

GEISA MARIA XAUD PEIXOTO FORTUNA

**PARTICIPAÇÃO DA METALOPROTEINASE 9 DA MATRIZ
EXTRACELULAR NAS ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS
APÓS EMBOLIA PULMONAR AGUDA**

CAMPINAS

Unicamp

2007

GEISA MARIA XAUD PEIXOTO FORTUNA

**PARTICIPAÇÃO DA METALOPROTEINASE 9 DA MATRIZ
EXTRACELULAR NAS ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS
APÓS EMBOLIA PULMONAR AGUDA**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Farmacologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ EDUARDO TANUS DOS SANTOS

CAMPINAS

Unicamp

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

F779p Fortuna, Geisa Maria Xaud Peixoto
Participação da metaloproteinase 9 da matrix extracelular nas
alterações hemodinâmicas após embolia pulmonar aguda / Geisa
Maria Xaud Peixoto Fortuna. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : José Eduardo Tanus dos Santos
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doxíciclina. 2. Metaloproteinase. 3. Embolia Pulmonar. 4.
Hipertensão Pulmonar. I. Santos, José Eduardo Tanus dos. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

**Título em inglês : A role for matrix metalloproteinase-9 in the hemodynamic
changes following acute pulmonary embolism**

Keywords: • Doxycyclin
• Matrix metalloproteinases
• Pulmonary embolism
• Pulmonary Hypertension

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Profa. Dra. José Eduardo Tanus dos Santos
Profa. Dra. Desanka Dragosavac
Prof Dr Alfredo José Rodrigues

Data da defesa: 06 - 07 - 2007



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Membros:

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Prof. Dr. Alfredo José Rodrigues

Profa. Dra. Desanka Dragosavac

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 06/07/2007

DEDICATÓRIA

Dedico à minha filha, meu marido, meus pais e, especialmente, aos meus irmãos Nin e Nando porque sempre me instigaram a estudar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, ao professor Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, à minha filha Gabriela, meu marido Rik, minha família, aos professores Dr. Heitor Moreno Júnior e Dr. Edson, ao Wanderlei, ao meu colega Carlos e a todos os colegas do laboratório que, direta ou indiretamente, participaram de todo este processo, o meu sincero agradecimento.

	PÁG.
RESUMO	<i>ix</i>
ABSTRACT	<i>xi</i>
1- INTRODUÇÃO	13
1.1- Fisiopatologia da circulação pulmonar	14
1.2- Fisiopatologia da hipertensão pulmonar durante EPA	16
1.3- O papel das metaloproteinases	19
2- OBJETIVOS	21
3- ARTIGO	23
4- DISCUSSÃO	30
5- CONCLUSÃO	37
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAS	ácido acetil salicílico
BNP	brain natriuretic peptide
CGRP	calcitonin gene-related peptide
CML	célula muscular lisa
COX	enzima cicloxigenase
CTT	peptídeo permeável aos tecidos
DC	débito cardíaco
ECEs	enzimas conversoras da endotelina
EP	embolia pulmonar
EPA	embolia pulmonar aguda
ET-1	endotelina-1
FC	frequência cardíaca
HAP	hipertensão arterial pulmonar
HP	hipertensão pulmonar
5 HT	5 hidroxitriptamina
KC/GRO	keratocyte-derived chemokine
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MEC	matriz extracelular
MMPs	metaloproteinases
NANC	não adrenérgico, não colinérgico
NO	óxido nítrico
PAF	fator de ativação das plaquetas

PAM	pressão arterial média
PAP	pressão arterial pulmonar
PG	prostaglandinas
PGI 2	prostaciclina
PCWP	pressão pulmonar de cunha
PMAP	pressão média da artéria pulmonar
RVP	resistência vascular pulmonar
TIMP-2	inibidor tecidual da metaloproteinase tipo 2
TxA2	tromboxano A2
VE	ventrículo esquerdo
VD	ventrículo direito

RESUMO

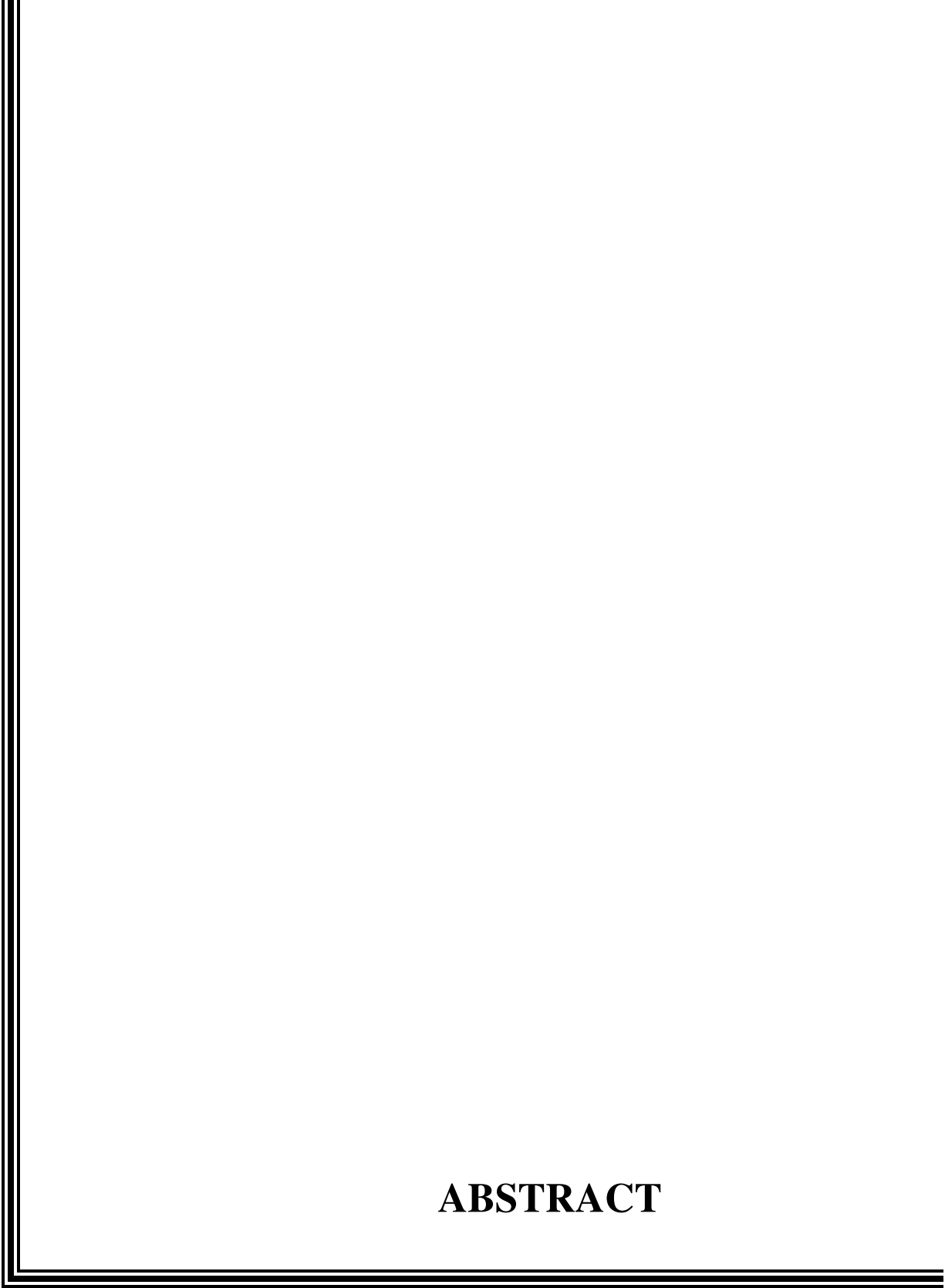
Metaloproteinases modulam a contratilidade vascular e podem afetar a hipertensão pulmonar que ocorre na embolia pulmonar induzida (EPA). Nós examinamos os efeitos da administração de doxiciclina (um inibidor das metaloproteinases) em cães anestesiados e submetidos à EPA.

Métodos: 5 cães no grupo sham receberam somente salina. EPA foi induzida por injeção intravenosa de microesferas em quantidade suficiente para aumentar a pressão média arterial pulmonar (PMAP) em 20 mmHg e cães do grupo embolia receberam salina (grupo embolia, N=8) ou doxiciclina (10 mg/Kg, i.v.) 5 ou 30 minutos após EPA (grupos embolia + doxi 5 e embolia + doxi 30, N=9 e 8, respectivamente). Avaliação hemodinâmica foi feita no momento basal e de 5 a 120 minutos após EPA. Zimografia da MMP-2 e da MMP-9 foi feita nas amostras de plasma.

Resultado: nenhuma mudança hemodinâmica foi observada no grupo sham. Embolização aumentou a PMAP em 218 $\pm$ 16% e índice de resistência vascular pulmonar (IRVP) em 289 $\pm$ 42% no grupo embolia (ambos $p<0,05$). Doxiciclina aumentou o índice cardíaco (IC) em 24 $\pm$ 5% e reduziu o IRVP em 23 $\pm$ 4% 120 minutos após EPA no grupo embolia+doxi 30. Em acréscimo, doxi reduziu PMAP e IRVP 30 minutos após EPA com efeito máximo após 120 (25 $\pm$ 4% de redução na PMAP e 33 $\pm$ 6% de redução no IRVP, ambos $<0,05$) no grupo embolia+doxi 5. Os níveis plasmáticos de pró-MMP-9 e MMP-9 elevaram-se somente no grupo embolia e MMP-2 permaneceu inalterada.

Conclusão: nosso estudo mostra que doxiciclina atenua a hipertensão pulmonar na EPA induzida e indica que, MMP-9 tem um papel na hipertensão pulmonar da EPA induzida. MMP-9 pode ser um alvo farmacológico na EPA.

Palavras-chaves: Doxiciclina, Metaloproteinases, Embolia Pulmonar, Hipertensão Pulmonar.



