

ALEXANDRE DO CANTO ZAGO

Importância da Interação entre a Integrina Mac-1 dos Leucócitos e a Glicoproteína Ib α das Plaquetas para o Recrutamento de Leucócitos pelas Plaquetas e para a Resposta Inflamatória à Lesão Vascular

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

Área de concentração: Cardiologia
Orientador: Prof. Dr. Eulógio Emílio Martinez Filho

São Paulo

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Zago, Alexandre do Canto

Importância da interação entre a integrina Mac-1 dos leucócitos e a glicoproteína Ib α das plaquetas para o recrutamento de leucócitos pelas plaquetas e para a resposta inflamatória à lesão vascular / Alexandre do Canto Zago. -- São Paulo, 2006.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Cardio-Pneumologia .

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: Eulógio Emílio Martinez Filho.

Descritores: 1.Moléculas de adesão celular 2.Integrinas 3.Inflamação 4.Leucócitos
5.Plaquetas 6.Reestenose coronária

USP/FM/SBD-395/06

DEDICATÓRIA

**À minha querida e saudosa vó,
Onfale,**

exemplo de força e coragem a ser seguido, meu mais profundo agradecimento por seus ensinamentos, pela sua lição de vida e pelo amor e orgulho que sempre manifestou por mim.

**À minha esposa,
Débora,**

por seu amor, carinho, compreensão e, sobretudo, por seu companheirismo e dedicação em todos os momentos que envolveram a pesquisa e a elaboração desta tese.

**Ao meu pai,
Alcides,**

pelo exemplo de ética, por seus sábios conselhos como professor de medicina e como pai e pelo apoio nas diversas fases desta importante etapa de minha formação profissional.

**À minha mãe,
Maria de Lourdes,**

centro da união familiar, pelo carinho, apoio, compreensão e incentivo do início ao fim das atividades que culminaram nesta tese.

**Ao meu irmão e, também, grande amigo,
Felipe,**

pelo incentivo e disposição em ajudar nas diversas etapas desta tese.

Ao Prof. Dr. Eulógio Emílio Martinez Filho,

meu especial agradecimento pela competente orientação,
amizade, constante incentivo e essencial contribuição
durante todo o período da Pós-Graduação.

Ao **Prof. Dr. Daniel Ira Simon**,

do Brigham and Women's Hospital/Harvard University,
pela co-orientação, amizade, disponibilidade e por propiciar a
realização deste trabalho científico em sua Instituição.

Ao FUNCOR

pelo auxílio na modalidade de bolsa durante meu PhD Research Fellow
no Brigham and Women's Hospital/ Harvard University.

AGRADECIMENTOS

Aos Drs. Yunmei Wang, Zhiping Chen, Masashi Sakuma e Kevin Croce pelo coleguismo e amizade no convívio e pela dedicação e empenho nas tarefas que envolveram a realização deste trabalho.

Às secretárias Neusa Rodrigues Dini, Juliana Sobrinho e Eva Malheiros Guiss de Oliveira pela disponibilidade, auxílio e colaboração nas tarefas e atividades da Pós-Graduação.

À bibliotecária Valéria de Vilhena Lombardi pela cuidadosa elaboração da Ficha Catalográfica.

Às professoras Ryta Sallaberry e Isabella Cristina Záchia Ayub pela criteriosa revisão gramatical e editoração do conteúdo deste trabalho.

Aos Profs. Anna Savitskaia e Oleg Savitskii pelo auxílio na elaboração e revisão da versão desta tese em língua inglesa.

Ao Dr. Marco Wainstein pelo contato inicial com o Dr. Daniel Simon e pelo coleguismo na divisão de tarefas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que possibilitou conciliar os compromissos profissionais e acadêmicos.

Ao estatístico Mathias Azevedo Bastian Bressel pela disponibilidade e competente auxílio na análise estatística dos dados.

Ao Dr. Diego Uchôa, médico-patologista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e grande amigo, pelo auxílio e sugestões referentes às áreas de histologia e imunohistoquímica.

