

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE RAPAMICINA  
SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR DE  
CAMUNDONGOS ATEROSCLERÓTICOS

Adriana Lários Nóbrega Gadioli

Mestrado em Ciências Fisiológicas  
Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória – ES  
2007

Adriana Lários Nóbrega Gadioli

Efeito da Administração Oral de Rapamicina Sobre a  
Reatividade Vascular de Camundongos Ateroscleróticos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do  
Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do  
grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez

Co-Orientador: Dr. José Airton Arruda

Vitória

2007

Ficha catalográfica  
Bibliotecária responsável: Janine Silva Figueira CRB12-429

---

G124e Gadioli, Adriana Lários Nóbrega, 1975-  
Efeito da administração oral de Rapamicina sobre a reatividade vascular de camundongos ateroscleróticos / Adriana Lários Nóbrega Gadioli. – 2007.  
49 f. : il.

Orientador: Elisardo Corral Vasquez.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Biomédico.

1. Aterosclerose. 2. Rapamicina. 3. Função endotelial. 4. Reatividade vascular. 5. Camundongo ApoE Knockout. I. Vasquez, Elisardo Corral. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Biomédico. III. Título.

CDU: 616.13-004.6

---

Adriana Lários Nóbrega Gadioli

Efeito da Administração Oral de Rapamicina Sobre a  
Reatividade Vascular de Camundongos Ateroscleróticos

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Dr. José Airton Arruda – Co-orientador - UFES

---

Dra. Nazaré Souza Bissoli - Examinador - UFES

---

Dr. Elisardo Corral Vasquez – Orientador - UFES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, novembro de 2007

*A Deus e a Nossa Senhora da  
Aparecida  
Por estarem ao meu lado em  
todos os momentos*

## **A minha família**

**Ao meu esposo Jorge pela paciência, apoio, incentivo, dedicação e carinho em todos os momentos**

**A nossa pequena Lívia pelo tempo de ausência da mamãe.**

**A minha querida mãe Beth por ter dividido comigo os momentos de ansiedade, dificuldade, alegria e por vibrar a cada conquista na minha vida.**

**A minha avó Lourdes por sempre me colocar em suas orações.**

**Ao meu pai Ernesto e ao meu irmão Neto pelo incentivo e carinho.**

### **Agradecimentos Especiais**

**Ao Professor Vasquez,**

**Tenho orgulho de ser sua aluna, agradeço pela oportunidade de compartilhar um pouco de sua sabedoria.**

**À Silvana Meyrelles,**

**Que me direcionou nessa caminhada, agradeço pela amizade, pelas contribuições e sugestões.**

**Ao Dr. Airton Arruda**

**Agradeço pelo grande aprendizado que pude obter da através sua imensa capacidade e também por toda ajuda.**

## **AGRADECIMENTOS**

A todos os amigos do LTCC: Ágata, Verônica, Thiago, Isabelle, Raquel, Clarissa, Bianca, Camile, Maíne, João Paulo, Flávia, Fernanda, Bernadete, Geovana, Liz e Lídia, pela ajuda e companheirismo.

A Robéria, Raquel e Breno que contribuíram muito durante a confecção desse estudo.

A professora Do Carmo e seus alunos Vitor e Anny do departamento de Biologia pela disposição na coleta das peças.

A enfermeira Ana Paula da INTERCATH pela ajuda e paciência para conseguir o medicamento assim como a Secretaria de Saúde do Estado do Espírito Santo.

Aos colegas, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

### **Lista de Figuras e Tabelas**

**Tabela 1-** Concentração de colesterol plasmático grupos de camundongos ApoE tratado e controle não tratado.

**Tabela 2-** Tamanho da lesão aterosclerótica nos grupos de camundongos ApoE-/- tratados e controle não tratado.

**Figura 1-** Fotografia do sistema de perfusão sob pressão controlada. No alto vemos em maior detalhe o frasco de Mariotti.

**Figura 2-** Representação esquemática dos protocolos para as Curvas Concentração Efeito à NE, à ACh e ao NPS.

**Figura 3-** Representa as curvas concentração efeito à NE no leito arteriolar mesentérico.

**Figura 4-** Representa as curvas concentração efeito à ACh no leito arteriolar mesentérico.

**Figura 5-** Representa as curvas concentração efeito ao NPS.

**Figura 6-** Na figura demonstra cortes histológicos típicos da aorta ascendente de camundongos ApoE tratados com rapamicina e controle corados com *Oil-Red-O*.

### Lista de Abreviaturas

ANOVA Análise de variância

ACh - Acetilcolina

ApoE<sup>-/-</sup> -Camundongo knockout para a ApoE

ApoE- Apolipoproteína E

CCE - Curva concentração efeito

CDKi- inibidores da quinase dependente da ciclina

CDKs- quinases dependentes de ciclina

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

COBEA- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CML - Células musculares lisas vasculares

DNA - Ácido desoxorribonucleico

EDTA- Ácido Etileno diamino tetracético

EDRF - Fator relaxante derivado do endotélio

EDHF- Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EMESCAM - Escola Superior de Ciências da Saúde da Santa Casa de Misericórdia  
de Vitória

EPM- Erro Padrão da Média

FDA - “Food and Drug Administration”

g- Grama

HDL - Lipoproteínas de alta densidade

HE- Hematoxilina e Eosina

ICAM - Moléculas de adesão intracelular

IL2 - Interleucina 2

IL4 - Interleucina 4

IL8 - Interleucina 8

I.m - Intra muscular

i.p.-Intraperitoneal

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade

MCP-1 - Proteínas quimioatraentes de monócitos

MEC – matriz extracelular

ml - Mililitro(s)

mmHg - Milímetros de mercúrio

mTOR - “mamalian target of rapamycin”

NE - Norepinefrina

NO - Óxido nítrico

NPS - Nitroprussiato de sódio

NS - Não significativo

p27- inibidor de quinases dependentes de ciclina

P70S6 - Proteína quinase ribossômica P70S6

PAC – Paclitaxel

µm- Micrômetro

PGI<sub>2</sub> - Prostaciclina

pRb - Proteína retinoblastoma

TNF-α- Fator de Necrose Tumoral alfa

USIC - Ultra-som intracoronário

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

VCAM - Moléculas de adesão celular vascular

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

V.O - Via oral

## SUMÁRIO

Dedicatória	
Agradecimentos	
Lista de Figuras e Tabelas.....	12
Lista de Abreviações.....	12
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aterosclerose.....	1
1.2. Rapamicina.....	3
1.3. Mecanismo de Ação.....	3
1.4. Stent.....	7
1.5. Reestenose.....	8
1.6. Reestenose e Inflamação.....	9
1.7. Reestenose e Rapamicina- Estudos Experimentais.....	9
1.8. Reestenose e Rapamicina- Estudos Clínicos.....	11
1.9. Endotélio e o Tônus Vascular.....	13
1.10. Endotélio, Aterosclerose e Reatividade Vascular.....	14
1.11. Endotélio e a Reestenose Pós-Angioplastia Coronária.....	15
1.12. Modelo Experimental- Camundongo ApoE-/-.....	17
2. OBJETIVO.....	18

2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivo Específico .....	19
3. MATERIAIS e MÉTODOS.....	19
3.1. Animais.....	19
3.2. Administração da Rapamicina.....	19
3.3. Grupos Experimentais.....	20
3.4. Preparação do Animal.....	20
3.5. Análise Histoquímica.....	20
3.6. Análise Morfométrica.....	23
3.7. Medida do Colesterol Plasmático.....	23
3.8. Preparação do Leito Arteriolar Mesentérico.....	24
3.9. Protocolo de Reatividade Vascular.....	25
3.9.1. Protocolo 1.....	22
3.9.2. Protocolo 2.....	22
3.9.3. Protocolo 3.....	25
3.10. Avaliação das Alterações de Sensibilidade.....	27
3.11. Avaliação das Alterações de Resposta Máxima .....	27
3.12. Drogas Utilizadas.....	27
3.13. Análise Estatística.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Colesterol Plasmático.....	28
4.2. Reatividade Vascular.....	29
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÃO.....	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

## RESUMO

A reestenose pós angioplastia coronária tem sido controlada pelo uso de stents recobertos com rapamicina. Contudo relatos distintos sugerem que a rapamicina possa ter efeitos deletérios sobre a função endotelial. Nós avaliamos *in vitro*, os efeitos da administração oral de rapamicina sobre a função endotelial de camundongos knockout para a apolipoproteína E com 8 semanas de idade. Foram avaliadas através do estudo da reatividade vascular do leito mesentérico as respostas contráteis à norepinefrina (NE) e relaxantes à acetilcolina (ACH) e ao nitroprussiato de sódio (NPS) após 12 semanas de administração de rapamicina (5mg/kg/dia). A rapamicina não modificou de forma significativa as respostas contráteis a NE no grupo tratado ( $116 \pm 3,7\%$ , n=10; p=NS) ou no grupo controle ( $114 \pm 14\%$ , n=0,9; p=NS). A reatividade vascular para a ACh não foi alterada na resposta de relaxamento, grupo tratado ( $49 \pm 5\%$ , n=10; p=NS) grupo controle ( $53 \pm 4,4\%$ , n=09; p=NS). O relaxamento vascular máximo induzido pelo NPS entre os grupos não foi significativo, apresentando no grupo tratado ( $74 \pm 5\%$ , n=10; p=NS) e no controle ( $74 \pm 6\%$ , n=0,9; p=NS). O tratamento com a rapamicina resultou em aumento do colesterol plasmático no grupo tratado ( $941 \pm 63$  mg/dL, n = 12; p= < 0, 05) comparado ao grupo controle ( $721 \pm 49$  mg/dL, n = 7; p= < 0, 05). A área de placa aterosclerótica na aorta no grupo tratado com a rapamicina foi significativamente menor quando comparado ao grupo controle ( $6.946 \pm 2.276$  vs.  $46.156 \pm 13.028$   $\mu\text{m}^2$ , N=2; p<0, 01). A administração oral de rapamicina na dose de 5mg/kg não apresentou efeito deleterioso sobre o tônus vascular no leito arteriolar mesentérico em camundongos ApoE.

## ABSTRACT

Post-coronary angioplasty restenosis has been controlled through the use of rapamycin eluting stents. However, different reports suggest that rapamycin may have deleterious effects on endothelial function. We evaluated in vitro the effects of oral administration of rapamycin on endothelial function in mesenteric arteriolar bed of eight weeks old apolipoprotein E Knockout mice. Contractility to norepinephrine (NE) and relaxation to acetylcholine (ACh) or sodium nitropusside (SN) were evaluated twelve weeks after administration rapamycin (5mg/kg/day). In mesenteric arteriolar bed, rapamycin did not change the vascular contractility to NE in the rapamycin group ( $116 \pm 3$ , 7%, n=10; p=NS) compared to the control group ( $114 \pm 14$ %, n=0,9; p=NS). The relaxant vascular reactivity to ACh was similar in rapamycin group ( $49 \pm 5$ %, n=10; p=NS) and control group ( $53 \pm 4$ , 4%, n=0,9; p=NS). The maximum vascular relaxation induced by SN, was similar rapamycin group ( $74 \pm 5$ %, n=10; p=NS) and in the control group ( $74 \pm 6$ %, n=09; p=NS). Rapamycin treatment was associated with an increased plasma total cholesterol in the rapamycin group ( $941 \pm 63$  mg/dL, n = 12; p= < 0, 05) compared with the control group ( $721 \pm 49$  mg/dL, n = 7; p= < 0, 05). The aortic plaque area in mice fed with oral rapamycin was significantly decreased when compared to control group ( $6.946 \pm 2.276$  vs.  $46.156 \pm 13.028$   $\mu\text{m}^2$ , N=2; p<0, 01). The administration of high concentrations of RP (5mg/kg) does not modify ApoE mouse mesenteric arteriolar tone.