ABSTRACT

Matrix metalloproteinases (MMPs) modulate vascular contractility and may affect acute pulmonary embolism (APE)-induced pulmonary hypertension. We examined the effects of the administration of doxycycline (a MMP inhibitor) following APE in anesthetized dogs.

Methods: Sham operated dogs (N=5) received only saline. APE was induced by intravenous injections of microspheres in amounts to increase mean pulmonary artery pressure (MPAP) by 20 mmHg, and embolized dogs received saline (Emb group, N=8), or doxycycline (10 mg/kg, i.v.) 5 or 30 min of APE (Emb + Doxy 5 and Emb + Doxy 30 groups, N=9 and 8, respectively). Hemodynamic evaluation was performed at baseline and 5-120 after APE. Gelatin zymography of MMP-2 and MMP-9 from plasma samples was performed.

Results: No significant hemodynamic changes were found in Sham animals. Embolization increased MPAP by $218 \pm 16\%$ and the pulmonary vascular resistance index (PVRI) by $289 \pm 42\%$ in Emb group (both $P < 0.05$). Doxycycline increased the cardiac index by $24 \pm 5\%$ and reduced PVRI by $23 \pm 4\%$ 120 min of APE in Doxy 30 + Emb group. In addition, doxycycline reduced MPAP and PVRI 30 min after APE with maximum effects seen 120 min after APE ($25 \pm 4\%$ decrease in MPAP and $33 \pm 6\%$ decrease in PVRI; both $P < 0.05$) in Doxy + 5 group. Plasma pro-MMP-9 and MMP-9 levels increased only in Emb group and MMP-2 remained unaltered.

Conclusions: Our study shows that doxycycline attenuates APE-induced pulmonary hypertension, and indicates that MMP-9 has a role in APE-induced pulmonary hypertension. MMP-9 may be a pharmacological target in APE.

Keywords: Doxycyclin, Matrix metalloproteinases, Pulmonary Embolism, Pulmonary Hypertension.

1- INTRODUÇÃO

A embolia pulmonar é uma condição clínica de alta prevalência e elevada taxa de mortalidade. Estima-se que nos EUA 600.000 pacientes anualmente sejam acometidos por embolia pulmonar (EP) e 50.000 a 200.000 evoluem para o óbito (Smulders 2000). Isto faz com que a embolia pulmonar seja a terceira causa de morte entre os americanos (Sadosty, Boie et al. 2003); (Wood 2002). A embolia pulmonar aguda (EPA) pode levar à morte nas primeiras horas após a sua instalação, tendo sido relatada taxa de mortalidade de até trinta por cento em casos de hipotensão arterial. Dois terços dos pacientes pertencentes aos casos fatais morrem na primeira hora de embolia pulmonar aguda (Bailen, Cuadra et al. 2001); (Wood 2002). É patologia de difícil diagnóstico e frequentemente não é reconhecida. Estudos mostram que somente um terço dos pacientes que morreram por EP foram diagnosticados corretamente antes do óbito. A principal fonte de êmbolos para os pulmões são trombos oriundos de veias profundas dos membros inferiores. A causa primária da morte na Embolia Pulmonar(EP), que é causada por trombose venosa profunda, líquido amniótico ou embolia gasosa, é a falência ventricular direita e o choque circulatório (Tanus-Santos and Theodorakis 2002)).

1.1- Fisiopatologia da circulação pulmonar

Entre a circulação pulmonar e a circulação sistêmica existem várias semelhanças e diferenças, que merecem ser ressaltadas para melhor entendimento das alterações existentes na vigência de hipertensão pulmonar na EPA. A estrutura básica dos vasos é a mesma: uma camada íntima, constituída por células endoteliais, separada da camada média pela lâmina basal; uma camada média, composta principalmente por células musculares; uma camada adventícia composta por uma matriz protêica secretada pelos fibroblastos adventiciais. Já as diferenças devem ser ressaltadas, uma vez que serão responsáveis pelo entendimento fisiopatológico da hipertensão pulmonar na embolia pulmonar aguda. Por exemplo, o fato de a circulação pulmonar ser do tipo alto fluxo com baixa pressão, por ser um sistema de alta complacência, alta capacitância e baixa resistência (cerca de 1/10 da circulação sistêmica) (Elliot 1992).

Em condições normais o leito vascular pulmonar pode acomodar grandes volumes sanguíneos com pequenos aumentos em sua pressão arterial, fundamentalmente através do recrutamento de capilares e arteríolas. Por exemplo, durante esforço físico, o aumento de até 50% do fluxo sanguíneo pulmonar não produz grandes aumentos na pressão arterial pulmonar (PAP). Este recrutamento em caso de necessidade se dá graças ao fato de algumas áreas pulmonares ventiladas não serem normalmente perfundidas (áreas ou zonas pulmonares tipo I de West). Além disso, as artérias pulmonares são mais complacentes que as sistêmicas e se distendem mais intensamente quando submetidas a aumentos de pressão arterial (Reeves and Rubin 1998).

Na camada íntima dos vasos pulmonares encontram-se células endoteliais que são capazes de regular o tônus vasomotor e a síntese de substâncias fibrinolíticas, além de regular a permeabilidade vascular (Elliot 1992). O endotélio é responsável pela liberação de diversos compostos vasoativos: alguns vasodilatadores, como o óxido nítrico, as prostaciclina, a adrenomedulina, outros vasoconstrictores, como a endotelina, a angiotensina II e os endoperóxidos. Anormalidades na produção e/ou degradação destes mediadores responsáveis pela regulação do fluxo pulmonar podem resultar em aumento da resistência pulmonar, gerando hipertensão arterial pulmonar (HAP). A pressão pulmonar sistólica normal está entre 18 a 25 mmHg e a pressão média da artéria pulmonar é igual a 12 a 16 mmHg (Elliot 1992); (Wood 2002). A medida do gradiente transpulmonar normal (PMAP menos a pressão no átrio esquerdo ou pressão pulmonar de cunha - pcwp) é de 9 mmHg. Correspondendo a estes valores, temos que a resistência vascular pulmonar (RVP) normal é menor do que $320 \text{ dinas.s.cm}^{-5}$ ou 4 unidades Wood (1 unidade Wood = 80 dinas). Dizemos que há HAP quando a PMAP é superior a 25mmHg em repouso ou 30 mmHg no esforço, ou quando a resistência vascular pulmonar é superior a 320 dinas, ou ainda quando o gradiente transpulmonar é superior a 10-12 mmHg (Wood 2002).

Fluxo sanguíneo pulmonar é igual ao débito cardíaco (DC), e todos os fatores que interferem no DC também controlam o fluxo pulmonar. Quando há um aumento de pressão, os vasos se dilatam e se reduzem quando a pressão diminui. Para uma melhor aeração do sangue o fluxo deve estar direcionado para áreas mais ventiladas dos pulmões. Há um mecanismo regulatório onde ocorre vasoconstrição nos vasos adjacentes a

alvéolos com pressão arterial de oxigênio baixa, isto é, abaixo de 73 mmHg. Com a vasoconstrição há elevação da resistência vascular pulmonar, podendo aumentar até 5 vezes o valor normal. Isto faz com que o fluxo sanguíneo seja redistribuído para áreas melhor ventiladas (Voelkel and Tuder 2000). Esta vasoconstrição pulmonar hipóxica é outra diferença em relação à circulação sistêmica, onde a hipoxemia promove vasodilatação para um melhor aporte de oxigênio à área afetada (Dantzker, Wagner et al. 1978).

1.2- Fisiopatologia da hipertensão pulmonar durante EPA

Vários mecanismos complexos e intrinsecamente ligados estão envolvidos na hipertensão pulmonar (HP) durante EPA. O primeiro deles é a obstrução mecânica ao fluxo através dos êmbolos alojados no leito vascular pulmonar, aumentando a resistência vascular pulmonar e, por sua vez, aumentando a pós-carga do ventrículo direito (VD). Isto pode levar à isquemia e à depressão miocárdica. Há um desvio do septo em direção ao ventrículo esquerdo (VE), reduzindo sua complacência, diminuindo seu enchimento e, como consequência, diminuindo o débito cardíaco (Lualdi and Goldhaber 1995). Há disfunção miocárdica biventricular, provavelmente secundária à acidose, diminuição de pressão de perfusão coronariana e hipoxemia (Sullivan, Watts et al. 2001).

Entre outros fatores, o papel da vasoconstrição pulmonar tem destaque no agravamento da HP durante a EPA, seja ela provocada por liberação de fatores humorais ou ativação neurogênica. A hiperreatividade vascular e a vasoconstrição podem decorrer da perda da integridade do endotélio vascular e, consequentemente, do desequilíbrio das substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras, havendo predomínio de tromboxane A₂ (TxA₂), endotelina e serotonina, em detrimento de prostaciclina e óxido nítrico. Experimentos com animais que foram tratados previamente com antagonistas destes vasoconstritores demonstram nestes menos distúrbios hemodinâmicos que o grupo controle, ambos submetidos à EPA induzida (Smulders 2000).

A vasoconstrição pulmonar é causada por mediadores vasoconstritivos liberados principalmente pelas plaquetas ativadas, sendo a TxA₂ e a serotonina os dois mais importantes vasoconstritores pulmonares neste contexto. Outras fontes de TxA₂

incluem o endotélio vascular e monócitos circulantes, mas são quantitativamente de menor importância do que as plaquetas. Os principais papéis da TxA2 são agregação plaquetária e vasoconstrição, ambos de interesse na hemostasia. O efeito vasoconstritor aplica-se tanto à vasculatura pulmonar quanto à sistêmica. A elevação da TxA2 tem sido correlacionada a um aumento do risco de mortalidade em experimentos animais na EPA induzida. Vários estudos têm mostrado que o aumento de produção de TxA2 tem papel na EPA, especialmente em estágios precoces (primeiros 10 a 30 minutos). TxA2 é um dos produtos finais do metabolismo do ácido araquidônico, mediado pela enzima cicloxigenase (COX). Alguns inibidores da COX têm sido utilizados em estudos animais como, por exemplo, a indometacina, ibuprofeno, meclofenato ou ácido acetil salicílico (AAS). Estes estudos mostraram a atenuação das alterações hemodinâmicas provocadas pela EPA nos animais pré-tratados em relação ao grupo controle. Há diminuição da pressão arterial pulmonar (PAP) e da resistência vascular pulmonar (RVP) nos grupos tratados. Na clínica o ibuprofeno tem sido usado com sucesso para diminuir a PAP em pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo (Smulders 2000).