À Dra. Carmen Pilla, chefe da Unidade de Pesquisa Biomédica do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo auxílio na tradução e revisão de termos técnicos.

À Banca de Qualificação formada pelos Profs. Drs. Exedito Ribeiro da Silva, Fausto Feres e José Eduardo Krieger, pelas relevantes sugestões que em muito contribuíram para a qualidade deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE GRÁFICOS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
RESUMO	xv
SUMMARY	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 IMPORTÂNCIA DAS PLAQUETAS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA VASCULAR	4
1.2 RECRUTAMENTO DE LEUCÓCITOS MEDIADO POR PLAQUETAS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO VASCULAR.....	9
1.3 INTERAÇÃO ENTRE LEUCÓCITOS E PLAQUETAS VIA RECEPTORES Mac-1 E GPIb α	13
1.4 PROCESSO DE REPARO À LESÃO VASCULAR	16
1.5 IMPLICAÇÕES CLÍNICAS DO BLOQUEIO DA INTEGRINA Mac-1.....	18
2 OBJETIVOS	21
3 METODOLOGIA	23
3.1 MATERIAIS	24
3.2 DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS	25
3.3 TRATAMENTO COM ANTICORPO	25
3.4 LESÃO DA ARTÉRIA FEMORAL	26
3.5 RETIRADA DA ARTÉRIA FEMORAL E COLETA DE TECIDO	31
3.6 HISTOLOGIA E MORFOMETRIA	32
3.7 IMUNOHISTOQUÍMICA	34
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4 RESULTADOS	37
4.1 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE LEUCÓCITOS, NEUTRÓFILOS E MACRÓFAGOS NA ARTÉRIA FEMORAL DE CAMUNDONGOS APÓS A LESÃO VASCULAR COM O BLOQUEIO DA INTERAÇÃO $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α	38
4.2 EFEITO DO BLOQUEIO DA INTERAÇÃO $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR APÓS A LESÃO VASCULAR	44
4.3 EFEITO DO BLOQUEIO DA INTERAÇÃO $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α NA MORFOMETRIA QUANTITATIVA DAS ÁREAS INTIMAL E MEDIAL APÓS A LESÃO VASCULAR	45

4.4	MORFOMETRIA QUANTITATIVA DA LÂMINA ELÁSTICA EXTERNA DA ARTÉRIA FEMORAL DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ANTI-M2 APÓS A LESÃO VASCULAR.....	48
5	DISCUSSÃO	50
6	CONCLUSÕES	61
7	REFERÊNCIAS	63

LISTA DE ABREVIATURAS

BFGF	fator de crescimento básico de fibroblasto
BrDU	bromodeoxiuridina
C3bi	fragmento i do fator 3 do complemento
DMSO	dimetilsulfóxido
DP	desvio-padrão
EGF	fator de crescimento epidermal
FP4	fator plaquetário 4
F _v W	fator de von Willebrand
GP	glicoproteína
ICAM-1	molécula de adesão intercelular-1
IL	interleucina
IP	intraperitoneal
JAM-3	molécula juncional de adesão-3
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LFA-1	antígeno associado à função do leucócito-1
Mac-1	antígeno do macrófago-1
MCP-1	proteína quimioatraente de monócito-1
MIF	fator inibidor da migração de macrófagos
PAI-1	inibidor do ativador do plasminogênio-1
PCR	proteína-C reativa
PDGF	fator de crescimento derivado da plaqueta
PSGL-1	glicoproteína ligante da P-seletina-1
RANTES	célula T normal expressada e secretada, regulada após ativação
SC	subcutâneo
TGF- β	fator de crescimento de transformação- β
VCAM-1	molécula de adesão do endotélio-1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Recrutamento de leucócitos mediado por plaquetas no processo inflamatório vascular	10
Figura 2 - Anatomia da circulação arterial do membro inferior e abdominal de camundongos C57B1/6J.....	27
Figura 3 - Resposta inflamatória inicial à lesão em artéria femoral de camundongo.	29
Figura 4 - Adesão precoce de plaquetas e leucócitos em artéria femoral de camundongo lesada.....	30
Figura 5 - Corte transversal de artéria femoral de camundongo.....	33
Figura 6 - Fotografias de artérias femorais de camundongos após a lesão vascular.....	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Acúmulo de leucócitos (CD45+) na artéria femoral de camundongos após a lesão vascular.....	40
Gráfico 2 - Acúmulo de neutrófilos (Mab7/4+) na artéria femoral de camundongos após a lesão vascular.....	42
Gráfico 3 - Acúmulo de macrófagos (Mac-3+) na artéria femoral de camundongos após a lesão vascular.....	43
Gráfico 4 - Área intimal da artéria femoral de camundongos em 28 dias após a lesão vascular	47
Gráfico 5 - Razão entre a área da camada íntima e a área da camada média (I:M) em 28 dias após a lesão vascular	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise quantitativa de leucócitos, neutrófilos e macrófagos na artéria femoral de camundongos após a lesão vascular	39
Tabela 2 - Análise quantitativa da proliferação celular (células BrdU+) na artéria femoral de camundongos após a lesão vascular	44
Tabela 3 - Análise morfométrica das áreas intimal e medial da artéria femoral de camundongos após a lesão vascular	46
Tabela 4 - Área da lâmina elástica externa da artéria femoral de camundongos após a lesão vascular	49