## **INTRODUÇÃO**

### **1.1. Aterosclerose**

A aterosclerose é conseqüência da resposta da parede arterial a agentes agressores e se constitui em um processo proliferativo e inflamatório com deposição de lipídeos, presença de macrófagos, monócitos, linfócitos e outras células nas diferentes fases da formação e evolução da placa aterosclerótica (LIBBY, 2002). As lesões iniciais localizam-se onde o fluxo sanguíneo está alterado, o que interfere nas características fisiológicas do endotélio, levando a uma redução da produção do óxido nítrico (NO) deixando-o disfuncionante (QUYYUMI, 1998).

A disfunção endotelial favorece o acúmulo e a penetração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na camada íntima arterial, a migração de monócitos e linfócitos T para região subendotelial, a oxidação de LDL, a formação de células espumosas, a migração e proliferação de células musculares lisas vasculares (CML) para o espaço subendotelial e síntese de matriz extracelular (MEC), lesão estrutural do endotélio com adesão, agregação plaquetária e formação de trombos (ROSS, 1999).

Os fatores de risco, como hipercolesterolemia, hiperglicemia, radicais livres liberados pelo cigarro, hipertensão, diabetes mellitus e alterações genéticas podem provocar um processo inflamatório crônico vascular alterando a função endotelial com conseqüente perda das funções vasodilatadoras e anti-trombóticas dependentes do endotélio e exacerbação das propriedades vasoconstrictoras e pró-trombóticas facilitando a deposição de leucócitos sobre o endotélio. Os leucócitos penetram no espaço subendotelial, mediados pelas moléculas de adesão como as VCAM (moléculas de adesão celular vascular) e ICAM (moléculas de adesão intracelular) (LIBBY, 2002; ROSS, 1999; SAIKKU, 1988).

A migração dos leucócitos envolve a ação de moléculas protéicas conhecidas como citocinas quimioatrativas que recrutam células mononucleares características do ateroma precoce. Uma dessas moléculas é a proteína -1 (MCP-1) quimioatrativa de monócitos, que é produzida pelo endotélio em resposta ao LDL oxidado. (LUSTER, 1998; GU *et al.*, 1998). O monócito recrutado para a íntima arterial pode absorver lipídios, transformando-se em uma célula espumosa ou em um macrófago cheio de lipídios, que se alojam na íntima como células espumosas, muitas vezes replicando. (MILLER *et al.*, 2003).

Os macrófagos recrutados servem de reservatório para o excesso de lipídios e na lesão aterósclerótica estabelecida são fonte de mediadores pró-inflamatórios como as citocinas e quimiocinas. Também podem elaborar espécies de oxidantes, como os ânions superóxidos, de maneira que esse conjunto de mediadores inflamatórios pode contribuir para progressão da lesão. (GENG, 2002; LIBBY, 2002).

Os linfócitos T presentes no ateroma são produtores de interfeirón- $\gamma$ , citocinas pró-inflamatórias e aterogênicas, que ativam macrófagos e influenciam a proliferação de células musculares lisas que constituem os primeiros elementos anatômicos da aterosclerose, também conhecidos como estria gordurosa, sendo a placa aterosclerótica formada pelo conjunto de células inflamatórias e depósito de lipídios recobertos por células musculares lisas e tecido conjuntivo (HANSSON, 2005).

## 1.2. Rapamicina

A rapamicina é um antibiótico macrolídeo, produto da fermentação natural do *Streptomyces higroscopicus*. Foi descoberto a partir de uma amostra na Ilha de Páscoa por uma expedição canadense de pesquisa médica em 1964. (SEHGAL, 1998; VEZINA *et al.*, 1975). A rapamicina foi aprovada pela Food Drug Administration em 1999, para utilização, no tratamento profilático da rejeição em transplante renal, por possuir características citostáticas que interferem no ciclo celular (NEBEQUER *et al.*, 2006).

Seu espectro de indicações terapêuticas vem sendo ampliado. Como demonstrado em vários modelos experimentais e estudos clínicos, com sua liberação programada por meio de stents revestidos, constitui uma terapia promissora na profilaxia e tratamento da reestenose coronária intra-stent (MARX *et al.*, 1995).

## 1.3. Mecanismo de Ação

O ciclo celular nos mamíferos é dividido em 4 fases: G1, S (fase de síntese de ácido desoxirribonucléico-DNA), G2 e M (mitose). As células, quando quiescentes, permanecem numa fase denominada G0, até que sofram ação de um estímulo mitogênico apropriado. A fase G1 é a fase em que são reunidos os fatores de crescimento necessários para a replicação do DNA para a fase S (SEHGAL, 1998). Após a replicação do DNA ser completada, a célula entra em outra fase denominada G2 em preparação para M. A progressão através do ciclo celular requer a ativação das quinases dependentes de ciclina (CDKs), as quais formam holoenzimas com as suas subunidades, as ciclinas. A atividade dos complexos ciclina/CDK depende do estado de fosforilação das CDK e do nível de expressão das ciclinas. A

especificidade dos complexos ciclinas D/CDK4, D/CDK6 e E/CDK2, em cooperação com o antígeno nuclear da célula proliferante coordenam a replicação do DNA por regularem a transição por meio das fases G1 e S. As fases subsequentes, G2 e M, são reguladas pelos complexos ciclina A/CDK2 e ciclina B/CDK1. A progressão do ciclo celular é regulada pelos inibidores da quinase dependente da ciclina (CDKi), os quais se ligam às CDKs e impedem a sua ativação, como as proteínas Kip/Cip (p21Cip1, p27Kip1 e a p57Kip 2), que se ligam às subunidades de ciclina e CDK e inibem as quinases dependentes das ciclinas E e A, sendo o ciclo celular controlado pelos complexos ciclina /CDK, e modulado pelos fatores de transcrição que ativam CDK e CDKi (BORNFELDT, 2003; DIEZ-JUAN & ANDRES, 2003; DZAU *et al.*, 2002 e POLYAK *et al.*, 1994).

A iniciação do ciclo celular ocorre quando uma célula quiescente na fase G0 sofre um estímulo mitogênico, induzindo a expressão da ciclina D que se liga a CDK4 e CDK6 promovendo sua entrada no núcleo. O complexo ciclina D/CDK ativa, fosforila a proteína retinoblastoma (Rb). A proteína Rb sofre fosforilação em local adicional pela ciclina E/CDK2, levando à ruptura da ligação entre a proteína Rb com o fator de transcrição E2F, que, ao ser liberado, é ativado e atua na transcrição dos genes necessários para síntese do DNA (BORNFELDT, 2003; DIEZ-JUAN & ANDRES, 2003; DZAU *et al.*, 2002 e POLYAK *et al.*, 1994).

A ativação das células T compreende duas fases principais. A primeira resulta na ativação transcripcional dos genes das citocinas e progressão do estado de quiescência G0 para um estágio competente G1. A segunda fase envolve a resposta das células T, isto é, a secreção de interleucinas promotoras de crescimento, tais como interleucina 2 (IL2) e interleucina 4 (IL4) em uma forma autócrina ou parácrina e também a entrada da célula T competente para o ciclo da proliferação via

progressão da fase G1 para a fase S, com a subsequente expansão clonal e a aquisição das funções efetoras (MORELON *et al.*, 2001; SEHGAL, 1998).

A rapamicina interfere na transição de G1 para S do ciclo celular, interrompendo o sinal do receptor de IL2 e dos receptores de outras citocinas e fatores de crescimento. Essa interferência é dada pelo bloqueio da via de transdução exigida para a progressão das células T da fase G1 para S, dessa forma suprimindo a proliferação das células T guiadas por interleucinas (MORELON *et al.*, 2001).

Segundo SEHGAL (1998) a rapamicina se liga a receptores intracelulares denominados imunofilinas que são proteínas que se ligam a agentes imunossupressores. As imunofilinas de ligação (FKBP) se ligam a rapamicina formando o complexo rapa-FKBP12, que inibe a “mammalian target of rapamycin” (mTOR), e aumenta a expressão do inibidor da quinase de ciclina p27, levando a inibição da progressão do ciclo celular da fase G1 para S. (MARX *et al.*, 1995; STEPKOWSKI *et al.*, 1996; MANCINI *et al.*, 2003). Essa ação causa desfosforilação e inativação da proteína quinase ribossomal 6S de 70 KDa (p70S6K) a qual, quando ativada, estimula a produção de componentes ribossomais necessários para a síntese protéica e progressão do ciclo celular. Essa atividade bloqueia a estimulação da IL2 na divisão dos linfócitos. (GUBA *et al.*, 2002).

O bloqueio da mTOR deprime a resposta do linfócito ao sinal co-estimulatório durante a transição da fase G0 para G1. Durante a fase G1, o bloqueio do sinal pela RP inibe as vias de sinalização dirigida para a degradação da p27, levando à ativação da ciclina e a estimulação da quinase e proteína ribossomal p70S6, um passo necessário para a síntese de proteínas estruturais. (KAHAN e CONARDO, 2001).

O tratamento com a rapamicina diminui a atividade da quinase dos complexos CDK4/ciclina D e CDK2/ciclina E, que estão envolvidas na dissociação ou eliminação dos inibidores de quinase dependente de ciclina p27 nas células T ativadas. O p27 tem implicação no bloqueio em G1 por inibir o complexo CDK4/ ciclina D e CDK2/ ciclina E.

A rapamicina inibe a proliferação das células T, induzida por antígenos, lectinas mitogênicas, aloantígenos; bloqueia a expansão clonal das células T citotóxicas e “helper”, induzidas por aloantígenos; inibe a produção de anticorpos, induzida pelo estímulo mitogênico, IL1, IL2, IL3, IL4, IL6, fator de crescimento derivado das plaquetas; inibe a proliferação dos linfócitos pelo bloqueio das vias de transdução dos sinais mediados pela IL2 (SEHGAL, 1998; MARX e MARKS, 2001).

#### 1.4. Stents

O stent é uma endoprótese coronária feita de aço inoxidável e que funciona para manter a arquitetura do vaso após o procedimento com o balão. Com a introdução dos stents coronários a ocorrência de reestenose diminuiu significativamente e aumentou a sobrevida livre de eventos, como demonstrado em grandes estudos clínicos, como STRESS (FISCHMAN *et al.*, 1994) e BENESTENT-I (SERRUYS *et al.*, 1994).