A serotonina é o mais potente vasoconstritor pulmonar conhecido. É produzida pelas células enterocromafins gastrointestinais, neurônios serotoninérgicos, células neuroendócrinas pulmonares e por plaquetas ativadas (Liras, Catalan et al. 2000). Na circulação sistêmica, ao contrário, a serotonina (5-Hidroxitriptamina - 5HT) causa vasodilatação e apresenta propriedade inotrópica positiva (Egermayer, Town et al. 1999).

A endotelina é produzida pelo endotélio vascular e causa intensa e sustentada vasoconstrição pulmonar. Há vários subtipos como a endotelina 1 (ET-1), conhecida por causar hipertensão pulmonar, e também seu precursor, a big-endotelina-1, oriunda dos pulmões após instalação da EP. A endotelina também causa vasoconstrição coronariana podendo contribuir para a depressão miocárdica. (Battistini 2003).

Estudos recentes envolvendo embolia aérea em pulmões isolados de coelhos e cães anestesiados mostraram que um antagonista de receptores da endotelina reduziu significativamente os aumentos de PMAP após EP (Tanus-Santos, Gordo et al. 2000; Tanus-Santos, Gordo et al. 2000).

Fator de ativação das plaquetas (PAF) é produzido e liberado pela maioria das células inflamatórias e pelas plaquetas quando estas são estimuladas e também participa de uma das etapas da TxA₂ plaquetária (Barnes and Liu 1995). Estudos em animais em repouso revelaram que o PAF causa hipotensão sistêmica, hipertensão e edema pulmonar, além de induzir à vasoconstrição pulmonar quando o tônus vascular está reduzido.

A histamina é encontrada em vários tecidos. Está presente em altas concentrações na pele e pulmões (onde provoca vasoconstrição vascular quando liberada das células da camada adventícia). Na circulação sistêmica causa vasodilatação (Barnes and Liu 1995).

Após instalação da EPA são liberadas prostaglandinas (PG), algumas vasoconstritoras e outras vasodilatadoras (Broeders, Tangelder et al. 2001), como a PGI₂ (prostaciclina), que também é um potente anti-agregante plaquetário (Hill and Pearl 1999; Liu, Bee et al. 1999). A PGI₂ reduz tanto a resistência pulmonar como a sistêmica, provocando um aumento no débito cardíaco. Não é, portanto, um vasodilatador pulmonar seletivo, ao contrário do óxido nítrico. O óxido nítrico (NO) administrado por via inalatória produziu vasodilatação pulmonar seletiva em condições de hipertensão pulmonar induzida experimentalmente (Bottiger, Motsch et al. 1996; Tanus-Santos, Moreno et al. 1999; Weimann, Zink et al. 1999; Tanus-Santos and Theodorakis 2002)). Ele é produzido pelas células endoteliais e pelas plaquetas e, além da vasodilatação pulmonar, inibe a agregação e a ativação plaquetárias, contribuindo desta forma para diminuir a liberação de substâncias vasoconstritoras pelas plaquetas e diminuir o recrutamento de novas plaquetas (Tanus-Santos, Moreno et al. 1999).

Conforme mencionado, o desequilíbrio entre fatores humorais liberados após EPA poderá resultar em predomínio de vasoconstrição pulmonar com aumento da PMAP e piora hemodinâmica. Intervenções farmacológicas nestes fatores poderão vir a ser alternativas no tratamento dos distúrbios hemodinâmicos da EPA.

A vasoconstrição pulmonar neurogênica é outro fator que colabora para a piora hemodinâmica na EPA. Temos na circulação pulmonar a inervação parassimpática, a não adrenérgica e não colinérgica (NANC) e os nervos simpáticos eferentes. Alguns estudos

demonstram efeitos benéficos com a simpatectomia na HP. Também o bloqueio do gânglio estrelado produziu diminuição da cianose, da dispnéia e melhora do choque circulatório em pacientes com HP (Stratmann and Gregory 2003).

O reflexo de Bezold-Jarisch provoca apnéia, bradicardia e hipotensão sistêmica, e é ativado na EP. Estudos revelam que o bloqueio bilateral do nervo vago abole este reflexo e previne o colapso hemodinâmico sistêmico após tromboembolia experimental (Smulders 2001; Stratmann and Gregory 2003).

1.3- O papel das metaloproteinases

As metaloproteinases são enzimas envolvidas na degradação da matriz extracelular. Na EPA a atividade das MMPs (especialmente a MMP-2 e a MMP-9) durante hipertensão arterial pulmonar pode explicar a fragmentação da lâmina elástica interna, uma característica histopatológica precoce da hipertensão arterial pulmonar, que leva ao aumento de permeabilidade capilar (Jeffery and Morrell 2002).

Trabalhos sugerem que as MMPs vasculares podem ter um papel na regulação do tônus vascular, afetando a resposta hemodinâmica e a mortalidade associada com EPA maciça. Recentemente, Fernandez e colaboradores demonstraram em alguns estudos (Fernandez-Patron, Radomski et al. 1999; Fernandez-Patron, Stewart et al. 2000; Fernandez-Patron, Zouki et al. 2001) o papel das metaloproteinases como novo modulador da contratilidade vascular, atuando no metabolismo da big-endotelina-1, cujo produto final, a endotelina-1, é um potente vasoconstritor. Existe a hipótese de que a inibição destas metaloproteinases levaria a uma atenuação do distúrbio hemodinâmico observado na EPA e que seu aumento poderia refletir o recrutamento e migração de células inflamatórias na circulação pulmonar. O influxo precoce de neutrófilos e macrófagos na parede da artéria pulmonar tem sido demonstrado na EPA (Eagleton, Henke et al. 2002) e há rápida liberação de grânulos contendo grande quantidade de MMP-9 (Fernandez-Patron, Zouki et al. 2001; Van den Steen, Dubois et al. 2002).

O estresse mecânico do vaso pode levar a maior liberação de MMPs (Galis and Khatri 2002; Grote, Flach et al. 2003) e finalmente a MMP-9 tem sido implicada na modulação do tônus vascular através da liberação de endotelina-1, potente vasoconstritor (Tanus-Santos, Gordo et al. 2000; Tanus-Santos, Gordo et al. 2000; Fernandez-Patron, Zouki et al. 2001; Van den Steen, Dubois et al. 2002; Battistini 2003). Estudos adicionais precisam ser realizados. A utilização de antagonistas das MMPs poderia ser mais uma opção de tratamento da hipertensão pulmonar ocasionada na EPA.

2- OBJETIVOS

Nosso objetivo neste trabalho foi testar a hipótese de que a inibição das metaloproteinases por um inibidor inespecífico (doxiciclina) poderia atenuar os distúrbios hemodinâmicos ocorridos após a embolia pulmonar aguda induzida em cães anestesiados.

3- ARTIGO

A role for matrix metalloproteinase-9 in the hemodynamic changes following acute pulmonary embolism

Geisa M. Fortuna^a, Livia Figueiredo-Lopes^b, Carlos A.C. Dias-Junior^b,
Raquel F. Gerlach^c, Jose E. Tanus-Santos^{b,*}

^a Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, 13081-970, Campinas, SP, Brazil

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

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

Received 19 September 2005; received in revised form 17 November 2005; accepted 17 November 2005

Available online 2 May 2006

Abstract

Background: Matrix metalloproteinases (MMPs) modulate vascular contractility and may affect acute pulmonary embolism (APE)-induced pulmonary hypertension. We examined the effects of the administration of doxycycline (a MMP inhibitor) following APE in anesthetized dogs.

Methods: Sham operated dogs ($N=5$) received only saline. APE was induced by intravenous injections of microspheres in amounts to increase mean pulmonary artery pressure (MPAP) by 20 mm Hg, and embolized dogs received saline (Emb group, $N=8$), or doxycycline (10 mg/kg, i.v.) 5 or 30 min of APE (Emb+Doxy 5 and Emb+Doxy 30 groups, $N=9$ and 8, respectively). Hemodynamic evaluation was performed at baseline and 5–120 after APE. Gelatin zymography of MMP-2 and MMP-9 from plasma samples was performed.

Results: No significant hemodynamic changes were found in Sham animals. Embolization increased MPAP by $218 \pm 16\%$ and the pulmonary vascular resistance index (PVRI) by $289 \pm 42\%$ in Emb group (both $P < 0.05$). Doxycycline increased the cardiac index by $24 \pm 5\%$ and reduced PVRI by $23 \pm 4\%$ 120 min of APE in Doxy 30+Emb group. In addition, doxycycline reduced MPAP and PVRI 30 min after APE with maximum effects seen 120 min after APE ($25 \pm 4\%$ decrease in MPAP and $33 \pm 6\%$ decrease in PVRI; both $P < 0.05$) in Doxy+5 group. Plasma pro-MMP-9 and MMP-9 levels increased only in Emb group and MMP-2 remained unaltered.

Conclusions: Our study shows that doxycycline attenuates APE-induced pulmonary hypertension, and indicates that MMP-9 has a role in APE-induced pulmonary hypertension. MMP-9 may be a pharmacological target in APE.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Doxycycline; Matrix metalloproteinases; Pulmonary embolism; Pulmonary hypertension

1. Introduction

The pulmonary circulation has a major role in filtering emboli that may be present in the venous blood causing acute pulmonary embolism (APE). Indeed, APE is an important disease and a major cause of morbidity and death [1], which is caused primarily by acute right heart failure

and circulatory shock secondary to the obstruction of the pulmonary vascular bed [2]. The usual therapy of APE includes supportive care, systemic anticoagulation, systemic thrombolysis and surgical embolectomy [1]. While the current treatment of APE is focused on removing the mechanical obstruction, recent studies have addressed the relevance of pulmonary artery vasoconstriction in APE and the pharmacological blockade of the pulmonary vasoconstriction has been suggested as adjuvant therapy [3–6].