RESUMO

Zago AC. *Importância da interação entre a integrina Mac-1 dos leucócitos e a glicoproteína Ib α das plaquetas para o recrutamento de leucócitos pelas plaquetas e para a resposta inflamatória à lesão vascular* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 83p.

INTRODUÇÃO: A interação entre leucócitos e plaquetas é fundamental para o início e a progressão da reestenose e da aterosclerose. Recentemente foi evidenciado em estudos *in vitro* que a integrina Mac-1 dos leucócitos se liga à glicoproteína Ib α (GPIb α) das plaquetas e que esta interação possui uma função central na firme adesão e transmigração de leucócitos em locais de deposição de plaquetas. Entretanto, não há estudos *in vivo* que avaliam a importância da interação entre a integrina Mac-1 dos leucócitos e a GPIb α das plaquetas ($\alpha_M\beta_2$ -GPIb α) em modelo experimental de lesão vascular. **MÉTODO:** Um peptídeo denominado M2 ou anticorpo anti-M2 foi desenvolvido para bloquear a interação da integrina Mac-1 dos leucócitos com a GPIb α das plaquetas, visando, deste modo, inibir a adesão de leucócitos na superfície do vaso coberta por plaquetas, a proliferação celular e a hiperplasia neointimal. Este peptídeo foi injetado e comparado com anticorpo-controle em camundongos C57B1/6J submetidos à lesão vascular da artéria femoral com corda-guia. Um dia (controle: n= 6; anti-M2: n= 6), 5 dias (controle: n= 9; anti-M2: n= 9) ou 28 dias (controle: n= 9; anti-M2: n= 9) após a lesão vascular, as artérias femorais foram retiradas para a realização de morfometria e imunohistoquímica. **RESULTADOS:** O bloqueio da interação $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α promoveu uma redução estatisticamente significativa de 75% do número de leucócitos na camada média no primeiro dia após a lesão vascular (controle: $7,9 \pm 5,0\%$ do total de células na camada média; *versus* anti-M2: $2,0 \pm 1,6\%$; p=0,021), bem como determinou uma diminuição estatisticamente significativa de 42% em 5 dias (controle: $42,3 \pm 12,9\%$ do total de células na neointima; *versus* anti-M2: $24,6 \pm 10,8\%$; p=0,047) e de 58% em 28 dias do acúmulo de leucócitos na neointima em desenvolvimento (controle: $7,9 \pm 3,0\%$ *versus* anti-M2: $3,3 \pm 1,3\%$; p=0,012). A proliferação celular na camada média do vaso em 5 dias pós-lesão vascular apresentou uma redução estatisticamente significativa de 64% com o bloqueio da interação $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α (controle: $5,0 \pm 2,9\%$ do total de células na camada média; *versus* anti-M2: $1,8 \pm 0,5\%$; p=0,043), assim como houve uma diminuição significativa de 47% da proliferação celular na camada íntima do vaso em 28 dias (controle: $3,8 \pm 1,7\%$ do total de células na camada íntima; *versus* anti-M2: $2,0 \pm 1,2\%$; p=0,047). O bloqueio da interação $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α também determinou uma redução estatisticamente significativa de 56% do espessamento intimal em 28