Os stents previnem o recolhimento elástico e o remodelamento negativo do vaso, mas não eliminam o trombo mural, resposta inflamatória, migração de células musculares lisas e formação da matriz extracelular, fatores que contribuem para hiperplasia neointimal, responsável pela reestenose intra-stent e recorrência da isquemia (SERRUYS *et al.*, 1994).

A idéia da implantação coronária de stents com eluição de medicamentos surgiu em 1995. Nesse caso o stent é utilizado como veículo de liberação gradual da droga. Pelo fato de estar em íntimo contato com a parede do vaso permite a liberação local do fármaco “prevenindo” a reestenose (SERRUYS *et al.*, 1998). Stents eluídos com fármacos vem sendo propostos como uma alternativa para diminuir a hiperplasia intimal, sendo necessária a interligação com polímeros biocompatíveis que possam servir com locais de liberação da droga.

### 1.5. Reestenose

Diferente da aterosclerose, a reestenose surge geralmente em decorrência do traumatismo na parede arterial induzido pelo balão ou outros dispositivos, seguido por reação inflamatória, proliferativa e migratória. Quando induzida por balão, os mecanismos predominantes são: o recolhimento elástico e o remodelamento negativo. Por outro lado, nas angioplastias realizadas pelo implante de próteses, o mecanismo responsável pela reestenose é a hiperplasia intimal, não ocorrendo a participação do recolhimento elástico nem do remodelamento negativo, que são contidos pela utilização da prótese. O remodelamento negativo é um fenômeno de ocorrência tardia, decorrente de resposta cicatricial ao trauma, observado após angioplastia por balão. O outro mecanismo relacionado à reestenose, quando se utiliza o balão é o recolhimento elástico, o qual ocorre precocemente após a angioplastia, e é geralmente observado nos primeiros minutos subsequentes a desinsuflação do balão, devido a resistência imposta pela parede do vaso em oposição ao estiramento provocado pelo balão. Um terceiro mecanismo de perda luminal é a hiperplasia neo-intimal, a qual ocorre de modo mais tardio e é mais pronunciada após angioplastia com implante de próteses intraluminal (stent) .

Conforme HARKER (1987) a patogênese da formação do trombo e da reestenose após o trauma pelo balão se faz pela complexa interação entre os constituintes do sangue (plaquetas e monócitos/macrófagos) e da parede vascular (células endoteliais e as CML).

### **1.6. Reestenose e Inflamação**

A inflamação é uma consequência inicial do procedimento da angioplastia, em decorrência do trauma vascular, resultando na exposição de uma superfície trombogênica. Segundo KORNOSWSKI *et al* (1998) a resposta inflamatória ocasionada por balão e pelo implante do stent foi demonstrada por meio do infiltrado inflamatório ao redor das hastes dos stents 4 semanas após a injúria em coronárias de porcos. KARAS *et al* (1992) demonstraram a estreita relação entre reação inflamatória e a injúria arterial precipitada pela insuflação agressiva do balão, seguida do implante de stent, com o grau de formação neo-intimal, observada após 30 dias em modelos experimentais utilizando porcos. Espécimes de tecidos recuperados por meio da aterectomia direcional de artérias periféricas humanas com reestenose intra-stent demonstraram que a reestenose intra-stent resulta da hiperplasia das CML (KEARNEY *et al.*, 1998).

### **1.7. Reestenose e Rapamicina - Estudos Experimentais**

Marx *et al.* demonstraram que, em células musculares lisas vasculares (CML) de aorta de ratos e de humanos, que a rapamicina na concentração de 100ng/ml, impediu a fosforilação da proteína Rb, que é um regulador para a progressão do ciclo celular, inibindo a proliferação das células musculares lisas. O autor sugeriu que a rapamicina pode ser útil na redução ou bloqueio de um componente da reestenose pós angioplastia, que é a proliferação das CML (MARX & MARKS, 2001).

Sun *et al.* Demonstraram que a rapamicina inibiu a migração de CML de camundongos por inibição de dependente e independente da p27 Kip1 e sugeriu que drogas que aumentem os níveis de p27 Kip1 podem ter efeito positivo sobre a reestenose (SUN *et al.*, 2001).

Morris *et al.* (1995) administraram em ratos a rapamicina, na dose de 1,5mg/kg/dia i.p (intraperitoneal), três dias antes dos animais serem submetidos a lesão por cateter balão na carótida e mantida por 13 dias após o procedimento e observaram um menor espessamento intimal na análise das aortas removidas após 44 dias do procedimento. Os autores sugerem que a rapamicina pode contribuir para o controle do estreitamento pós-angioplastia com balão. GREGORY *et al.* (1993) utilizaram o mesmo método de lesão vascular por cateter balão em carótidas de ratos tratados com a rapamicina na dose de 1,5 mg/kg/dia i.p por 13 dias, iniciando a droga no dia da lesão e demonstraram uma redução do espessamento intimal em aproximadamente 45%, além de reduzir a infiltração de macrófagos. Portanto, a rapamicina inibiu o espessamento intimal causado pela injúria vascular mecânica.

Em porcos submetidos à angioplastia coronária, GALLO *et al.* (1999) observou-se que, no grupo que fez uso da rapamicina na dose de 0,5 mg/kg/dia intramuscular, iniciado três dias antes do procedimento, houve estenose luminal significativamente menor após quatro semanas. Esse efeito foi atribuído à diminuição da hiperplasia das CML à injúria coronária, causada pela diminuição da fosforilação da pRb e por aumentar a proteína inibitória p27, que causam um bloqueio celular na fase G1-S. Com o mesmo modelo de intervenção, ROQUE *et al.* (2000). investigaram em porcos tratados com rapamicina o tempo de expressão do p27 e do Ki67, um marcador de proliferação celular presente em todas as fases do ciclo celular, e o grau de apoptose. Foi notado aumento gradual da expressão do p27 entre o 7º e o 28º dias após a injúria vascular, enquanto o Ki67 atingiu sua expressão máxima entre o 7º e o 14º dia após a angioplastia. No 28º dia após a angioplastia, a rapamicina reduziu o índice proliferativo do Ki67 e aumentou a apoptose celular sem efeito significativo nos níveis p27. Essas constatações seriam

úteis na elaboração do stent revestido, principalmente na programação do tempo de liberação droga pelo polímero na parede do vaso.

### **1.8. Reestenose e Rapamicina – Estudos Clínicos**

O estudo FIM, pioneiro de SOUSA *et al.* (2000) foi o primeiro a testar a eficácia e a segurança da rapamicina liberada diretamente no local de injúria vascular em humanos e demonstraram angiograficamente e por meio de USIV a ausência de proliferação neointimal no seguimento de quatro meses. No seguimento de doze meses desses mesmos pacientes e de outros 15 pacientes com seguimento de seis meses, observou-se a manutenção da supressão da proliferação neointimal.

O estudo RAVEL foi o primeiro estudo multicêntrico, duplo-cego, randomizado, que avaliou a segurança e a efetividade do stent revestido de rapamicina em comparação com o similar não-revestido. Entre agosto e dezembro de 2000, foram incluídos 238 pacientes de 19 centros da Europa e América Latina (Brasil e México) e demonstrou a superioridade na redução da reestenose dos stents eluidores de rapamicina sobre os stents convencionais (MORICE *et al.*, 1992). Os seguimentos de três anos dos pacientes que integraram este estudo confirmaram o benefício da utilização dos stents liberadores de rapamicina sobre os stents convencionais (FAJADET *et al.*, 2005).

O estudo ISR testou a segurança e eficácia da rapamicina no tratamento de reestenose intra-stent. Foram recrutados 41 pacientes e foi avaliada a incidência de eventos cardiovasculares maiores em 30 dias, quatro meses e um ano após a intervenção, com análise angiográfica quantitativa e ultra-sonográfica do grau de hiperplasia intimal. No seguimento de quatro meses, não foram relatados eventos cardiovasculares maiores ou casos de reestenose na análise angiográfica ou ultra-

som e os resultados de acompanhamento clínico em um ano confirmam os mesmos achados (SOUSA *et al.*, 2003; ARRUDA *et al.*, 2006).

O estudo SIRIUS canadense e europeu, multicêntrico, randomizado e duplo-cego, testou o stent revestido com rapamicina em artérias coronárias humanas e confirmou a superioridade do grupo tratado com stent liberador rapamicina em comparação com o grupo controle, em relação ao objetivo primário, que foi avaliar o diâmetro luminal mínimo no seguimento de oito meses e, em relação os objetivos secundários, reestenose angiográfica aos oito meses, revascularização da lesão alvo e eventos cardíacos maiores no seguimento de 270 dias (SCHAMPAERT *et al.*, 2004; SCHOFER *et al.*, 2003).

Eventos adversos, como a trombose subaguda, as reações de hipersensibilidade e a trombose tardia em pacientes submetidos aos stents liberadores de rapamicina fizeram com que a eficiência das agências reguladoras fosse questionada (MUNI *et al.*, 2004).

O FDA após ter recebido de 290 relatos de reações de hipersensibilidade e trombose subaguda (<30 dias), emitiu notificação alertando a classe médica, enfatizando a importância na obediência às indicações segundo o fabricante e cuidados com a técnica, durante e no pós-implante de stents (NEBEQUER *et al.*, 2006).

Numa revisão envolvendo 5.783 pacientes que receberam stents liberadores de rapamicina e ou paclitaxel, os relatos do FDA e os achados de autópsia sugeriram que os stents que liberam de rapamicina ou paclitaxel podem ser causa de uma reação de hipersensibilidade intra-stent e sistêmica, que, em alguns casos, pode estar associada à trombose tardia e ao óbito (NEBEQUER *et al.*, 2006).

### 1.9. Endotélio e o Tônus Vasomotor

O endotélio é considerado um órgão que exerce inúmeras funções metabólicas, participando da regulação do tônus vascular. Essa regulação utiliza diferentes mecanismos como metabólicos, miogênicos e neuroendócrinos, que participam da adesão e agregação plaquetária, na homeostase entre endotélio e células inflamatórias e no controle do tônus vascular atuando de modo direto na musculatura lisa (QUYYUMI, 1998).

Os mecanismos reguladores locais do tônus vascular mediados pelo endotélio têm recebido atenção especial sendo o óxido nítrico (NO) o mais importante dos fatores relaxantes dependentes do endotélio, o qual atua através do aumento da guanilato ciclase solúvel promovendo o relaxamento da musculatura vascular lisa (CINES *et al.*, 1998).

A prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), assim como o NO, é outro fator relaxante derivado do endotélio, o qual relaxa a musculatura lisa vascular e inibe a agregação plaquetária através da ativação da adenilato-ciclase. Contamos também com o EDHF (fator hiperpolarizante derivado do endotélio) que possui identidade ainda desconhecida, mas sabe-se que o EDHF atua hiperpolarizando a musculatura lisa através do aumento da condutância ao íon potássio (GAUTHIER *et al.*, 1995). Entretanto, se o endotélio é funcionalmente lesado, ocorre alteração da liberação de PGI<sub>2</sub> e NO, favorecendo a agregação e adesão plaquetárias, além de ação dos vasoconstritores como tromboxano-A<sub>2</sub>, prostaciclina (PGF<sub>2</sub>α e PGH<sub>2</sub>), diretamente na musculatura lisa vascular. O resultado desse processo é uma tendência crescente de aumento do tônus vascular (MONCADA *et al.*, 1976). Furchgott e Zawadisk (1980) descreveram uma substância capaz de relaxar anéis de aorta de coelho pré-contraído por norepinefrina que posteriormente foi identificado como sendo óxido nítrico (NO).