Matrix metalloproteinases (MMPs) form a group of enzymes involved in the degradation of components of the

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

E-mail address: tanus@fmrp.usp.br (J.E. Tanus-Santos).

extracellular matrix (ECM). Several MMPs (MMP-1, -2, -3, and -9) are expressed in vascular smooth muscle cells and in a variety of other cells potentially affecting the pulmonary circulation, including endothelial cells, macrophages, fibroblasts and alveolar epithelial cells [7]. In this regard, it has been shown that MMPs play a role in pulmonary vascular remodeling found in monocrotaline and hypoxic models of chronic pulmonary hypertension [8]. Recent studies, however, suggest that MMPs may also be involved in the development of acute pulmonary hypertension associated with acute conditions such as APE. For example, the acute activation of MMPs (especially MMP-2 and -9) caused fragmentation of internal elastic laminae, which is an early histopathologic feature of pulmonary hypertension that leads to increased pulmonary vascular permeability [7,9]. Moreover, vascular MMPs (MMP-2 and MMP-9) have been recently established as new modulators of vascular contractility by cleaving big endothelin-1 to endothelin-1 or to another potent vasoconstrictor [10–12]. Therefore, it is possible that MMP-2 and MMP-9-induced generation of endothelin-1-related vasoconstrictors can potentiate pulmonary vasoconstriction during APE, as demonstrated by many studies implicating the endothelin system in the pathophysiology of APE-induced pulmonary hypertension [4,5,13]. Furthermore, activation of MMPs during APE can cause pulmonary vasoconstriction through vascular MMP-2 cleavage of calcitonin gene-related peptide (CGRP) [11], a potent vasodilator of pulmonary vessels *in vitro* [14]. Further supporting the idea that MMPs may have a role in APE-induced hemodynamic changes, we found that the previous administration of intravenous doxycycline (a non-specific inhibitor of MMPs) attenuated APE-induced systemic hypotension in anesthetized rats [15].

In the present study, we expand our previous findings [15]. We have now examined the effects of the administration of doxycycline following APE in a dog model of APE, which has allowed a more detailed hemodynamic evaluation of the possible effects associated with doxycycline administration. In addition, we have now assessed the circulating levels of MMP-2 and MMP-9 by gel zymography. Our main hypothesis was that doxycycline-induced inhibition of MMP-2 or MMP-9 would be associated with an attenuation of APE-induced pulmonary hypertension.

2. Materials and methods

2.1. Animal model and hemodynamic measurements

All animals received humane care and study protocols complied with the guidelines of the ethics committee for the use of experimental animals at the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto. We used a whole animal model of APE [16–18] to study the effect of intravenous doxycycline on APE-induced hemodynamic changes. Thirty-five mongrel dogs (12.9 ± 1.9 kg) of either sex were anesthetized with ketamine

(10–15 mg/kg, *i.m.*), xylazine (1.5 mg/kg, *i.m.*), and pancuronium (0.1 mg/kg, *i.v.*), tracheally intubated, and their lungs mechanically ventilated with room air using a volume-cycled respirator (C.F. Palmer, London, UK). The tidal volume was 15 ml/kg and the respiratory rate was adjusted to maintain a baseline physiologic arterial carbon dioxide tension. Anesthesia was maintained with an intramuscular injection of ketamine (3 mg/kg) and xylazine (0.3 mg/kg) every 30 min. Fluid-filled catheters were placed into the left femoral artery and right femoral vein for mean arterial pressure (MAP) monitoring via a pressure transducer and fluid administration, respectively. A 7.5F balloon-tipped Swan-Ganz thermodilution catheter was placed into the pulmonary artery via the left femoral vein, its correct location being confirmed by detection of the typical pressure wave of this artery. The catheter was connected to pressure transducers to allow the monitoring of mean pulmonary artery pressure (MPAP), central venous pressure, and pulmonary capillary wedge pressure. The transducers were zeroed at the level of the right heart and thermodilution cardiac output was determined in triplicate by injecting 3 ml of saline and the results recorded on a computerized system (DX2010 Dixtal Monitor, Dixtal do Brazil, Manaus, Brazil). The heart rate (HR) was measured using a surface electrocardiogram (lead I).

After at least 20 min of stabilization, a baseline (BL) hemodynamic evaluation was performed. The animals were randomly assigned to one of four experimental groups as follows: (1) a group of Sham operated, non-embolized animals ($n=5$), which received only saline infusions; (2) Doxy group ($n=5$), which received doxycycline (10 mg/kg) *i.v.* followed by saline infusions; (3) Emb group ($n=8$), which received repeated injections (every 30 s) of 300 μ m microspheres (Sephadex G50; Pharmacia Fine Chemicals; Uppsala, Sweden) into the inferior vena cava over 5–10 min. The amount of microspheres infused in each dog was adjusted to induce an increase of 20 mm Hg in MPAP, as previously described [16–18]. (4) Emb+Doxy 30 group ($n=9$), which received the same infusions of microspheres given to dogs in the Emb group, followed 30 min later by the same intravenous dose of doxycycline (10 mg/kg) given to dogs in the Doxy group. The dose of doxycycline used in the present study was chosen with basis on a previous study [15]. Hemodynamic evaluations were performed 5, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min after APE was induced. The cardiac index (CI), systemic vascular resistance index (SVRI), and pulmonary vascular resistance index (PVRI) were calculated by standard formulae. Arterial blood samples were collected into tubes containing EDTA at baseline and at all time points mentioned above, and plasma samples were stored at -70 °C until assayed for gelatin zymography as detailed below.

Finally, after we analyzed the hemodynamic results from experimental groups (1)–(4), we decided to include in this study another experimental group of animals, which was named Emb+Doxy 5 group ($n=8$). Dogs in this group

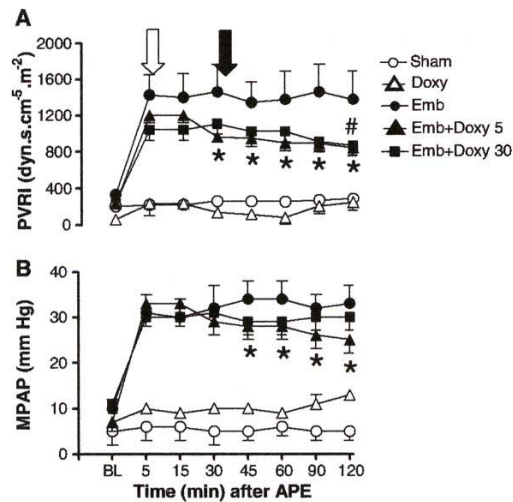


Fig. 1. Pulmonary vascular resistance index (PVRI, panel A) and mean pulmonary arterial pressure (MPAP, panel B) at baseline (BL), and 5, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min of acute pulmonary embolism (APE) in Sham ($N=5$), Doxy ($N=5$), Emb ($N=8$), Emb+Doxy 5 ($N=9$), and Emb+Doxy 30 ($N=8$) groups. The open arrow indicates the intravenous administration of doxycycline (10 mg/kg) 5 min after APE in the Emb+Doxy 5 group. The black arrow indicates the intravenous administration of doxycycline (10 mg/kg) 30 min after APE in the Emb+Doxy 30 group. Values are the mean $\pm$ S.E.M. * $P<0.05$ versus measurements at 5 min for Emb+Doxy 5 group. # $P<0.05$ versus measurements at 30 min for Emb+Doxy 30 group.

received the same infusions of microspheres and doxycycline (10 mg/kg) given to dogs in the Emb+Doxy 30 group, except that doxycycline was injected 5 min after the induction of APE, thus allowing the evaluation of an earlier (5 vs. 30 min after APE) administration of doxycycline.

2.2. SDS-Polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE) gelatin zymography of MMP-9

Gelatin zymography of MMP-2 and MMP-9 from plasma was performed as previously described [19,20]. Briefly, plasma samples were subjected to electrophoresis on 12% SDS-PAGE co-polymerized with gelatin (1%) as the substrate. After electrophoresis was complete, the gel was incubated for 1 h at room temperature in a 2% Triton X-100 solution, and incubated at 37 °C for 16 h in Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 10 mmol/L CaCl₂. The gels were stained with 0.05% Coomassie Brilliant Blue G-250, and then destained with 30% methanol and 10% acetic acid. Gelatinolytic activities were detected as unstained bands against the background of Coomassie blue-stained gelatin. Enzyme activity was assayed by densitometry using a Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290 (Kodak, Rochester, NY). The active form of MMP-2, the pro and active forms of MMP-9 were identified as bands at 67 kDa, 92 kDa and 87 kDa, respectively, by the relation of log Mr to the relative mobility of Sigma SDS-PAGE LMW marker proteins.

2.3. Drugs and reagents

All drugs and reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

2.4. Statistical analysis

All the results are expressed as means $\pm$ S.E.M. One-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures followed by the Dunnett multiple comparisons test (Stat-View for Windows, Cary, NC, USA) was used to determine the changes in the hemodynamic parameters. One-way ANOVA followed by the Dunnett multiple comparisons test was used to compare biochemical parameters between groups. A probability value <0.05 was considered the minimum level of statistical significance.