dias (controle: $10.395 \pm 3.549\mu\text{m}^2$; *versus* anti-M2: $4.561 \pm 4.915\mu\text{m}^2$; $p=0,012$). CONCLUSÕES: O recrutamento de leucócitos após a lesão vascular é dependente da interação $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α e a neutralização desta interação inibe a proliferação celular e a formação neointimal.

Descritores: 1. Moléculas de adesão celular 2. Inflamação 3. Leucócitos 4. Plaquetas 5. Reestenose

SUMMARY

Zago AC. The importance of leukocyte Mac-1 integrin and platelet Ib α glycoprotein interaction for the leukocyte recruitment by platelets and for the inflammatory response to the vascular injury. [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2006. 83p.

INTRODUCTION: The interaction between leukocytes and platelets is fundamental for the beginning and the progression of restenosis and atherosclerosis. Recent in vitro studies have shown that the leukocyte Mac-1 integrin binds to the platelet Ib α glycoprotein (GP) and this interaction plays a central role in the leukocyte firm adhesion and transmigration on sites with platelet deposition. However, there is no in vivo study evaluating the importance of Mac-1 integrin and GPIb α ($\alpha_M\beta_2$ -GPIb α) interaction in experimental models of vascular injury. **METHODS:** A peptide named M2 or anti-M2 antibody was developed to block the leukocyte Mac-1 and platelet GPIb α interaction, aiming to inhibit the adhesion of leukocytes on the surface of vessels covered with platelets, as well as the cellular proliferation and the neointimal hyperplasia. The peptide was injected and compared with control-antibody in C57B1/6J mice subjected to a femoral artery injury with guide-wire. One day (control: n= 6; anti-M2: n= 6), 5 days (control: n= 9; anti-M2: n= 9) or 28 days (control: n= 9; anti-M2: n= 9) after the vascular injury, the femoral arteries were harvested for morphometry and immunohistochemistry. **RESULTS:** The $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α interaction blockage promoted a statistically significant 75% reduction of leukocytes in the medial layer on the first day after the vascular injury (control: $7.9 \pm 5.0\%$ out of the total cells in the medial layer versus anti-M2: $2.0 \pm 1.6\%$; p=0.021), as well as determined a statistically significant 42% decrease in 5 days (control: $42.3 \pm 12.9\%$ out of the total cells in the neointima versus anti-M2: $24.6 \pm 10.8\%$; p=0.047) and a 58% decrease in 28 days of leukocyte accumulation in the developing neointima (control: $7.9 \pm 3.0\%$ versus anti-M2: $3.3 \pm 1.3\%$; p=0.012). The cellular proliferation in the vessel medial layer in 5 days after the vascular injury presented a statistically significant 64% reduction by the $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α interaction blockage (control: $5.0 \pm 2.9\%$ out of the medial layer total cells versus anti-M2: $1.8 \pm 0.5\%$; p=0.043), and there was also a significant 47% decrease in the vessel intimal layer cellular proliferation in 28 days (control: $3.8 \pm 1.7\%$ out of the total cells in the intimal layer versus anti-M2: $2.0 \pm 1.2\%$; p=0.047). Furthermore, the $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α interaction blockage determined a statistically significant 56% reduction in the intimal thickening in 28 days after the vascular injury (control: $10,395 \pm 3,549\mu\text{m}^2$ versus anti-M2: $4,561 \pm 4,915\mu\text{m}^2$; p=0.012). **CONCLUSIONS:** The leukocyte recruitment after the vascular injury depends on the $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α

interaction, and its neutralization inhibits cellular proliferation and neointimal thickening.