### **1.10. Endotélio, Aterosclerose e Reatividade vascular.**

A aterosclerose é um processo caracterizado por resposta inflamatória e fibroproliferativa da parede arterial causada por agressões da superfície arterial (GAUTHIER *et al.*, 1995). Fatores de risco como a hipercolesterolemia, tabagismo, diabetes melito, hipertensão arterial e suscetibilidade genética prejudicam a função endotelial alterando suas propriedades homeostáticas tornando-o propício para o desenvolvimento da aterosclerose (BONNETTI *et al.*, 2003, BUSSE e FLEMING, 1995).

As células endoteliais através das suas funções fisiológicas proporcionam que a superfície do vaso permaneça não-trombogênica e não-aderente para plaquetas e leucócitos, atuando na manutenção do tônus vascular por meio da liberação de moléculas como NO, PGI<sub>2</sub> e endotelina, produzindo e secretando fatores de crescimento e citocinas e mantendo a integridade da membrana basal rica em colágenos e proteoglicanos na qual estão apoiadas. Alterações em algumas dessas funções podem dar início a disfunção endotelial desencadeando interações celulares com monócitos, plaquetas, células musculares lisas, podendo levar a formação da placa de aterosclerose (ROSS, 1993). TANNER *et al.* (1991) demonstraram redução da capacidade de relaxamento arterial ao expor artérias isoladas de porcos, a ação aguda da fração LDL oxidada.

Outro fator envolvido na redução do relaxamento arterial na aterosclerose pode ser dependente da produção aumentada de radicais livres nos vasos acometidos (OHARA *et al.* 1993). Sabe-se que o ânion superóxido pode ser responsável pela inativação do fator de relaxamento dependente do endotélio. MUGGE *et al.*(1991) verificaram que o tratamento de coelhos hipercolesterolêmicos com a enzima superóxido dismutase, enzima inativadora de ânion superóxido,

restaurou parcialmente o relaxamento arterial dependente do endotélio, achados que sugerem a inativação do NO causada por radicais livres que é em parte responsável pela diminuição da capacidade de vasodilatação dependente de endotélio na aterosclerose.

Estudos experimentais demonstraram que receptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ -adrenérgicos nas células musculares lisas são mediadores da vasoconstrição e receptores  $\beta$ -adrenérgicos, da vasodilatação. As células endoteliais, na vigência de integridade anatômica e funcional, modulam o efeito vasoconstritor das catecolaminas por meio de diversos mecanismos como a liberação de EDRF (COCKS & ANGUS, 1983) subsequente a estimulação de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, limitando os efeitos constritores da norepinefrina; captura e degradação de catecolaminas; e inibição da liberação de norepinefrina pelas terminações nervosas simpáticas (TODA, 1986; COCKS & ANGUS, 1983; COHEN & WEISBROD, 1998).

### **1.11. O Endotélio e a Reestenose Pós-Angioplastia Coronária.**

O endotélio possui papel ativo em importantes processos biológicos como a hemostasia e o controle do tônus vasomotor. Uma das funções primordiais do endotélio é a manutenção da integridade estrutural da vasculatura. A lesão celular, ou qualquer outro evento que perturbe a integridade das células endoteliais, pode estar envolvido nos eventos iniciais de uma série de doenças, entre as quais está incluída a aterosclerose e a reestenose pós-angioplastia.

A angioplastia coronária representa uma situação extrema, em que a lesão mecânica da parede do vaso e, especialmente, do endotélio se dá de forma abrupta e intensa, numa situação em que a função endotelial já se encontra comprometida pelo processo aterosclerótico (HARRISON, 1991). Algumas dessas funções do

endotélio, como a regulação da proliferação miointimal e do remodelamento vascular, parecem ser especialmente importantes no desenvolvimento da reestenose.

Em condições basais, as células musculares lisas da camada média apresentam pouca ou nenhuma atividade proliferativa. Evidências experimentais sugerem que o endotélio, quando intacto tanto funcional quanto anatomicamente, desempenha papel inibidor sobre a proliferação de células musculares lisas. A área de proliferação celular tende a ser maior em regiões onde o endotélio foi removido e a reendotelização de uma área previamente desnuda mecanicamente bloqueia a proliferação miointimal (IP *et al.*, 1990). Estudos necroscópicos realizados em pacientes que faleceram tardiamente após terem sido submetidos à angioplastia coronária, foram publicados na literatura e demonstraram que a lesão reestenótica era constituída de hiperplasia de células musculares lisas sobre a matriz constituída de tecido conectivo frouxo e que a hiperplasia miointimal estava presente em todos os espécimes, independente do fato de o paciente apresentar reestenose ou não (SAFIAN *et al.*, 1990; GARRATT *et al.*, 1991).

### **1.12. Modelo Experimental-Camundongo ApoE-/-**

Os camundongos homozigóticos *Knockout* para a apolipoproteína E (ApoE) foram desenvolvidos por PIEDRAHITA *et al* (1992), para aumentar o conhecimento da hipercolesterolemia e aterosclerose humana, que devido sua modificação genética desenvolvem precoce e espontânea hipercolesterolemia apresentando lesões ateroscleróticas extensas sem suplementação da dieta (PIEDRAHITA *et al* ., 1992).

ApoE é mediadora das ligações com receptor que carrega várias classes de lipoproteínas de baixa densidade como a LDL. Estudos histopatológicos mostram a presença de células espumosas desde a oitava semana de idade progredindo para lesões avançadas após a décima quinta semana. Os locais mais acometidos por estas lesões são o arco aórtico, artéria carótida, artéria mesentérica superior, artéria renal, artéria pulmonar e bifurcação aórtica. Os camundongos ApoE são considerados um dos mais relevantes modelos para o estudo da aterosclerose, com função endotelial normal, como demonstrado por ARRUDA *et al.*, 2006; VILLENEUVE *et al.*, 2003 resultado em modelo atípico de aterosclerose. A disfunção endotelial tem sido reportada sob uma dieta rica em colesterol, mas não sob dieta normal.

## 2 - OBJETIVO

### 2.1. Geral

- Avaliar os efeitos da Rapamicina sobre a reatividade vascular do leito arteriolar mesentérico em camundongos ateroscleróticos ApoE knock-out.

### 2.2. Específico

- Avaliar o efeito da rapamicina sobre a reatividade vascular à NE, ACh e ao NPS.
- Verificar os efeitos da rapamicina com a hipercolesterolemia e o processo aterosclerótico.

### **3- MATERIAIS E MÉTODOS**

O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola Superior de Ciências da Saúde da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM), de acordo com as normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

#### **3.1. Animais**

Todos os experimentos foram realizados em camundongos ApoE <sup>-/-</sup> knockout, machos, com oito semanas de idade e pesando aproximadamente 23g, provenientes do biotério do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais receberam água e ração (Purina®) *ad libitum* e foram submetidos a ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade (70%) controlados. Foi utilizado em todos os experimentos um total de 19 animais, sendo 10 do grupo tratado com rapamicina e 9 do grupo controle não tratado.

#### **3.2. Administração da Rapamicina**

A rapamicina utilizada foi o Rapamune®, comprimidos (Wyeth-Ayerst-Rouse Point, USA). A partir da oitava semana de vida, os animais receberam ração adicionada de rapamicina, na dose de 5 mg/kg de peso do animal por dia, até a vigésima semana, totalizando 12 semanas de tratamento (WAKSMAN *et al.*, 2003; ELLOSO *et al.*, 2003; BASSO *et al.*, 2003).

### **3.3. Grupos Experimentais**

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais. Um grupo tratado com rapamicina (n=10) e um grupo controle não tratado n=9).

### **3.4. Preparação do animal**

Após doze semanas do início do tratamento diário com rapamicina na dieta na dose de 5mg/kg, os animais foram sacrificados com tiopental sódico (40 mg/kg) para verificar a função endotelial através da metodologia do estudo vascular mesentérico, coleta da aorta para análise histológica, morfológica e o sangue para avaliação do colesterol.

### **3.5.. Análise Histoquímica**

Após a retirada do mesentério foi realizada uma incisão torácica de forma que o coração ficasse com livre acesso para realização da perfusão no animal. Para execução da perfusão foi feita uma incisão no átrio direito e em seqüência infundido 50 ml de PBS (0,1 M; pH 7,4) no ventrículo esquerdo, seguido de 50 ml de paraformaldeído (4%), ambos com pressão igual 100 mm Hg. A realização da perfusão do animal com pressão controlada foi conseguida através do uso da força atrativa do campo gravitacional, por meio da pressão hidrostática determinada pela altura da coluna líquida (1,36 cm H<sub>2</sub>O = 1 mmHg), com uso do frasco de Mariotti associado a um equipo (figura 1). A perfusão sob pressão controlada de 100 mmHg permite manutenção mais adequada do formato das artérias, evitando também possíveis rupturas e degradação das placas ateromatosas. Enquanto que o frasco de Mariotti permite que o fluxo seja constante, e este foi mantido em aproximadamente 20 ml/min. Ao término da perfusão foi retirado dos animais o coração e a aorta até o nível diafragmático, para então serem estocados em

recipientes apropriados contendo solução fixadora de PBS (0,1 M, pH 7,4) com 10% de paraformaldeído (4%), até o momento da preparação histológica.



**Figura 1:** Sistema de perfusão sob pressão controlada de acordo com a variação da altura da coluna hidrostática (1,36 cm H<sub>2</sub>O = 1 mmHg). No alto vemos em maior detalhe o frasco de Mariotti.

O excesso de tecido conjuntivo perivascular da aorta foi retirado com auxílio de pinças ponto-reta (INOX, nº 2 e 5) e de um estereomicroscópio (ausJENA, Alemanha) e a aorta ascendente foi então separada e colocada em gelatina incolor (Dr. Oetker, Brasil) a 24% formando assim um bloco e posteriormente congelada. O bloco de gelatina contendo o segmento da aorta foi posicionado para obtermos cortes transversos com 10 µm de espessura em um criostato (Jung CM 1800 – Leica, a -16 °C, de modo que os cortes iniciaram na metade superior cardíaca (base) que se alinha com a aorta ascendente. Os cortes teciduais foram

posicionados em lâminas de vidro preparadas adequadamente para adesão do tecido.