3. Results

Baseline hemodynamic parameters were similar in all experimental groups (Figs. 1, 2, and 3). We found no significant hemodynamic changes in Sham and in Doxy groups throughout the study period (Figs. 1, 2, and 3). Conversely, lung embolization significantly increased MPAP (by $218 \pm 16\%$) and PVRI (by $289 \pm 42\%$) in Emb

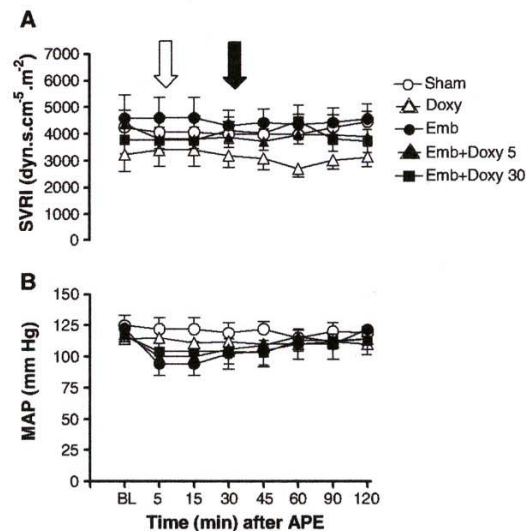


Fig. 2. Systemic vascular resistance index (SVRI, panel A) and mean arterial pressure (MAP, panel B) at baseline (BL), and 5, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min of acute pulmonary embolism (APE) in Sham ($N=5$), Doxy ($N=5$), Emb ($N=8$), Emb+Doxy 5 ($N=9$), and Emb+Doxy 30 ($N=8$) groups. The open arrow indicates the intravenous administration of doxycycline (10 mg/kg) 5 min after APE in the Emb+Doxy 5 group. The black arrow indicates the intravenous administration of doxycycline (10 mg/kg) 30 min after APE in the Emb+Doxy 30 group. Values are the mean $\pm$ S.E.M.

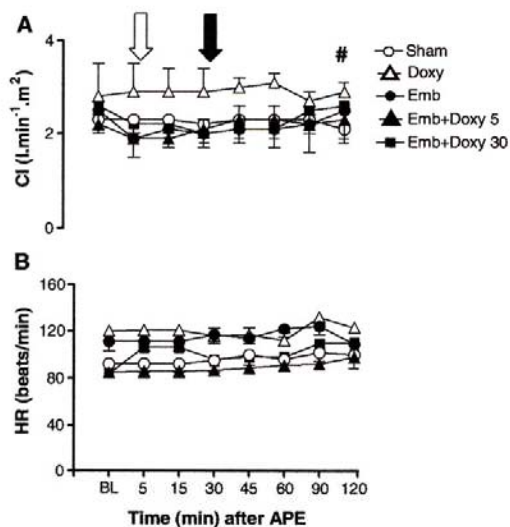


Fig. 3. Cardiac index (CI, panel A) and heart rate (HR, panel B) at baseline (BL), and 5, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min of acute pulmonary embolism (APE) in Sham ($N=5$), Doxy ($N=5$), Emb ($N=8$), Emb+Doxy 5 ($N=9$), and Emb+Doxy 30 ($N=8$) groups. The open arrow indicates the intravenous administration of doxycline (10 mg/kg) 5 min after APE in the Emb+Doxy 5 group. The black arrow indicates the intravenous administration of doxycline (10 mg/kg) 30 min after APE in the Emb+Doxy 30 group. Values are the mean $\pm$ S.E.M. # $P<0.05$ versus measurements at 30 min for Emb+Doxy 30 group.

group for more than 120 min (both $P<0.05$), without significant changes in the other hemodynamic parameters.

While the administration of doxycline 30 min after APE (Emb+Doxy 30 group) did not significantly affect APE-induced increases in MPAP, this drug increased CI (by $24\pm5\%$; Fig. 3 panel A) and reduced PVRI (by $23\pm4\%$; Fig. 1, panel A) 120 min after APE (both $P<0.05$). Although these results suggested that treatment with doxycline injected 30 min after APE attenuates APE-induced hemodynamic changes, we hypothesized that administering doxycline earlier than 30 min after APE would produce better effects. Therefore, we studied the effects of the same dose of doxycline administered 5 min after APE. Interestingly, we found that under these con-

ditions (Emb+Doxy 5 group) doxycline significantly reduced MPAP and PVRI 30 min after APE, with maximum effects found 120 min after APE ($25\pm4\%$ decrease in MPAP and $33\pm6\%$ decrease in PVRI; Fig. 1, panels A and B, respectively; both $P<0.05$).

Fig. 4 shows a representative zymogram of plasma samples showing pro-MMP-9, MMP-9, and MMP-2 bands. While no significant changes were found in Sham and in Doxy groups, animals in Emb group presented significant increases in plasma pro-MMP-9 and MMP-9 levels (Fig. 5, panels A and B; both $P<0.05$). Treatment with doxycline, however, was associated with no significant increases in both plasma pro-MMP-9 and MMP-9 levels (Fig. 5, panels A and B; both $P<0.05$). Finally, no significant changes were found in plasma MMP-2 levels.

4. Discussion

In this study, we demonstrate for the first time that MMP-9 inhibition with doxycline attenuates APE-induced pulmonary hypertension. While modest hemodynamic effects were seen when doxycline was administered 30 min after APE, the administration of this MMP inhibitor 5 min of APE produced significant reductions in MPAP and in PVRI without systemic effects, thus indicating that MMP-9 plays a role in the pathophysiology of APE-induced pulmonary hypertension. Moreover, our findings suggest that pharmacological strategies targeting MMPs may help in the therapy of the detrimental acute hemodynamic consequences of APE.

An inflammatory response with an early influx of neutrophils and macrophages within the pulmonary artery wall has been demonstrated in experimental APE [21]. These inflammatory cells can rapidly release granules containing large amounts of MMP-9 [12,22], thus explaining the increases in circulating pro-MMP-9 and MMP-9 that we have found in the present study. A major factor leading to such increases of MMP-9 following APE is the activation of neutrophils, which release superoxide and other reactive oxygen species increasing oxidative stress, as we and others have demonstrated in rat, dog, and mice models of APE [16, 23,24]. Increased oxidative stress, in turn, activates MMPs

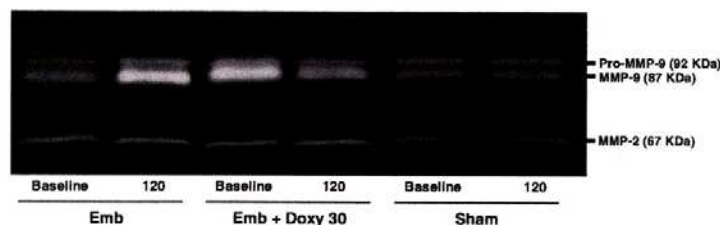


Fig. 4. A representative zymogram of plasma samples (baseline and 120 min after acute pulmonary embolism) showing the active form of MMP-2, the pro and active forms of MMP-9, which were identified as bands at 67 kDa, 92 kDa and 87 kDa, respectively, in Emb, Emb+Doxy 30, and Sham groups.

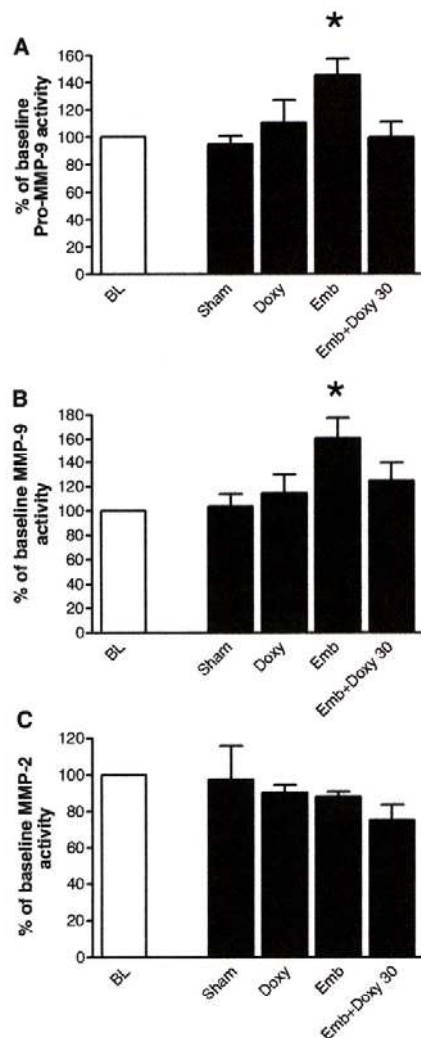


Fig. 5. Percentage of baseline Pro-MMP-9 (Panel A), MMP-9 (Panel B), and MMP-2 (Panel C) values in Sham, Doxy, Emb, and Emb+Doxy 30 groups. Values are the mean±S.E.M. * $P<0.05$ versus Sham and Emb+Doxy 30 groups.

[22,25] and it has been suggested that attenuation of APE-induced oxidative stress attenuates the increases in MMPs associated with APE [26].

We found that treatment with doxycycline significantly attenuated the increases in MMP-9 and reduced MPAP and PVRI following APE. These findings are consistent with those of recent reports showing that MMP-9 is involved in the modulation of vascular tone through the release of endothelin-1 (ET-1) [12,22], a potent vasoconstrictor released following APE [4,5,13]. While both pro-MMP-9 and MMP-9 increased after pulmonary embolism, its active form (MMP-9) is expected to acutely modulate hemodynamics.

Although we did not measure ET-1 concentrations, it is possible that APE-induced MMP-9 release enhances big ET-1 cleavage to ET-1, a potent vasoconstrictor involved in the hemodynamic changes following APE [4,5,13]. Thus, it is possible that the doxycycline-induced inhibition of MMPs attenuated the hemodynamic changes associated with APE through inhibition of MMP-9-induced ET-1 release. This hypothesis is supported by previous evidence demonstrating that neutrophil MMP-9 cleave big ET-1 producing further activation of neutrophils in a positive feedback loop that promotes leukocyte–endothelial cell adhesion and neutrophil migration into inflamed tissues [12,22]. Finally, many studies have shown that nonselective ET-receptor antagonism or blockade of ET-1 type A (ETA) receptors attenuates the hemodynamic responses to APE [4,5,27].

We found that doxycycline produced modest hemodynamic effects when it was administered 30 min after APE. Conversely, the same dose of doxycycline produced better effects when it was administered earlier (5 min after APE). These findings are consistent with the notion that MMPs activate different signaling cascades [22] following APE, which are not completely blunted by simply inhibiting MMPs. Although we have not examined the effects of MMP inhibition many hours after APE, it is possible that doxycycline does not produce beneficial hemodynamic effects under such conditions. In addition, the use of MMP inhibitors following APE may be limited by previous findings showing that combining MMP inhibitors with chemotherapy was associated with significant increases in the risk of venous thromboembolism [28]. Although the mechanisms leading to this effect are not clear at present, the possible therapeutic effects of MMP inhibitors should be examined with caution.