Keywords: 1. Cell adhesion molecules 2. Inflammation 3. Leukocytes 4. Platelets 5. Restenosis

1 INTRODUÇÃO

Evidências crescentes de estudos experimentais e clínicos fundamentam a compreensão da aterosclerose e da reestenose como um processo inflamatório. Nesse contexto, a inflamação é caracterizada pela interação entre plaquetas, leucócitos e células endoteliais.¹

Estudos experimentais e clínicos sugerem uma função central dos leucócitos na proliferação neointimal decorrente de lesão vascular. Em modelos experimentais de lesão vascular, os leucócitos recrutados são apontados como precursores da proliferação neointimal.^{2,3}

Nos estudos experimentais em que o implante de stent é utilizado para produzir um trauma mecânico profundo na parede do vaso, uma resposta inflamatória vigorosa e precoce é induzida, determinando uma abundante adesão local de neutrófilos e monócitos. Após dias e semanas, pode-se observar um acúmulo de macrófagos na neointima em desenvolvimento e ao redor das hastes do stent. A quantidade de monócitos/macrófagos na parede do vaso está diretamente associada com a área de hiperplasia neointimal, sugerindo uma relação causal dos monócitos/macrófagos com a reestenose.³

Um estudo realizado por Simon e colaboradores utilizando um modelo de lesão em artérias carótidas de camundongos evidenciou que a sinvastatina, a qual possui ações antiinflamatórias e antiproliferativas

independentes dos efeitos sobre o colesterol, ocasionou redução estatisticamente significativa da hiperplasia neointimal, da proliferação celular e do acúmulo de leucócitos na parede do vaso quando comparada ao placebo.⁴

Outro estudo, também realizado por Simon e colaboradores com o mesmo modelo experimental, demonstrou que o bloqueio do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), que é uma citocina pró-inflamatória amplamente expressa nas células vasculares, através de anticorpos monoclonais anti-MIF, determinou redução significativa da hiperplasia neointimal, da proliferação celular e da presença de células inflamatórias na parede vascular.⁵

Farb e colaboradores demonstraram, em um estudo anátomo-patológico de 116 segmentos arteriais com stents oriundos de 53 pacientes após intervenção coronária percutânea, uma forte relação entre dano na camada média, inflamação (presença de células inflamatórias) e hiperplasia neointimal.⁶

Marcadores sistêmicos de inflamação também são apontados como preditores de reestenose após intervenção coronária percutânea. Pacientes com angina estável e níveis séricos baixos de proteína-C reativa (PCR) em condições basais submetidos ao implante de stent apresentam aumento transitório dos níveis de PCR, os quais retornam aos níveis basais em 48 a 72

horas. Entretanto, níveis séricos de PCR persistentemente elevados após a intervenção coronária percutânea estão associados com reestenose clínica e angiográfica.⁷ Vários estudos independentes demonstraram, mediante a utilização de citometria de fluxo, que angioplastia com cateter-balão e implante de stent estão associados com hiper-regulação de CD11 dos neutrófilos, a qual correlaciona-se com reestenose clínica e perda luminal tardia, e que a ativação celular ocorreu através do vaso mecanicamente lesado.⁸⁻¹⁰

Portanto, os exemplos citados e vários outros estudos embasam a compreensão da reestenose, assim como da aterosclerose, como um processo inflamatório, em que os leucócitos contribuem com a estenose arterial mediante o espessamento neointimal devido ao seu volume no interior da camada íntima, à elaboração de fatores de crescimento e quimiotáticos, à geração de intermediários reativos ao oxigênio que ocasionam lesão e à produção de enzimas como metaloproteinases e catepsina S, que degradam os constituintes extracelulares e facilitam a migração celular.¹¹⁻¹⁵

