-Garcia HM, Farooq V, Maehara A, Xu K, Généreux P, *et al.* Clinical and Angiographic Characteristics of Patients Likely to Have Vulnerable Plaques. *JACC: Cardiovascular Imaging*. 2013;6(12):1263-1272.

31. Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Wong C, *et al.* Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation.* 1996 Jul 1;94(1):35-43.

32. Grines CL, Schreiber TL. Neoatherosclerosis Detection and Clinical Consequences. *JACC: Cardiovasc Interventions*. 2015;8(6):822-823.

33. Borovac JA, D'Amario D, Niccoli G. Neoatherosclerosis and Late Thrombosis After Percutaneous Coronary Intervention: Translational Cardiology and Comparative Medicine from Bench to Bedside. *Yale J Biol Med.* 2017; 90(3): 463–470.

34. Nakazawa G, Vorpahl M, Finn AV, Narula J, Virmani R. One step forward and two steps back with drug-eluting-*stents*: from preventing restenosis to causing late thrombosis and nouveau atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2009; 2(5): 625-628.

35. Van Werkum JW, Heestermans AA, de Korte FI, Kelder JC, Suttorp MJ, Rensing BJ, *et al.* Long-term clinical outcome after a first angiographically confirmed coronary *stent* thrombosis: an analysis of 431 cases. *Circulation.* 2009; 119(6): 828-834.

36. Räber L, Magro M, Stefanini GG, Kalesan B, van Domburg RT, Onuma Y, *et al.* Very late coronary *stent* thrombosis of a newer-generation everolimus-eluting *stent* compared with early-generation drug-eluting *stents*: a prospective cohort study. *Circulation.* 2012;125(9):1110-1121.

37. Cutlip DE, Baim DS, Ho KK, Popma JJ, Lansky AJ, Cohen DJ, *et al. Stent* thrombosis in the modern era: a pooled analysis of multicenter coronary *stent* clinical trials. *Circulation.* 2001;103(15):1967-1971.

38. Aoki J, Lansky AJ, Mehran R, Moses J, Bertrand ME, McLaurin BT, *et al.* Early *stent* thrombosis in patients with acute coronary syndromes treated with drug-eluting and bare metal *stents*: the Acute Catheterization and Urgent Intervention Triage Strategy trial. *Circulation.* 2009;119(5):687-698.

39. Tada T, Byrne RA, Simunovic I, King LA, Cassese S, Joner M, *et al.* Risk of *Stent* Thrombosis Among Bare-Metal *Stents*, First-Generation Drug-Eluting *Stents*, and Second-Generation Drug-Eluting *Stents*. *JACC: Cardiovasc Interv*. 2013;6(12): 1267-1274.

40. McGeachie M, Ramoni RL, Mychaleckyj JC, Furie KL, Dreyfuss JM, Liu, Y *et al.* An Integrative Predictive Model of Coronary Artery Calcification in Arteriosclerosis. *Circulation*. 2009;120(24):2448–2454.

41. Dowling RJ, Topisirovic I, Fonseca BD, Sonenberg N. Dissecting the role of mTOR: Lessons from mTOR inhibitors. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804:433-439.

42. Luz PL, Dourado PMM, Chagas ACP, Laurindo FRML. Endotélio na Aterosclerose: Formação da Placa e Complicações. In: Luz PL, Libby P, Chagas ACP, Laurindo FRM, editores. *Endotélio e Doenças Cardiovasculares: biologia vascular e síndromes clínicas*. 1a ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2016. p. 517-536.

43. Barlow AD, Nicholson ML, Herbert TP. Evidence for Rapamycin Toxicity in Pancreatic b-Cells and a Review of the Underlying Molecular Mechanisms. *Diabetes*. 2013;62:2674-2682.

44. Wight TN, Merrilees MJ. Proteinoglycans in atherosclerosis and reestenosis: key roles for versican. *Circ Res.* 2004;94(9):1158-1167

45. Pal SK, Quinn DI. Differentiating mTOR inhibitors in renal cell carcinoma. *Cancer Treat Rev*. 2013;39:709-719.

46. Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem*. 2009;284: 12297-12305.

47. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, *et al.* Nutrient dependent mTORC1 association with the ULK1–Atg13–FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*. 2009;20:1981-1991.

48. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, *et al.* ULK–Atg13–FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell.* 2009;20: 1992-2003.

49. Oubrahim H, Wong A, Wilson BA, Chock PB. Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Plays a Role in Pasteurella multocida Toxin (PMT)-induced Protein Synthesis and Proliferation in Swiss 3T3 Cells. *J Biol Chem*. 2013;288:2805-2815.

50. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo).* 1975; 28: 721-726.