The present study has some limitations that should be taken into consideration. For example, patients with acute pulmonary embolism are sometimes managed several hours after the onset of symptoms. Therefore, the very early injection of doxycycline would be impossible. In addition, we have not examined the specific targets for MMP-9 in the present study. Although a possible mechanism of acute actions of MMPs is cleavage and modulation of vaso-peptides such as big ET-1, MMPs may also acutely affect vascular contractility through other pathways including transactivation of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling [29]. Indeed, the selective blockade of EGFR signaling reduced monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension [30]. In addition, MMPs inhibition with doxycycline may attenuate the deposition of extracellular matrix and inhibit arterial remodeling [31].

In conclusion, our study shows that MMP-9 inhibition with doxycycline attenuates APE-induced pulmonary hypertension. Our results indicate that MMP-9 has a role in the pathophysiology of APE-induced pulmonary hypertension. These findings suggest that pharmacological strategies targeting MMP-9 may help in the therapy of the acute hemodynamic derangements associated with APE.

References

- [1] Sadosty AT, Boie ET, Stead LG. Pulmonary embolism. *Emerg Med Clin North Am* 2003;21:363–84.
- [2] Lualdi JC, Goldhaber SZ. Right ventricular dysfunction after acute pulmonary embolism: pathophysiologic factors, detection, and therapeutic implications. *Am Heart J* 1995;130:1276–82.
- [3] Smulders YM. Pathophysiology and treatment of haemodynamic instability in acute pulmonary embolism: the pivotal role of pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res* 2000;48:23–33.
- [4] Tanus-Santos JE, Gordo WM, Udelmann A, Cittadino MH, Moreno Jr H. Nonselective endothelin-receptor antagonism attenuates hemodynamic changes after massive pulmonary air embolism in dogs. *Chest* 2000;118:175–9.
- [5] Tanus-Santos JE, Gordo WM, Udelmann A, Moreno Jr H. The hemodynamic effects of endothelin receptor antagonism during a venous air infusion in dogs. *Anesth Analg* 2000;90:102–6.
- [6] Tanus-Santos JE, Theodorakis MJ. Is there a place for inhaled nitric oxide in the therapy of acute pulmonary embolism? *Am J Respir Med* 2002;116:167–76.
- [7] Jeffery TK, Morrell NW. Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 2002;45:173–202.
- [8] Frisdal E, Gest V, Vieillard-Baron A, et al. Gelatinase expression in pulmonary arteries during experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2001;18:838–45.
- [9] Todorovich-Hunter L, Dodo H, Ye C, McCready L, Keeley FW, Rabinovitch M. Increased pulmonary artery elastolytic activity in adult rats with monocrotaline-induced progressive hypertensive pulmonary vascular disease compared with infant rats with nonprogressive disease. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:213–23.
- [10] Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res* 1999;85:906–11.
- [11] Fernandez-Patron C, Stewart KG, Zhang Y, Koivunen E, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. *Circ Res* 2000;87:670–6.
- [12] Fernandez-Patron C, Zouki C, Whittall R, Chan JS, Davidge ST, Filep JG. Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1[1–32]. *FASEB J* 2001;15:2230–40.
- [13] Battistini B. Modulation and roles of the endothelins in the pathophysiology of pulmonary embolism. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:555–69.
- [14] Barnes PJ, Liu SF. Regulation of pulmonary vascular tone. *Pharmacol Rev* 1995;47:87–131.
- [15] Palei ACT, Zanetti RAG, Fortuna GM, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Hemodynamic benefits of matrix metalloproteinase-9 inhibition by doxycycline during experimental acute pulmonary embolism. *Angiology* 2005;56:611–7.
- [16] Dias-Junior CA, Souza-Costa DC, Zerbini T, Rocha JBT, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Effect of sildenafil on pulmonary embolism-induced oxidative stress and pulmonary hypertension. *Anesth Analg* 2005;101:115–20.
- [17] Dias-Junior CA, Vieira TF, Moreno Jr H, Evora PR, Tanus-Santos JE. Sildenafil selectively inhibits acute pulmonary embolism-induced pulmonary hypertension. *Pulm Pharmacol Ther* 2005;18:181–6.
- [18] Souza-Silva AR, Dias-Junior CA, Uzuelli JA, Moreno Jr H, Evora PR, Tanus-Santos JE. Hemodynamic effects of combined sildenafil and L-arginine during acute pulmonary embolism-induced pulmonary hypertension. *Eur J Pharmacol* 2005;524:126–31.
- [19] Souza-Tarla CD, Uzuelli JA, Machado AA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Clin Biochem* 2005;38:410–4.
- [20] Gerlach RF, Uzuelli JA, Souza-Tarla CD, Tanus-Santos JE. Effect of anticoagulants on plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Anal Biochem* 2005;344:147–9.
- [21] Eagleton MJ, Henke PK, Luke CE, et al. Inflammation and intimal hyperplasia associated with experimental pulmonary embolism. *J Vasc Surg* 2002;36:581–8.
- [22] Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002;37:375–536.
- [23] Souza-Costa DC, Zerbini T, Metzger IF, Rocha JB, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. L-Arginine attenuates acute pulmonary embolism-induced oxidative stress and pulmonary hypertension. *Nitric Oxide* 2005;12:9–14.
- [24] Dikshit M, Srivastava R, Srimal RC. Role of free radicals in pulmonary thromboembolism in mice. *Thromb Res* 1989;55:549–57.
- [25] Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002;90:251–62.
- [26] Souza-Costa DC, Zerbini T, Palei AC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. L-arginine attenuates acute pulmonary embolism-induced increases in lung matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9. *Chest* 2005;128:3705–10.
- [27] Ayach B, Tsang J, Jeng AY, et al. Effects of a selective endothelin A receptor antagonist, ABT-627, in healthy normotensive anesthetized rats developing acute pulmonary air embolism. *Clin Sci (Lond)* 2002;103:371S–5S.
- [28] Behrendt CE, Ruiz RB. Venous thromboembolism among patients with advanced lung cancer randomized to prinomastat or placebo, plus chemotherapy. *Thromb Haemost* 2003;90:734–7.
- [29] Hao L, Du M, Lopez-Campistrous A, Fernandez-Patron C. Agonist-induced activation of matrix metalloproteinase-7 promotes vasoconstriction through the epidermal growth factor-receptor pathway. *Circ Res* 2004;94:68–76.
- [30] Merklinger SL, Jones PL, Martinez EC, Rabinovitch M. Epidermal growth factor receptor blockade mediates smooth muscle cell apoptosis and improves survival in rats with pulmonary hypertension. *Circulation* 2005;112:423–31.
- [31] Courtman DW, Franco CD, Meng Q, Bendeck MP. Inward remodeling of the rabbit aorta is blocked by the matrix metalloproteinase inhibitor doxycycline. *J Vasc Res* 2004;41:157–65.

4- DISCUSSÃO

O difícil diagnóstico da Embolia Pulmonar Aguda nos leva à procura de marcadores que facilitem a confirmação diagnóstica e auxiliem no seguimento de pacientes com esta entidade. No excelente artigo de revisão publicado em 2005 (Aubert 2005) o autor cita, entre outros, o peptídeo natriurético atrial, o BNP (brain natriuretic peptide), a troponina T, o ácido úrico, a endotelina-1, os produtos do metabolismo do NO (óxido nítrico), a serotonina e o D-dímero. Alguns marcadores como o BNP, o pró-BNP, o ácido úrico, o D-dímero e a troponina T têm mostrado resultados promissores no que se refere à correlação com sobrevida, independentemente da hemodinâmica.

Muitos artigos publicados recentemente demonstram a importância das MMPs na hipertensão pulmonar. Uma característica comum a todas as formas de HAP (Hipertensão Arterial Pulmonar) é a muscularização, a extensão de células musculares lisas para pequenas artérias, normalmente não muscularizadas, dentro do ácino respiratório. O mecanismo que habilita a migração de fibroblastos da adventícia para a camada média e desta para a íntima, ainda não está completamente elucidado mas há evidências do envolvimento da MMP-2 e MMP-9 (Frisdal, Gest et al. 2001).

Estudos em ratos utilizando dois modelos de hipertensão pulmonar (exposição à hipóxia ou monocrotalina) avaliaram a MMP-2 nos vasos pulmonares. Zimografia de homogenado do tecido revelou uma associação da progressão da hipertensão pulmonar hipóxica com um aumento da atividade da MMP-2, específico em vasos pulmonares. O aumento da MMP-2 também foi encontrado 30 dias após a administração de monocrotalina. A forma ativa da MMP-2 e sua atividade gelatinolítica foram correlacionadas à severidade da hipertensão pulmonar (Frisdal, Gest et al. 2001).

Usando um modelo de perfusão isolada de pulmões de ratos e administrando L-arginina (0.5, 3 e 10 mmol/L) observou-se atenuação da hipertensão pulmonar induzida (6.6 mg/kg de microesferas de silicone), associada à diminuição da atividade tanto da MMP-2 quanto da MMP-9. O efeito prospectivo da L-arginina foi completamente revertido pela inibição da síntese do NO (óxido nítrico) com L-NAME. A EPA foi associada com aumento da atividade da MMP-2 e da MMP-9 no pulmão. Enquanto a L-arginina 0.5 mmol/L não produziu efeito sobre as MMPs, L-arginina 3 mmol/L e 10 mmol/L atenuou o aumento da atividade da MMP-2 e da MMP-9 após EPA demonstrado na

zimografia do extrato dos pulmões (Souza-Costa, Zerbini et al. 2005; Souza-Costa, Zerbini et al. 2005). Em outro estudo, também com ratos submetidos à EPA induzida por microesferas de silicone (9 mg/kg de microesferas), observou-se aumento da atividade da MMP-9 pulmonar após embolização (através da zimografia do homogenado pulmonar) e diminuição de sua atividade quando o grupo embolia foi pré-tratado com doxiciclina, um inibidor inespecífico das metaloproteinases. Os ratos anestesiados tiveram sua pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) monitorizadas. No grupo embolia (não tratado com doxiciclina) houve redução significativa da PAM e da FC por mais que 60 minutos e aumento da atividade da MMP-9. No grupo embolia, pré-tratado com doxiciclina, houve somente hipotensão arterial transitória (Palei, Zaneti et al. 2005).