A identificação de lipídios requer a exclusão de solventes de gordura comumente utilizados na inclusão em parafina. A fim de identificar a gordura, foi então necessário preparar secções teciduais congeladas de tecidos preservados. Posteriormente as secções foram coradas com *Oil Red-O* (*Sigma-Aldrich*) que confere uma cor vermelho-alaranjada aos lipídios neutros presentes. A solução de estoque foi preparada contendo 300 mg de *Oil Red-O* em 100 ml de 2-propanol ou isopropanol (Reagentes Analíticos, Dinâmica), e a solução para corar foi diluída com 16 ml de água destilada que foi acrescida a 24 ml de *Oil Red-O* da solução estoque e misturados por 10 minutos, centrifugados e filtrados. As lâminas contendo os cortes foram posicionadas a altura de cerca de 2 mm da superfície de um recipiente fechado, para evitar a evaporação do solvente, de forma a se criar então uma interface líquida (solução de *Oil Red-O*) entre o vidro da lâmina e do recipiente. Este posicionamento permite que precipitados cristalinos formados se depositem no fundo do recipiente, e não na lâmina, sendo esta formação de precipitados do corante um grande inconveniente dessa coloração. Também, para minimizar esse problema a solução de *Oil Red-O* para coloração foi centrifugada por um período de 2,5 minutos a 4000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415D). Os cortes ficaram em contato com o corante por 10 minutos, e posteriormente foram lavados com água corrente por cerca de 10 minutos.

Ao término da impregnação dos cortes pelo corante, realizou-se uma montagem para preservação da lâmina, com uma solução específica de montagem, constituída de glicerol em PBS e azida sódica 0,1% (*mounting medium*, Sigma<sup>®</sup>) que banhava os cortes e uma lamínula de vidro (24 x 60 mm, n<sup>o</sup> 1, Herka<sup>®</sup>, Alemanha)

cobria a lâmina. As bordas entre a lamínula e a lâmina que continha os cortes foram cobertas com esmalte incolor para evitar a evaporação da solução de montagem.

### **3.6. Análise Morfométrica**

Com uso de um microscópio triocular (Olympus AX70) acoplado a uma câmera digita foram capturadas as imagens das lâminas, e estas foram analisadas em programa de imagem específico (Image J). Esses procedimentos foram efetuados no Departamento de Morfologia do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo. Para a captura das imagens utilizamos objetiva de 40x, de modo que a ampliação final real na tela do monitor (13') é igual a 1260x. As imagens foram obtidas com tamanho de 640x480 *pixels*.

Utilizando o programa Image J foi quantificada diretamente a área de deposição de lipídios na parede vascular, incluindo a camada média e íntima, que aparece corada em uma tonalidade de vermelho-alaranjado. Os resultados da área foram expressos em  $\mu\text{m}^2$ . Nesse aumento foram selecionados cinco (05) cortes com maior área de deposição lipídica, e toda sua área corada foi quantificada para posterior realização da média dos cinco cortes por amostra.

### **3.7. Medida do Colesterol Plasmático**

Amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital de todos os grupos experimentais, logo após a anestesia para a realização do estudo da reatividade vascular. O colesterol plasmático foi medido usando um kit colorimétrico obtido comercialmente (Bioclin, Brasil).

### 3.8. Preparação do Leito Arteriolar Mesentérico

As preparações foram isoladas segundo a técnica descrita por McGREGOR em 1965. Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (40mg/Kg) por via intraperitoneal. Após laparotomia, a artéria mesentérica superior foi cateterizada (Micro-Renathane Braintree Science, USA) e o mesentério dissecado das alças intestinais, evitando-se o estiramento excessivo. Após ser isolado o mesentério foi imediatamente perfundido em solução nutritora de Krebs Henseleit modificada numa perfusão constante de 2ml/min, gaseificada com mistura carbogênica (95%O<sub>2</sub> e 5%CO<sub>2</sub>), mantida a 37°C±0.5°C usando uma bomba de perfusão peristáltica (Harvard Apparatus, USA). A solução de perfusão era composta dos seguintes componentes em mM: NaCl, 130; KCL, 4.7; CaCL<sub>2</sub> .2H<sub>2</sub>O,1.6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18; MgSO, 4.7; H<sub>2</sub>O, 1.17; NaHCO<sub>3</sub>, 14.9; EDTA, 0.026 e glicose, 11.1. As variações na pressão de perfusão foram medidas usando um transdutor de pressão (Cobe Laboratories, Lakewood, CO, USA) conectado a um polígrafo (Gould RS 3400) para registro das variações de pressão de perfusão. Inicialmente foram realizadas Curvas Concentração Efeito (CCE) ao agente vasoconstritor norepinefrina (NE; Sigma, St. Louis, MO, USA). Em seguida foi feito o estudo da função endotelial, usando como ferramenta farmacológica a acetilcolina (ACh; Sigma, St. Louis, MO, USA) vasodilatador dependente do endotélio e posteriormente era feita a avaliação da integridade do músculo liso vascular através do uso do nitroprussiato de sódio (NPS; Sigma, St. Louis, MO, USA), vasodilatador independente do endotélio por doação de óxido nítrico. O percentual de relaxamento vascular às drogas vasodilatadoras foi obtido através do decréscimo na pré-contração induzida pela concentração de  $8 \times 10^{-6}$  de norepinefrina (NE).

### 3.9. Protocolos de Reatividade Vascular

#### 3.9.1. Protocolo 1 (Reatividade Vascular ao vasoconstritor NE)

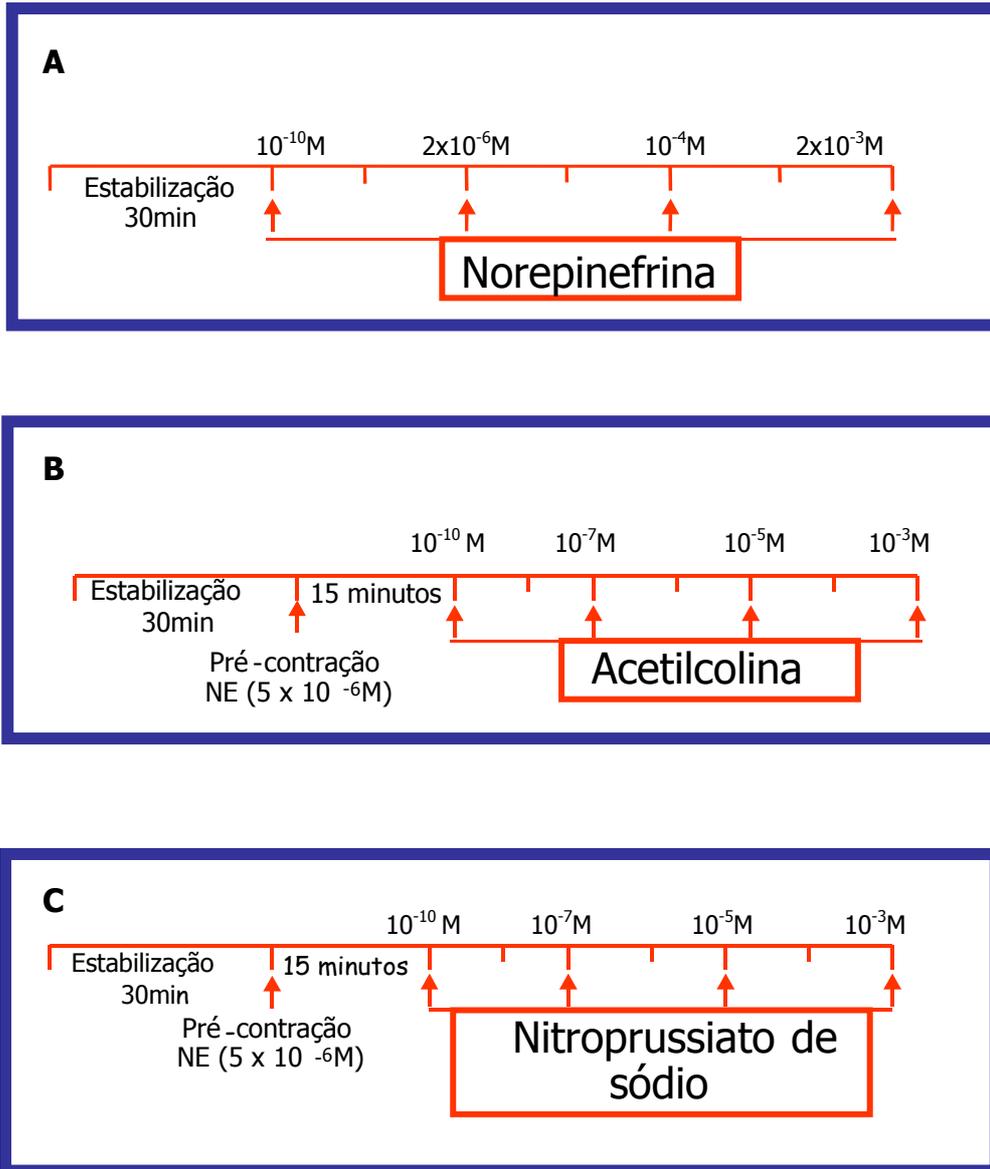
Inicialmente o leito mesentérico era perfundido por 30 minutos com Krebs modificado para a estabilização do registro. Em seguida, concentrações molares crescentes de NE foram *in bolus*, para obtenção da CCE à NE foram utilizadas. Ao todo foram 9 concentrações variando de NE  $10^{-10}$  M a  $2 \times 10^{-3}$  M.

#### 3.9.2. Protocolo 2 (Avaliação da função endotelial usando o vasodilatador dependente do endotélio ACh)

O leito mesentérico foi perfundido durante 30 minutos com Krebs modificado para estabilização do registro. Em seguida era utilizado para a pré-contração a norepinefrina (NE  $5 \times 10^{-6}$  M) que após alcançar o platô de contração, concentrações crescentes de ACh eram administradas para obter a CCE a esse agente vasodilatador.

#### 3.9.3. Protocolo 3 (Avaliação da função endotelial usando o vasodilatador independente do endotélio NPS)

O leito mesentérico foi perfundido durante 30 minutos com Krebs modificado para estabilização do registro. Em seguida foi aplicada a norepinefrina (NE  $5 \times 10^{-6}$  M) para se obter a pré-contração. Depois de alcançado o platô de contração, concentrações crescentes de NPS eram administradas para obter a CCE a esse agente vasodilatador usado para o estudo da função do músculo liso vascular.



**Figura 2-** Os esquemas acima representam os protocolos para as CCE à NE (A), ACh (B) e ao NPS (C).

### **3.10. Avaliação das Alterações de Sensibilidade**

A sensibilidade das preparações às drogas estudadas foi avaliada pela PD<sub>2</sub> (PD<sub>2</sub>= - log ED<sub>50</sub>).

### **3.11. Avaliação das Alterações de Resposta Máxima**

A reatividade das preparações foi determinada pelas respostas máximas (R<sub>max</sub>) aos agentes vasoativos e estão expressas como média aritmética e seus respectivos erros padrão do efeito máximo, obtido em experimentos individuais.

### **3.11. Drogas Utilizadas**

As drogas utilizadas foram: bitartarato de norepinefrina (NE; Sigma, St. Louis, MO, USA), cloridrato de acetilcolina (ACh; Sigma, St. Louis, MO, USA), nitroprussiato de sódio (NPS; Sigma, St. Louis, MO, USA). Todas as drogas usadas foram diluídas em solução de Krebs modificada.

### **3.14. Análise Estatística**

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média. A análise estatística utilizada foi o teste t de Student para amostras independentes e análise de variância (ANOVA) de 2-vias. O nível de significância foi fixado em  $p < 0.05$  para todas as comparações.