51. Sehgal SN, Baker H, Vézina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo).* 1975;28(10):727-732.

52. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, *et al.* A mammalian protein targeted by G1 arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*. 1994;369:756 -758.

53. Marx SO, Jayaraman T, Go LO, Marks AR. Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Cir Res.* 1995;76(3):412-417.

54. Costa PA, Santos P. *Platelet-rich plasma: a review of its therapeutic use. RBAC*. 2016;48(4):311-319.

55. Borzini P, Mazzucco I. Platelet-rich plasma (PRP) and platelet derivatives for topical therapy. What is true from the biologic view point? *ISBT Science Series*. 2007 Jul;2(1):272–281.

56. Carlson ER. Bone grafting the jaws in the 21st century: the use of platelet-rich bone morphogenetic protein. *Alpha Omegan*. 2000 Ago- Set;93(3):26-30.

57. Van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol*. 2011;731:237-245

58. Lima ES, *Abdalla* DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev Bras Cienc Farm*. *2001*;37(3):293-303.

59. Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med*.1976;15(2):212-216.

60. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95(2):351-358.

61. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996 Jul 15;239(1):70-76.

62. ROITT, I. *et al. Imunologia*. São Paulo: Manole, 1999. 424p.

63. Nabel EG. Princípios de Biologia Molecular e Genética Cardiovascular. In: Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Mann DL, editores. *Braunwald Tratado de Doenças Cardiovasculares*. 8th ed. Midão AM, et al, tradutores. Philadelphia: Elsevier; 2010. p. 67-100. 1 vol.

64. Libby P. Biologia Vascular da Aterosclerose. In: Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Mann DL, editores. *Braunwald Tratado de Doenças Cardiovasculares*. 8th ed. Midão AM, et al, tradutores. Philadelphia: Elsevier; 2010. p. 985-1002. 1 vol.

65. Luz PL, Dourado PMM, Chagas ACP, Laurindo FRML. Endotélio na Aterosclerose: Formação da Placa e Complicações. In: Luz PL, Libby P, Chagas ACP, Laurindo FRM, editores. *Endotélio e Doenças Cardiovasculares: biologia vascular e síndromes clínicas*. 1a ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2016. p. 517-536.

66. Banner DW, D'Arcy A, Janes W, *et al.* Estrutura cristalina do complexo solúvel de 55 kd de TNF humano-receptor TNF humano: implicações para a ativação do receptor de TNF. *Célula*. 1993;73(3): 431-45.

67. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, *et al.* Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev*. 1992;13:18–32.

68. Boocock CA, Charnock-Jones DS, Sharkey AM. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:506–516.

69. Itakura J, Ishiwata T, Shen B, *et al.* Concomitant over-expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2000;85:27–34.

70. Hsieh CC, Hernández-Ledesma B, Lumen BO. Cell proliferation inhibitory and apoptosis-inducing properties of anacardic acid and lunasin in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Food Chemistry*. 2011;125:630-636.

71. Matter CM, Rozenberg I, Jaschko A, Greutert H, Kurz DJ, Wnendt S, *et al.* Effects of tacrolimus or sirolimus on proliferation of vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;48(6):286-292.

72. Parry TJ, Brosius R, Thyagarajan R, Carter D, Argentieri D, Falotico R, *et al.* Drug-eluting *stents*: sirolimus and paclitaxel differentially affect cultured cells and injured arteries. *Eur J Pharmacol.* 2005;524(1-3):19-29.

73. Luo Y, Marx SO, Kiyokawa H, Koff A, Massagué J, Marks AR. Rapamycin resistance tied to defective regulation of p27Kip1. *Mol Cell Biol.* 1996;16(12):6744-6751.

74. Dumont FJ, Su Q. Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin. *Life Sci.* 1996;58(5):373-95.

75. Casscells W. Migration of smooth muscle and endothelial cells: critical events in restenosis. Circulation. 1992; 86, 723–729.

76. Poon M, Marx SO, Gallo R, Badimon JJ, Taubman MB, Marks AR. Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. *J. Clin. Invest.* 1996;98, 2277–2283.

77. Sun J, Marx SO, Chen H-J, Poon M, Marks AR, Rabbani LE. Role for $p27^{Kip1}$ in vascular smooth muscle cell migration. *Circulation.* 2001; 103, 2967–2972.

78. Marx SO, Jayaraman T, Go LO, Marks AR. Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 1995;76, 412–417.

79. Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, Coats S, Polyak K, Lee MH, *et al.* Interleukin-2-mediated elimination of the $p27^{Kip1}$ cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature.* 1994; 372, 570–573.

80. Kawamata S, Sakaida H, Hori T, Maeda M, Uchiyama T. The upregulation of p27Kip1 by rapamycin results in G1 arrest in exponentially growing T-cell lines. *Blood.* 1998;91(2):561-9.