A fisiopatologia da HP tem sido extensamente estudada. O envolvimento da célula muscular lisa é importante, já que esta compreende o maior componente celular da parede arterial normal. Suas principais funções são manter o tônus arterial apropriado e produzir a matriz extracelular (MEC). A célula muscular lisa (CML) produz tanto MMP-2 quanto MMP-9. São também estas células as responsáveis por patologias vasculares, inclusive a formação de lesão intimal, que ocorre naturalmente ou induzida por intervenções vasculares. Migração, proliferação e, subsequentemente, produção de MEC leva à formação de lesões neointimais ricas em CML, as quais podem obstruir o lúmen arterial. O movimento das CMLs através da matriz necessita da degradação de vários componentes, inclusive membrana basal e lâmina elástica, degradação esta possível devido à ação de enzimas da família das metaloproteinases. CMLs produzem pró-MMP-2 basalmente em vasos sanguíneos normais e em cultura, além de outras MMPs, inclusive MMP-9, após estimulação por citocinas in vitro e depois de lesão por cateter-balão. A deficiência genética de MMP-2 e MMP-9 diminuiu a invasão de célula muscular lisa in vitro em 81% e 65%, respectivamente, e diminuiu a formação de hiperplasia intimal in vivo (Frisdal, Gest et al. 2001; Johnson and Galis 2004).

Outra linhagem de células extensamente estudadas são as células inflamatórias. A embolia pulmonar (EP) foi associada com influxo precoce de polimorfonucleares, elevação de macrófagos e MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) dentro da parede da artéria pulmonar. O influxo de leucócitos ocorreu precocemente no primeiro dia depois

de induzida a EP. Na parede da artéria pulmonar predominaram os neutrófilos, com concomitante elevação de macrófagos. No parênquima pulmonar houve predominância dos macrófagos. Curiosamente, outros mediadores inflamatórios testados, tais como interleucina-10 e KC/GRO (keratinocyte-derived chemokine), elevaram-se não somente no grupo de animais submetidos à EP, mas também no grupo controle. A resposta inflamatória sistêmica ocorrida em ambos os grupos deveu-se, provavelmente, à cirurgia e à angiografia utilizadas como métodos neste experimento. Também houve hiperplasia da íntima, mas somente nas artérias dos animais submetidos à EP (Eagleton, Henke et al. 2002).

Contrariamente ao que ocorreu em nosso estudo, quando o uso precoce de doxiciclina produziu melhora nos níveis pressóricos e na resistência vascular pulmonar em ratos submetidos à EPA induzida, em um outro modelo de hipertensão pulmonar induzida por hipóxia (exposição a 10% oxigênio por 15 dias) em ratos, houve um aumento da pressão arterial pulmonar e muscularização após inibição das MMPs com doxiciclina (Vieillard-Baron, Frisdal et al. 2000). Diferentemente do nosso modelo, os ratos foram pré-tratados com a doxiciclina (20 mg/Kg por dia). Há uma aparente discrepância entre os estudos, o que nos leva a crer que mais estudos serão necessários para esclarecer o papel das MMPs na hipertensão pulmonar. Os resultados avaliados neste estudo foram tardios (15 dias), enquanto que no nosso, avaliamos os dados apenas por um curto período (120 minutos).

Também o uso de outro inibidor das MMPs, o prinomastat, foi associado a maior incidência de fenômenos trombóticos quando associados à quimioterápicos (Behrendt and Ruiz 2003). Há muito que se pesquisar para que consigamos algumas respostas. Por exemplo, não sabemos ainda a que se devem as diferentes respostas com relação à administração em tempos diferentes da doxiciclina em nosso estudo.

De qualquer maneira, outros estudos identificam as MMPs como um novo modulador da contratilidade, clivando big-endotelina em endotelina, um potente vasoconstritor, podendo ter relação com o papel da endotelina na vasoconstrição pulmonar durante a EPA. A MMP-2, assim como a MMP-9 e a big-endotelina-1, é produzida e secretada por células musculares lisas e endoteliais. A big-endotelina-1 é essencialmente inativa e requer ativação para produzir vasoconstrição. Serinas e aspartato proteases, assim

como as MMPs podem clivar a big-endotelina-1 gerando peptídeos com potenciais vasoconstritores. No sistema cardiovascular, endoproteases zinco-dependentes, chamadas enzimas conversoras da endotelina (ECEs), podem mediar os efeitos vasoconstritores da big-endotelina-1. As ECEs clivam a big-endotelina-1 gerando um potente vasoconstritor, a endotelina-1 (Battistini and Dussault 1998). No sistema respiratório também foi demonstrado que mastócitos clivam a big-endotelina-1 em endotelina-1 (Boscoe, Goodwin et al. 2000; Dupuis, Jasmin et al. 2000), a qual é um vasoconstritor traqueal e de células lisas vasculares, e poderia estar envolvido na reação alérgica (Goldie 1998; Fineman, Wong et al. 1999).

Todas estas observações revelam diferentes caminhos de ativação da big-endotelina-1 e estas diferenças dependem da localização da protease ativadora da big-endotelina e do tecido alvo (Goldie 1998). Interessantemente, há uma região da big-endotelina que é homóloga à sequência de aminoácidos do colágeno intersticial, ambos clivados pela MMP-2 durante diversos processos fisiopatológicos. A MMP-2 e seu inibidor tecidual (o TIMP-2) são principalmente conhecidos por seus papéis na fisiopatologia da remodelação vascular, angiogênese, reparação tecidual, invasão tumoral, inflamação e ruptura da placa aterosclerótica. Um mecanismo de ação da MMP-2 é a quebra proteolítica das proteínas da MEC. A sequência de aminoácidos no colágeno intersticial, que é quebrado pela MMP-2, é homóloga à determinada região dentro da big-endotelina-1. A big-endotelina-1 requer clivagem para produzir-se uma forma ativa para induzir vasoconstrição. Foi, então, testada a hipótese de que a MMP-2 vascular pode clivar a big-endotelina-1, assim gerando um peptídeo vasoconstritor.

Em artérias mesentéricas de ratos, perfundidas e com endotélio intacto, a inibição da MMP-2 com TIMP-2 reduziu o efeito vasoconstritor da big-endotelina-1. Para confirmar a hipótese de que a MMP-2 cliva a big-endotelina gerando um novo vasoconstritor, um específico anticorpo anti-MMP-2 foi testado e observou-se inibição da vasoconstrição provocada pela big-endotelina. Incubação de big-endotelina-1 com MMP-2 recombinante resultou em clivagem específica na banda gli-leu da big-endotelina-1. O peptídeo resultante exerceu maior efeito vasoconstritor do que a big-endotelina-1, levando-se a crer que a MMP-2 contribui para os efeitos vasoconstritores da

big-endotelina-1, clivando a big-endotelina-1 e gerando um novo e potente vasoconstritor (Fernandez-Patron, Radomski et al. 1999).

Um antagonista não seletivo do receptor de endotelina foi administrado em cães submetidos à EPA induzida. Os níveis aumentados de endotelina-1 parecem estimular a produção de tromboxane-A₂, um potente vasoconstritor. O tromboxane-B₂ (produto do metabolismo de tromboxane-A₂) também foi avaliado. Nos cães pré-tratados com o antagonista não-seletivo do receptor de endotelina houve melhora hemodinâmica significativa, com menor pressão média da artéria pulmonar e menor índice de resistência vascular pulmonar quando comparados com o grupo controle. Também houve aumento de TX-B₂ 15 minutos após a EPA induzida, mas não em cães pré-tratados com o antagonista, concluindo-se, então, que o antagonista não-seletivo do receptor de endotelina atenuou a hipertensão pulmonar e diminuiu a formação de TX-A₂. Em estudos prévios demonstrou-se que a endotelina-1, através da ciclo-oxigenase, aumentou a liberação de TX-A₂, levando-nos a supor que o aumento da pressão média na artéria pulmonar e o aumento do índice de resistência vascular pulmonar após EPA induzida podem ser devido a estes dois mecanismos: aumento de endotelina-1 e aumento de TX-A₂, dois potentes vasoconstritores pulmonares (Tanus-Santos, Gordo et al. 2000).

Na prática, pacientes portadores de HAP já podem ser tratados com o bosetam, um inibidor inespecífico de receptores A e B de endotelina, que demonstrou efeito superior ao placebo sobre a capacidade física em pacientes com hipertensão pulmonar idiopática e associada com doenças do tecido conectivo (Fernandez-Patron, Radomski et al. 1999; Smulders 2000; Rubin 2002; Battistini 2003).

Também foi demonstrado que a clivagem do CGRP (calcitonin gene-related peptide) pela MMP-2 promove vasoconstrição e pode ser este um dos mecanismos envolvidos na vasoconstrição pulmonar da EPA. Patron e colaboradores investigaram os efeitos da inibição da MMP-2 pela ortofenantrolina e obtiveram vasorrelaxamento de artérias mesentéricas isoladas de ratos. Observaram que o fosforamidon, o qual inibe algumas metaloenzimas, mas não a MMP-2, não dilatava as artérias. A inibição seletiva de MMP-2 endógena com o peptídeo cíclico permeável aos tecidos, o CTT, causou vasorrelaxamento, enquanto um análogo do CTT inativo não dilatou as artérias.