## 4. Resultados

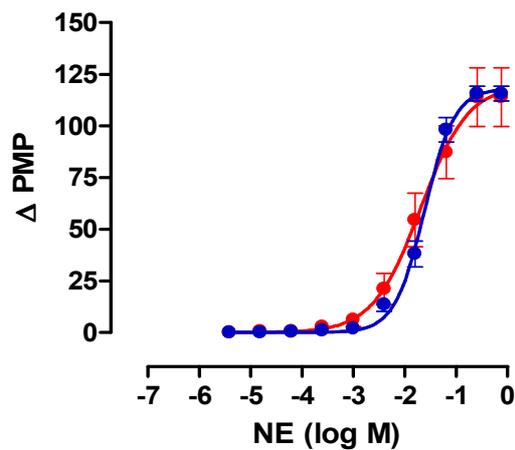
### 4.1. Colesterol Plasmático

**Tabela 1-** Sumariza a concentração de colesterol plasmático total, onde o colesterol plasmático foi significativamente maior em camundongos ApoE.

Parâmetros	Grupo Tratado (n=12)	Grupo Controle não tratado (n=7)
Colesterol (mg/dL)	941±63,*	721±49, 1

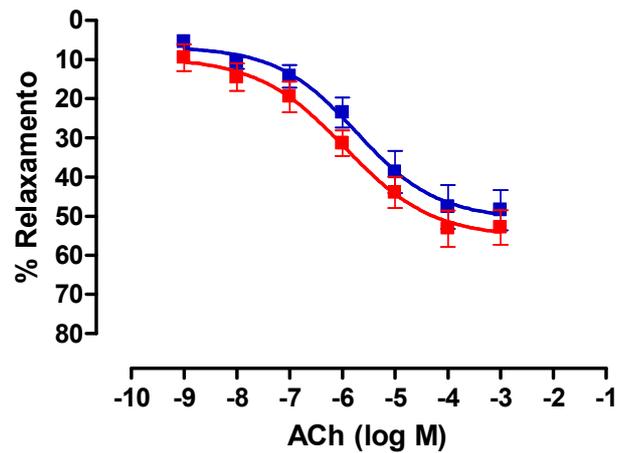
\* P<0, 05 (teste t de Student)

## 4.2. Reatividade Vascular



**Figura 3-** representa as curvas concentração efeito à NE mostrando a variação da pressão média de perfusão (PMP) em mmHg às doses crescentes de NE nos grupos controle (n=9) e tratado (n=10). Observa-se que o tratamento com a RP não alterou a resposta à NE no grupo tratado. Grupo tratado  $R_{max} 116 \pm 3,7$  e  $PD_2 1,6 \pm 0,05$ , grupo controle não tratado  $R_{max} 114 \pm 14$  e  $PD_2 1,7 \pm 0,16$ .

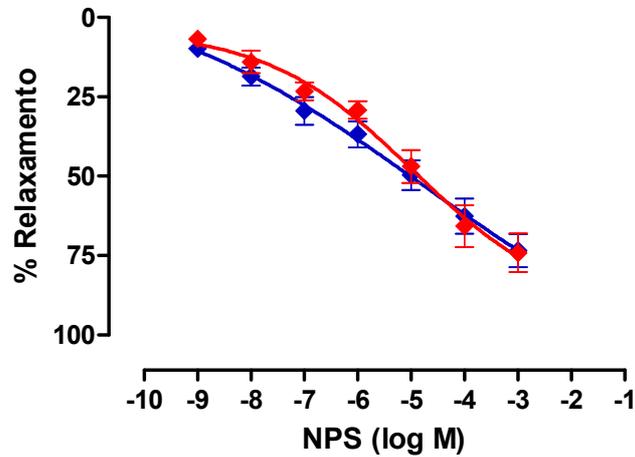
- Grupo tratado (n=10)
- Grupo controle (n= 9)



**Figura 4-** representa as curvas concentração efeito à ACh no leito arteriolar mesentérico onde a responsividade vascular à ACh foi similar entre os grupos. As respostas são expressas como percentual de relaxamento (diminuição da pressão de perfusão) relativas a pré-contracção induzida pela NE. Os dados foram expressos pela média  $\pm$  erro padrão. Grupo tratado  $R_{max}$   $49 \pm 5$  e  $PD_2$   $5,67 \pm 0,2$ , grupo controle não tratado  $R_{max}$   $53 \pm 4,4$  e  $PD_2$   $6,0 \pm 0,14$ .

■ Grupo tratado (n=10)

■ Grupo controle (n= 9)



**Figura 5-** representa as curvas concentração efeito ao NPS, vasodilatador independente do endotélio. Não houve diferença entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Também não foi observada diferença estatística na PD<sub>2</sub> dos grupos estudados. As respostas são expressas como percentual de relaxamento (diminuição da pressão de perfusão) relativa à pré-contracção induzida pela NE. Os dados foram expressos pela média  $\pm$  erro padrão. Grupo tratado R<sub>max</sub>  $74 \pm 5$  e PD<sub>2</sub>  $5,77 \pm 0,26$ , grupo controle não tratado R<sub>max</sub>  $74 \pm 6$  e PD<sub>2</sub>  $5,33 \pm 0,14$ .

◆ Grupo tratado (n=10)

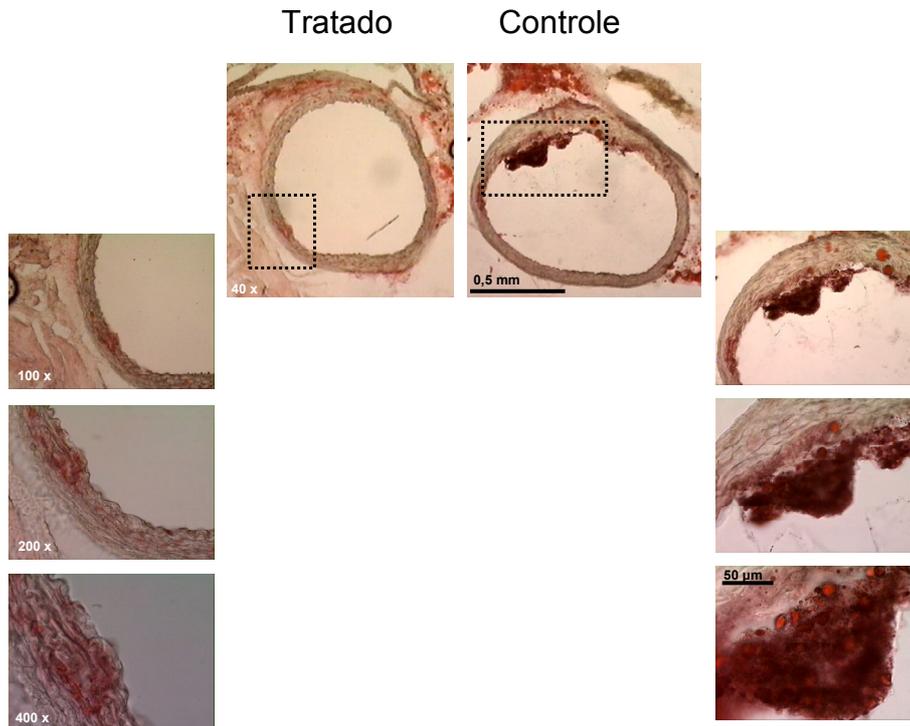
◆ Grupo controle (n= 9)

**Tabela 2** -Tamanho da lesão aterosclerótica nos grupos de camundongos ApoE<sup>-/-</sup> tratados e controle não tratado.

Parâmetros	Grupo Tratado (n=2)	Grupo Controle não tratado (n=2)
Tamanho da lesão ( $\mu\text{m}^2$ )	6.94±2.27**	46.15±13.02

\*\* P<0, 01 (teste t de Student)

**Tabela 2-** demonstra o tamanho da lesão aterosclerótica quantificada pela análise morfométrica da aorta ascendente. O grupo tratado com a RP apresentou redução significativa comparado ao grupo controle, tendo uma área de lesão aterosclerótica média de  $6.946 \pm 2.276 \mu\text{m}^2$  e o grupo controle de  $46.156 \pm 13.028 \mu\text{m}^2$ .



**Figura 7:** A imagem central mostra um corte transversal da aorta ascendente de um camundongo apoE-controle não tratado (direita) e apoE-tratado (esquerda) com a objetiva de 40x. As outras imagens mostram o aumento seqüencial da lesão ateromatosa com objetiva de 100x, 200x e 400x. Coloração *Oil-Red-O*.

## 5. Discussão

Este é o primeiro trabalho a demonstrar reatividade vascular em leito arteriolar mesentérico de camundongos ApoE cronicamente tratados com rapamicina, a qual não demonstrou qualquer efeito da mesma sobre o tônus vascular.

No presente trabalho foi observado que o tratamento oral de camundongos ApoE<sup>-/-</sup> com rapamicina resultou em: 1) Elevação do nível de colesterol dos animais ApoE tratados comparados ao grupo controle; 2) menor placa aterosclerótica dos animais ApoE tratados comparados ao grupo controle observado através da análise morfométrica; 3) preservou a reatividade vascular e função endotelial.

Nossos dados confirmam os achados de BRITO *et al.* (2005) avaliaram a hiperplasia intimal intra-stent em 12 pacientes submetidos à angioplastia que utilizaram a rapamicina via oral por 28 dias e observaram um aumento significativo do colesterol plasmático durante a administração da droga e após o término do tratamento os valores de colesterol retornaram ao basal.

A dislipidemia durante a utilização sistêmica da rapamicina é bem estabelecida em estudos experimentais e clínicos, porém o mecanismo pelo qual a rapamicina eleva os lipídeos, principalmente o colesterol permaneceu sem explicação. Recentemente, KUN *et al.* (2007) demonstraram que a rapamicina inibiu os receptores de LDL no fígado (nos hepatócitos) podendo resultar em diminuição do *clearance* de LDL na circulação causando um aumento da concentração do colesterol plasmático.

BASSO *et al.* (2003) também utilizaram o modelo camundongo ApoE knockout para avaliar o efeito da rapamicina na placa aterosclerótica no arco aórtico em animais de 4 semanas de idade, tratados com dieta hipercolesterolemica e rapamicina oral na dose de 4mg/kg/dia por doze semanas, onde houve redução de

36% da placa no grupo tratado. Os autores sugerem que a rapamicina tenha um efeito benéfico no metabolismo local do colesterol pelos macrófagos na parede do vaso. Vale ressaltar que nesse estudo não houve alteração na concentração lipídica. ELLOSO *et al.* (2003) avaliaram o efeito oral da rapamicina na aterosclerose do arco aórtico de camundongos ApoE<sup>-/-</sup> com oito semanas de idade. Os animais receberam dieta hipercolesterolêmica com rapamicina por doze semanas na dose de 1, 2, 4, e 8mg/kg/dia. O grupo controle apresentou uma média percentual de lesão aterosclerótica de 39,6%, os animais tratados com a dose 1mg/kg 21,6% de área de lesão e na dose de 2 a 8 mg/kg 15% ou menos, tendo elevado significativamente o LDL (lipoproteína de baixa densidade) e o HDL (lipoproteína de alta densidade). Os autores sugerem com esses achados que a rapamicina tem se mostrado uma droga promissora, podendo ser benéfica na terapia de pacientes com aterosclerose independente do aumento dos lipídeos circulantes. Esses resultados corroboram o nosso estudo, pois observamos um aumento significativo do colesterol plasmático e a redução da placa aterosclerótica reforçando também a eficácia do nosso tratamento na administração da rapamicina oral.