Interessantemente, a vasodilatação que resultou da inibição da MMP-2 foi independente do endotélio. Os autores, então, investigaram se a MMP-2 agia nas células musculares lisas ou nos nervos perivasculares. A MMP-2 recombinante humana clivou o CGRP (calcitonin gene-related peptide) e reduziu seu potencial vasodilatador. A inibição de MMP-2 aumentou a quantidade de CGRP intacto nas artérias e exacerbou o vasorrelaxamento induzido pela anandamida, a qual estimula a liberação de CGRP. Vasorrelaxamento em resposta à inibição da MMP-2 foi abolido pela CGRP [8-37], um seletivo antagonista do receptor do CGRP, e pela capsaína, a qual depleta CGRP dos nervos perivasculares. Os autores concluíram, então, que a MMP-2 cliva o CGRP endógeno promovendo vasoconstrição. Estes dados sugerem um novo mecanismo da regulação da vasoatividade, com o CGRP tendo um possível papel neuro-hormonal e a MMP-2 um possível modulador da contratilidade vascular, como já demonstrado em outros trabalhos (Fernandez-Patron, Stewart et al. 2000).

Em excelente artigo publicado em 2004, Martinez demonstrou que a adrenomedulina, um peptídeo vasodilatador, é degradada na presença de MMP-2, mas não de MMP-9, e que, quando clivada, a adrenomedulina gera peptídeos vasoconstritores. Interessantemente, foram identificados na urina de humanos alguns destes fragmentos, produtos da clivagem deste peptídeo vasodilatador, sugerindo que este processo ocorreria in vivo (Martinez, Oh et al. 2004).

Como já foi mencionado, muito há que se pesquisar para desenvolvermos novos métodos diagnósticos e novos marcadores para a embolia pulmonar, e o nosso estudo tem algumas limitações. Por exemplo, no manejo do paciente com embolia pulmonar aguda, sabemos das dificuldades do tratamento precoce. Por outro lado, sabemos da importância das drogas na prevenção de embolia, como hoje já é utilizada a heparina.

5- CONCLUSÃO

Com este estudo, podemos concluir que a inibição das metaloproteinases, através do uso de um inibidor inespecífico, atenua as alterações hemodinâmicas ocorridas após embolia pulmonar aguda induzida em cães anestesiados.

Observamos melhores resultados quando a doxiciclina foi dada precocemente. Estes dados sugerem que as metaloproteinases (especificamente a MMP-9) podem ser um alvo de terapia farmacológica, ao menos como terapia coadjuvante no manejo clínico da embolia pulmonar aguda.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aubert, J. D. (2005). "Biochemical markers in the management of pulmonary hypertension." Swiss Med Wkly **135**(3-4): 43-9. Write to the Help Desk NCBI | NLM | NIH Department of Health & Human Services Privacy Statement | Freedom of Information Act | Disclaimer.

Bailen, M. R., J. A. Cuadra, et al. (2001). "Thrombolysis during cardiopulmonary resuscitation in fulminant pulmonary embolism: a review." Crit Care Med **29**(11): 2211-9.

Barnes, P. J. and S. F. Liu (1995). "Regulation of pulmonary vascular tone." Pharmacol Rev **47**(1): 87-131.

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

Battistini, B. and P. Dussault (1998). "Biosynthesis, distribution and metabolism of endothelins in the pulmonary system." Pulm Pharmacol Ther **11**(2-3): 79-88.

Behrendt, C. E. and R. B. Ruiz (2003). "Venous thromboembolism among patients with advanced lung cancer randomized to prinomastat or placebo, plus chemotherapy." Thromb Haemost **90**(4): 734-7.

Boscoe, M. J., A. T. Goodwin, et al. (2000). "Endothelins and the lung." Int J Biochem Cell Biol **32**(1): 41-62.

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

Broeders, M. A., G. J. Tangelder, et al. (2001). "Endogenous nitric oxide and prostaglandins synergistically counteract thromboembolism in arterioles but not in venules." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(1): 163-9.

Dantzker, D. R., P. D. Wagner, et al. (1978). "Gas exchange after pulmonary thromboembolization in dogs." Circ Res **42**(1): 92-103.

- Dupuis, J., J. F. Jasmin, et al. (2000). "Importance of local production of endothelin-1 and of the ET(B)Receptor in the regulation of pulmonary vascular tone." Pulm Pharmacol Ther **13**(3): 135-40.
- Eagleton, M. J., P. K. Henke, et al. (2002). "Inflammation and intimal hyperplasia associated with experimental pulmonary embolism." J Vasc Surg **36**(3): 581-8.
- Egermayer, P., G. I. Town, et al. (1999). "Role of serotonin in the pathogenesis of acute and chronic pulmonary hypertension." Thorax **54**(2): 161-8.
- Elliot, C. G. (1992). "Pulmonary physiology during pulmonary embolism." Chest **101**: 163S-171S.
- Fernandez-Patron, C., M. W. Radomski, et al. (1999). "Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor." Circ Res **85**(10): 906-11.
- Fernandez-Patron, C., K. G. Stewart, et al. (2000). "Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction." Circ Res **87**(8): 670-6.
- Fernandez-Patron, C., C. Zouki, et al. (2001). "Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1[1-32]." Faseb J **15**(12): 2230-40.
- Fineman, J. R., J. Wong, et al. (1999). "Altered endothelial function in lambs with pulmonary hypertension and acute lung injury." Pediatr Pulmonol **27**(3): 147-56.
- Frisdal, E., V. Gest, et al. (2001). "Gelatinase expression in pulmonary arteries during experimental pulmonary hypertension." Eur Respir J **18**(5): 838-45.
- Galis, Z. S. and J. J. Khatri (2002). "Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly." Circ Res **90**(3): 251-62.
- Goldie, R. G. (1998). "Endothelin receptor subtypes: distribution and function in the lung." Pulm Pharmacol Ther **11**(2-3): 89-95.

Grote, K., I. Flach, et al. (2003). "Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species." Circ Res **92**(11): e80-6.

Hill, L. L. and R. G. Pearl (1999). "Combined inhaled nitric oxide and inhaled prostacyclin during experimental chronic pulmonary hypertension." J Appl Physiol **86**(4): 1160-4.

Jeffery, T. K. and N. W. Morrell (2002). "Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension." Prog Cardiovasc Dis **45**(3): 173-202.

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

Liras, A., R. E. Catalan, et al. (2000). "Synergistic effect of endothelin-1 and serotonin in rabbit platelets. Effect On tyrosine phosphorylation [In Process Citation]." Thromb Res **100**(4): 325-31.

Liu, X., D. Bee, et al. (1999). "Role of nitric oxide synthase and cyclooxygenase in pulmonary vascular control in isolated perfused lungs of ferrets, rats and rabbits." Exp Physiol **84**(5): 907-16.

Lualdi, J. C. and S. Z. Goldhaber (1995). "Right ventricular dysfunction after acute pulmonary embolism: pathophysiologic factors, detection, and therapeutic implications." Am Heart J **130**(6): 1276-82.

Martinez, A., H. R. Oh, et al. (2004). "Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator." Biochem J **383**(Pt. 3): 413-8.

Palei, A. C. T., R. A. G. Zaneti, et al. (2005). "Hemodynamic benefits of matrix metalloproteinase-9 inhibition by doxycycline during experimental acute pulmonary embolism." Angiology **5**: 611-617.

Reeves, J. T. and L. J. Rubin (1998). "The pulmonary circulation: snapshots of progress." Am J Respir Crit Care Med **157**(4 Pt 2): S101-8.

- Rubin, L. J. (2002). "Therapy of pulmonary hypertension: the evolution from vasodilators to antiproliferative agents." Am J Respir Crit Care Med **166**(10): 1308-9.
- Sadosty, A. T., E. T. Boie, et al. (2003). "Pulmonary embolism." Emerg Med Clin North Am **21**(2): 363-84.
- Smulders, Y. M. (2000). "Pathophysiology and treatment of haemodynamic instability in acute pulmonary embolism: the pivotal role of pulmonary vasoconstriction." Cardiovasc Res **48**(1): 23-33.
- Smulders, Y. M. (2001). "Contribution of pulmonary vasoconstriction to haemodynamic instability after acute pulmonary embolism. Implications for treatment?" Neth J Med **58**(6): 241-7.
- Souza-Costa, D. C., T. Zerbini, et al. (2005). "l-Arginine attenuates acute pulmonary embolism-induced oxidative stress and pulmonary hypertension." Nitric Oxide **12**(1): 9-14.
- Souza-Costa, D. C., T. Zerbini, et al. (2005). "L-arginine attenuates acute pulmonary embolism-induced increases in lung matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9." Chest **128**: 3705-3710.
- Stratmann, G. and G. A. Gregory (2003). "Neurogenic and humoral vasoconstriction in acute pulmonary thromboembolism." Anesth Analg **97**: 341-54.
- Sullivan, D. M., J. A. Watts, et al. (2001). "Biventricular cardiac dysfunction after acute massive pulmonary embolism in the rat." J Appl Physiol **90**(5): 1648-56.
- Tanus-Santos, J. E., W. M. Gordo, et al. (2000). "Nonselective endothelin-receptor antagonism attenuates hemodynamic changes after massive pulmonary air embolism in dogs." Chest **118**(1): 175-9.
- Tanus-Santos, J. E., W. M. Gordo, et al. (2000). "The hemodynamic effects of endothelin receptor antagonism during a venous air infusion in dogs." Anesth Analg **90**(1): 102-6.
- Tanus-Santos, J. E., H. Moreno, Jr., et al. (1999). "Inhaled nitric oxide improves hemodynamics during a venous air infusion (VAI) in dogs." Intensive Care Med **25**(9): 983-9.

Tanus-Santos, J. E. and M. J. Theodorakis (2002). "Is there a place for inhaled nitric oxide in the therapy of acute pulmonary embolism ?" Am J Respir Med **1**: 167-176.

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

Vieillard-Baron, A., E. Frisdal, et al. (2000). "Inhibition of matrix metalloproteinases by lung TIMP-1 gene transfer or doxycycline aggravates pulmonary hypertension in rats." Circ Res **87**(5): 418-25.

Voelkel, N. F. and R. M. Tuder (2000). "Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease?" J Clin Invest **106**(6): 733-8.

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

Wood, K. E. (2002). "Major pulmonary embolism: review of a pathophysiologic approach to the golden hour of hemodynamically significant pulmonary embolism." Chest **121**(3): 877-905.