Nosso estudo mostrou uma redução significativa da lesão aterosclerótica do grupo tratado com rapamicina comparado com o controle, como também foi demonstrado WAKSMAN *et al.* (2003) que utilizaram camundongos ApoE knockout com 8 semanas de idade, alimentados com dieta hipercolesterolemica e tratados com rapamicina na dieta por 4 e 8 semanas e observaram redução importante na área de lesão com atenuação da progressão da placa aterosclerótica no grupo tratado com rapamicina, concluindo que sendo já bem delimitado a relação entre a aterosclerose e a inflamação e observando uma redução da placa aterosclerótica durante a administração da rapamicina, os autores sugerem um potencial efeito

antiinflamatório da rapamicina. Apesar de muitas pesquisas utilizarem a dieta hipercolesterolêmica para acelerar o desenvolvimento da placa aterosclerótica em camundongos ApoE knockout nos optamos por não usá-la já que este modelo animal apresenta aterosclerose espontaneamente precoce.

Quanto a função endotelial e a administração de rapamicina, recentemente Neto *et al.* também observaram em anéis de aorta de ratos adultos tratados com rapamicina, nas doses de, 0,5 e 2 mg/kg/dia que a droga não modificou as respostas vasomotoras na presença ou ausência de endotélio (NETO *et al.*, 2007).

MILLIARD *et al.*, (1998) demonstraram em anéis de aorta de rato dados que diferem dos nossos, após o tratamento com rapamicina, na dose de 0,8 e 2mg/kg/dia por 15 dias, houve um aumento da resposta vasodilatadora dependente do endotélio, induzida pela ACh, porém, nos experimento de Milliard a rapamicina foi diluída com 70% de PEG adicionado a 20% de N-N dimetilacetamina e 10% de Tween 80 onde o veículo por si só teve efeito facilitador na vasodilatação. Chamou-nos atenção nesses experimentos o fato de que a dose menor de RP (0,8mg/kg/dia) teve efeito superior ao da dose maior (2mg/kg/dia) na potencialização da vasodilatação dependente do endotélio. Em nosso estudo não foi utilizado nenhum tipo de veículo, o que descarta a possibilidade da ação dos mesmos na função endotelial.

FUKUDA *et al.*, (2005). acreditando que a rapamicina tenha ação em outros tipos de células demonstraram que a RP em baixa concentração (0,1ng/ml) não inibiu de modo significativo as células musculares lisas de aorta humana e em concentrações maiores (1ng/ml), inibia as células musculares lisas e as células endoteliais vasculares humanas. Esses achados parecem ter relação com o retardo

da endotelização após o implante de stents com rapamicina e com relatos de trombose tardia.

BURKE *et al.*, (2005) demonstraram redução da formação neointimal em carótidas de minipigs submetidos a injúria vascular por balão, no grupo dos tratados com rapamicina oral na dose de 2 mg/kg/dia , por 28 dias, comparativamente com o grupo controle.

No primeiro estudo multicêntrico, cego e randomizado em pacientes com diabetes com o propósito de, após nove meses de procedimento comparar por intermédio de ultrassom intracoronário (USIC) 75 lesões que receberam stents com rapamicina versus 65 lesões que receberam stents convencionais, observou-se marcante redução da área de hiperplasia neo-intimal e do volume de hiperplasia neo-intimal no grupo tratado com rapamicina. No entanto o grupo tratado com rapamicina apresentou aposição incompleta do stent, adquirida tardiamente em 11 lesões (14,7%), e o grupo controle não apresentou ocorrência de nenhum caso. Apesar do fato preocupante, nenhum paciente portador de aposição incompleta tardia do stent apresentou trombose no seguimento clínico de um ano. Contudo não se sabe o efeito desta aposição incompleta adquirida, no risco de trombose tardia do stent (JIMENEZ-QUEVEDO *et al.*, 2006).

Complicações, ainda que raras, como a reação de hipersensibilidade ao polímero e a trombose tardia dos stents liberadores de medicamentos, justificam o seguimento clínico mais longo e a procura de estratégias alternativas (VIRMANI *et al.*, 2004).

O nosso estudo procurou demonstrar, por intermédio desses experimentos, a possível interferência da rapamicina sobre a função endotelial pelas alterações do tônus vasomotor. A busca por drogas administráveis por via oral (V.O) a fim de

prevenir a reestenose coronária, tem gerado estudos, de inúmeras drogas, dotadas dos mais diversos mecanismos de ação. Sabe-se que a droga ideal deve ser dotada de propriedades antiinflamatórias, ser capaz de inibir a proliferação e a migração de CML, promover o crescimento endotelial e ser bem tolerada.

Existem evidências de que a administração oral de rapamicina tenha mostrado ser eficaz na redução da reestenose coronária. Aspecto relevante, com respeito à rapamicina, é que sua administração deva ser iniciada pré-procedimento (KUCHULAKANTI & WAKSMAN, 2004).

Nós demonstramos que a rapamicina não provocou alterações no tônus vascular no leito arteriolar mesentérico, as quais se positivas, traduziriam uma disfunção endotelial, o que implicaria em maior temor quanto a sua utilização rotineira.

Acreditamos que nossos experimentos, ao demonstrarem ausência de sinais tóxicos da rapamicina sobre a função endotelial em leito arteriolar mesentérico, acrescentam dados relevantes que influenciam positivamente para que novos estudos sejam realizados com modelos mais próximos ao organismo humano, contribuindo para maior compreensão da sua ação.

## **6. Conclusão**

A administração oral de rapamicina preserva a resposta vasomotora do leito arteriolar mesentérico de camundongos ApoE knockout bem como a função endotelial.

## 7. Referências Bibliográficas

ARRUDA RMMP, PEOTTA VA, MEYRELLES SS, VASQUEZ EC. Evaluation of vascular function in apolipoprotein E knockout mice with angiotensin-dependent renovascular hypertension. **Hypertension**. 2006; 46: 932-36.

ARRUDA JA, MOULIN BM, BRITO FS. Redução da reestenose coronária intra-stent com agentes farmacológicos sistêmicos: metanálise de estudos randomizados com seguimento angiográfico. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**. 2006; 14(1): 20-29.

BASSO MD, NANBI P, ADELMAN SJ. Effect of sirolimus on the cholesterol content of aortic arch in apoE knockout mice. **Transplantation proceedings**. 2003;35:3136-38.

BONNETTI PO, LERMAN LO, LERMAN A. Endothelial dysfunction. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2003; 23:168-75.

BORNFELDT KE. The p27Kip 1/cyclin-dependent kinase pathway moves forward. **Circ Res**. 2003;92(4):345-47.

BRITO FS, ROSA WC, ARRUDA JA. Efficacy and safety of oral sirolimus to inhibit in-stent intimal hyperplasia. **Catheter Cardiovasc Interv**. 2005;64(4):413-18.

BURKE SE, LUBBERS NL, CHEN YW, HSIEH GC, MOLLISON KW, LULY JR, WEGNER CD. Neointimal formation after balloon-induced vascular injury in yucatan minipigs is reduced by oral rapamycin. **J Cardiovasc Pharmacol**. 1999;33(6):829-835.

BUSSE R, FLEMING I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. **Nat Med**. 1995; 27:331-40.

CINES DB, POLLA ES, BUCK CA. Endothelial cells in physiology and in pathophysiology of vascular disorders. **Blood**. 1998; 91:3527-61.

COCKS TM, ANGUS JA. Endothelium dependent-relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. **Nature**. 1983;305:627-630.

COHEN RA, WEISBROD RM. Endothelium inhibits norepinefrine release from adrenergic nerve of rabbit carotid artery. **Am J Physiol**. 1998;254:H871-H878.

DIEZ-JUAN A, ANDRES V. Coordinate control of proliferation and migration by the p27Kip 1/cyclin-dependent kinase/retinoblastoma pathway in vascular smooth muscle cells and fibroblasts. **Circ Res**. 2003;92(4)402-10.

DZAU VJ, BRAUN-DULLAEUS RC, SEDDING DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspective and therapeutic strategies. **Nat Med**. 2002;8(11):1249-56.

ELLOSO MM, AZROLAN N, SEHGAL SN, HSU PL, PHIEL KL, KOPEC CA, BASSO MD, ADELMAN SJ.. Protective effect of the immunosuppressant sirolimus against aortic atherosclerosis in apoE-deficient mice. **American Journal of Transplantation**. 2003; 3:562-69.

FAJADET J, MORICE MC, BODE C, BARRAGAN P, SERRUYS PW, WIJNS W, CONSTANTINI CR, GUERMONPREZ JL, ELTCHANINOFF H, BLANCHARD D, BARTORELLI A, LAARDMAN GJ, PERIM M, SOUSA JE, SCHULER G, MOLNAR F, GUAGLIUMI G, COLOMBO, A, BAN HAYASHI E, WULFERT E. Maintenance of long-term clinical benefit with sirolimus-eluting coronary stents: Three-year results of the RAVEL trial. **Circulation**. 2005;111(8):1040-1044.

FISCHMAN DL, LEON MB, BAIM D. For the STRESS trial Investigators. A randomized comparasion of coronary-stent placement and ballon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. **N Engl J Med**. 1994; 331:496-501.

FUKUDA D, SATA M, TANAKA K, NAGAI RI. Potent inhibitory effect of sirolimus on circulating vascular progenitor cells. **Circulation**. 2005;111(7):926-931.

FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. 1980;288(5789):373-376.

GALLO R, PARDUREAN A, JAYARAMAN T, MARX S, ROQUE M, ADELMAN S, CHESEBRO J, FALLON J, FUSTER V, MARKS A, BADIMON JJ. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. **Circulation**. 1999;99(16):2164-2170.

GARRAT KN, EDWARDS WD, KAUFMANN UPI. Differential histopathology of primary atherosclerotic and restenotic lesions in coronary arteries and saphenous vein bypass grafts: analysis of tissue obtained from 73 patients by directional atherectomy. **J Am Coll Cardiol**. 1991;17:442-8.

GAUTHIER TW, SCALIA R, MUROHARA T. Nitric oxide protects against leucocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 1995; 15:1652-1659.

GENG YJ, LIBBY P: progression of atheroma: A struggle between death and procreation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2002; 22:1370-73.

GREGORY CR, HUIE P, BILLINGHAM ME, MORRIS RE. Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury. **Transplantation**. 1993;55(6): 1409-1418.

GU L, OKADA Y, CLINTON S. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein-deficient mice. **Mol Cell**. 1998;2:275-80.

GUBA M, VON BREITENBUGH P, STEINBAUER M, KOEHL G, HORNUNG M, BRUNS CJ, ZUELKE C, FARKAS S, ANTHUBER M, JAUCH KW, GEISSLER EKI.

Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. **Nat Med.** 2002; 8(2):128-135.

HANSSON GK. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. **N Engl J Med.** 2005; 352:1685-95.

HARKER LA. Role of platelets and thrombosis in mechanism of acute occlusion and restenosis after angioplasty. **J Am Coll Cardiol.** 1987;60 (3):20B-28B.

HARRISON DG. Endothelial modulation of vascular tone: Relevance to coronary angioplasty and restenosis. **J Am Coll Cardiol.** 1991;17:71B-76B.

IP JH, FURSTER V, BADIMON L. Role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. **J Am Coll Cardiol.** 1990;15:1667-87.

JIMENEZ-QUEVEDO P, SABATE M, ANGIOLILLO DJ, COSTA MA, ALFONSO F, GOMEZ-HOSPITAL JA, HERNANDEZ-ANTOLIN R, BANUELOS C, GIOCOLEA J, FERNANDEZ-AVILES, BASS T, ESCANED J, MORENO R, FERNANDEZ C, MACAYA C. Vascular effects of sirolimus-eluting versus bare-metal stents in diabetic patients: three-dimensional ultrasound results of the Diabetic and Sirolimus-Eluting Stent (DIABETES) Trial. **Journal of American College of Cardiology.** 2006; 47(11):2172-2179.

KAHAN BD, CANARDO JS. Rapamycin: clinical results and futures opportunities. **Transplantation.** 2001;72(7):1181-1193.

KARAS SP, GRAVANIS MB, SANTOIAN EC, et al. Coronary intimal proliferation after balloon injury and stenting in swine: an animal model of restenosis. **J Am Coll Cardiol.** 1992;20(2):467-74.

KEARNEY M, PIECZEK A, HALEY L, LOSORDO DW, ANDRES V, SCHAINFELD R, ROSENFELD K, ISNER JM. Histopathology of in-stent restenosis in patients with peripheral artery disease. **Circulation.** 1997;95(8):1998-2002.

KORNOWSKI R, HONG MC, TIO FO, et al. In-stent restenosis: contribution of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. **J Am Coll Cardiol.** 1998;31(1):224-30.

KUCHULAKANTI P, WAKSMAN R. Therapeutic potential of oral antiproliferative agents in the prevention of coronary. **Drugs.** 2004;64(21):2379-88.

KUN LM, XIONG ZR, POWIS SH, STEPHEN H, CHEN Y, MOORHEAD JF, VARGHESE Z. Sirolimus modifies cholesterol homeostasis in hepatic cells: a potential molecular mechanism for sirolimus-associated dyslipidemia. **Transplantation.** 2007;84(8):1029-36.

LIBBY P. Inflammation and atherosclerosis. **Circ Res.** 2002; 105: 1135-43.

LUSTER A. Chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N Engl J Med.** 1998; 338:436-40.

MANCINI D, PINNEY S, BURKOFF D, LA MANCA J, ITESCU S, BURKE E, EDWARDS N, OZ M, MARKS AR. Use of rapamycin slows progression of cardiac transplantation vasculopathy. **Circulation.** 2003;108(1):48-53.

MARX SO, JAYARAMAN T, GO LO, MARKS AR. Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. **Circulation Research.** 1995;76(3):412-417.

MARX SO, MARKS AR. Bench the bedside: the development of rapamycin and its application to stent restenosis. **Circulation.** 2001; 104 (8): 852-5.

McGregor DD. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. **J Physiol.** 1965;177(1); 21-30.

MILLIARD S, SILVA A, BLAISE G, CHEN H, XU D, QI S, DALOZE P. Rapamycin's effect on vasomotion in the rat. **Transplantation proceedings**. 1998;30(4):1036-1038.

MILLER YI, CHANG MK, BINDER CJ. Oxidized low density and innate immune receptors. **Curr Opin Lipidol**. 2003; 14:437-40.

MONCADA S, GRYGLEWSKY RJ, BUNTING S. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**. 1976;263:663-7.

MORELON E, MANZER-BRUNEEL MF, PERALDI MN, KREIS H. Sirolimus: a new promising immunosuppressive drug. Towards a rationale for its use in renal transplantation. **Nephrol Dial Transpl**. 2001;16 (1):18-20.

MORICE M, SERRUYS PW, SOUSA JE, FAJADET J, BAN HAYASHI E, PERIN M, COLOMBO A, SCHULER G, BARRAGAN P, GUAGLIUMI G, MOLNAR F, FALOTICO R. for the RAVEL Study Group. A randomized comparison of sirolimus-eluting stent with standard stent for coronary revascularization. **New Engl J Med**. 2002;346:1773-80.

MORRIS RE, CAO W, Huang X, GREGORY CR, BILLINGHAM, ROWAN R, SHORTHOUSE RA. Rapamycin inhibits vascular smooth cell DNA synthesis in vitro and suppresses narrowing in arterial allografts and in balloon-injured carotid arteries: evidence that rapamycin antagonizes growth factor action on immune and nonimmune cells. **Transplantation proceedings**. 1995;27(1): 430-431.

MUGGE A, ELWELL JH, PETERSON TE. Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. **J Am Coll Cardiol**. 1991;17:71B-76B.

MUNI NI, GROSS TP. Problems with drug-eluting coronary stents-the FDA perspective. **N Engl J Med.** 2004;351(16):1593-1595.

NEBEQUER JR, VIRMANI R, BENNETT CL, HOFFMAN JM, SAMORE MH, ALVAREZ J, DAVISON CJ, McKOY JM, RAISCH DW, WHISENANK BK, YARNOLD PR, BELKNAP SM, WEST DP, GAGE JE, MORSE, RE, GLICORY G, DAVIDSON L, FELDMAN MD. Hypersensitivity cases associated with drug-eluting coronary stent: a review of available cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) project. **J Am Coll Cardiol.** 2006;47(1):175-185.

NETO MMS, Di MARCO GS, CASARINI DE, LIMA VC, CAMPOS AH. Orally administered rapamycin does not modify rat aortic vascular tone. **J Cardiovasc Pharmacol.** 2007; 49(2):97-9.

OHARA Y, PETERSON TE, HARRISON DG. Hipercolesterolemia increases endotelial superoxide anion production. **J Clin Invest.** 1993; 91:2546-52.

PIEDRAHITA JA, ZANG SH, HAGAMAN JR, OLIVER PM, MAEDA M. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1992;89 (10):4471-75.

POLYAK K, LEE MH, ERDJUMENT-BROMAGE H, KOFF A , ROBERTS JM, TEMPST P, MASSAGUE J. Cloning of p27 Kip 1, a cyclin dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. **Cell.** 1994;78 (1):59-66.

QUYYUMI A. Endothelial function in health disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. **Am J Med.** 1998; 105:32S-39S.

ROQUE M, CORDON-CARDO C, FURSTER V, REIS ED, DRONJAK M, BADIMON JJ. Modulation of apoptosis, proliferation, and p27 expression in a porcine coronary angioplasty model. **Atherosclerosis.** 2000;153(2):315-22.

ROSS R. Atherosclerosis an inflammatory disease. **N Engl J Med.** 1999;340(2): 115-26.

ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis. **Nature.** 1993;362:801-9.

SAFIAN RD, GELFISH JS, ERNY RE. Coronary atherectomy: clinical, angiographic, and histological findings and observations regarding potential mechanisms. **Circulation.** 1990;82:69-79.

SAIKKU P. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. **Lancet.** 1988; 2: 983-6.

SCHAMPAERT E, COEHN EA, SCHULTER M, REEVES F, TRABOULSI M, TITLE LM, KUNTZRE, POPMA JJ. The Canadian study of sirolimus-eluting stent in the treatment of patients with long de novo lesions in small native coronary arteries (C-SIRIUS). **Journal of the American College of Cardiology.** 2004;43(6):1110-1115.

SCHOFER J, SCHULTER M, GERSHLICK AH, WIJNS W, GARCIA E, SCHAMPAERT E, BREITHARDT G. Sirolimus-eluting stents for treatment of patients with long atherosclerotic lesions in small coronary arteries: double-blind, randomized controlled trial (E-SIRIUS). **Lancet.** 2003;362(9390):1093-1099.

SEHGAL SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. **Clin bioch.** 1998; 31 (5):335-40.

SERRUYS PW, JAEGERE P, KIEMENEIJ F, et al. For the BENESTENT Study Group. A comparison of balloon-expandable stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. **N Engl J Med.** 1994 ;331:489-95.

SERRUYS PW, van HOUT B, BONNIER H, et al. Randomized comparison of implantation of heparin-coated stents with balloon angioplasty in selected patients with coronary artery disease (BENESTENT II). **Lancet.** 1998; 352:673-81.

SOUSA JE, COSTA MA, ABIZAID A, SOUSA AG, FERES F, MATTOS LA, CENTEMERO M, MALDONADO G, ABIZAID AS, PINTO I, FALOTICO R, JAEGER J, POPMA JJ, SERRUYS PW. Sirolimus Eluting Stents for the Treatment of In-Stent Restenosis. **Circulation**. 2003;113:173-6

SOUSA JMR, COSTA MA, ABIZAID A, ABIZAID AS, FERES F, PINTO IM, SEIXAS AC, STAICO R, MATTOS LA, SOUSA AG, FALOTICO R, JAEGER J, POPMA JJ, SERRUYS PW. Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries: a QCA and three-dimensional IVUS study. **Circulation**. 2000;103:192-5

STEPKOWSKI SM, NAPOLI KL, WANG ME, QU X, CHOU TC, KAHAN BD. Effects of the pharmacokinetic interaction between orally administered sirolimus and cyclosporine on the synergistic prolongation of heart allograft survival in rats. **Transplantation**. 1996;62(7):986-994.

SUN J, MARX SO, CHEN HJ, POON M, MARX AR, RABANNI LE. Role for p27(Kip1) in vascular Smooth Muscle Cell Migration. **Circulation**. 2001; 103(24):2967-2972.

TANNER FC, NOLLI G, BOULANGER CM. Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxations of porcine coronary arteries. **Circulation**. 1991;83:2012-20.

TODA N. Alpha-adrenoceptor subtypes and diltiazem action in isolated human coronary arteries. **Am J Physiol**. 1986;250:H718-H724.

VEZINA C, KUDESKI A, SEHGAL SN. Rapamycin, a new antifungal antibiotic. I **Taxonomiy**. 1975; 28(10):721-26.

VILLENEUVE, FORTUNO A, SAUVAGE M, FOURNIER N, BREUGNOT C, JACQUEMIN C, PETIT C, GOSGNASH W, CARPENTIER N, VANHOUTTE P,

VILAINE J-P. Persistence of the nitric oxide pathway in the aorta of hipercholesterolemic apolipoprotein-E-deficient mice. **J Vasc Res.** 2003;40(2):87-96.

VIRMANI R, GUAGLIUMI G, FARB A, MUSUMECI G, GRIECO N, MOTTA T, MIHALCSIK L, TESPILI M, VALSECCHI O, KOLOGDIE FD. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? **Circulation.** 2004; 109 (6): 701-5.

WAKSMAN R, RAJBABU P, BURNETT MS, GULICK C, LEBORGNE L, FOURNADJIEV J, WOLFRAM R, HELLINGA D. Oral rapamycin inhibits growth of atherosclerotic plaque in apoE knock-out mice. **Cardiovascular Radiation Medicine.** 2003;4:34-38.