1.1 IMPORTÂNCIA DAS PLAQUETAS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA VASCULAR

Nas lesões vasculares, proteínas como o fator de von Willebrand (FvW) e colágeno são expostos ao sangue, ocasionando a adesão de plaquetas

circulantes no local da lesão via FvW através dos receptores da glicoproteína (GP) Ib/IX/V¹⁶ e via colágeno mediante os receptores da GPVI¹⁷⁻¹⁹. A adesão das plaquetas resulta em sua ativação e transformação dos receptores integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa e receptor do fibrinogênio)^{20,21} e $\alpha_2\beta_1$ (receptor do colágeno)^{19,22}, os quais se ligam firmemente aos seus respectivos componentes na camada de células endoteliais. Subseqüentemente, as plaquetas aderidas formam uma superfície que propicia o recrutamento de plaquetas adicionais através de pontes de fibrinogênio entre receptores $\alpha_{IIb}\beta_3$. Deste modo, a adesão de plaquetas à matriz exposta é considerada a primeira etapa do processo inflamatório vascular.

Recentemente, o pré-requisito endotélio desnudo deixou de ser condição absoluta para a adesão de plaquetas à parede arterial, visto que estudos *in vitro* demonstraram a adesão de plaquetas no endotélio intacto, porém com células endoteliais ativadas.²³⁻²⁵ Estudos experimentais *in vivo* fornecem evidências de que a adesão de plaquetas ao endotélio intacto é semelhante à adesão de plaquetas a proteínas da matriz extracelular nos locais de lesão vascular, ou seja, é um processo de várias etapas, que envolve adesão seguida de rolamento e subseqüente firme adesão à parede vascular. Essas etapas envolvem receptores, seletinas e integrinas que induzem sinais de ativação de receptores específicos nas plaquetas e nas células endoteliais.²⁶⁻³²

Durante o processo de adesão, as plaquetas tornam-se ativadas e liberam um arsenal de potentes substâncias inflamatórias e mitogênicas no local, alterando as propriedades quimiotáticas, adesivas e proteolíticas das células endoteliais.³³ Essas alterações no fenótipo das células endoteliais promovem quimiotaxia, adesão e transmigração de monócitos no local da inflamação.¹

As plaquetas ativadas também secretam ou expõem proteínas de adesão (fibrinogênio, fibronectina, FvW, trombospondina, vitronectina, P-seletina, GPIIb/IIIa), fatores de crescimento (fator de crescimento derivado da plaqueta – PDGF, fator de crescimento de transformação- β – TGF- β , fator de crescimento epidermal – EGF, fator de crescimento básico de fibroblasto – bFGF), quimocinas (célula T normal expressada e secretada, regulada após ativação – RANTES, fator plaquetário 4 – FP4), proteína de ativação de neutrófilo epitelial 78, fatores semelhantes a citocinas (interleucina – IL – 1 β , CD40 ligante – CD40L, β -tromboglobulina) e fatores de coagulação (fatores V e XI, inibidor do ativador do plasminogênio-1 – PAI-1, plasminogênio, proteína S). Essas proteínas atuam de maneira conjunta e orquestrada em amplas e diferentes funções biológicas como adesão, agregação, quimiotaxia, apoptose, proliferação celular, coagulação e proteólise, processos os quais aceleram o recrutamento de células e, conseqüentemente, a atividade

inflamatória.¹ Dentre as proteínas anteriormente citadas, pode-se destacar: IL-1 β , RANTES, P-seletina, FP4 e CD40L.

A secreção de IL-1 β pelas plaquetas estimula a liberação da quimocina proteína quimioatraente de monócito-1 (MCP-1), da molécula de adesão $\alpha_v\beta_3$ e da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) pelas células endoteliais, que promovem a adesão de neutrófilos e monócitos ao endotélio vascular.³⁴⁻³⁶

Plaquetas ativadas podem liberar quimocinas e induzir a secreção de quimocinas em várias células da parede vascular, sendo que certas quimocinas podem aumentar a agregação plaquetária e a adesão juntamente com agonistas primários, deflagrando o recrutamento de monócitos. Uma dessas quimocinas é a RANTES, a qual tem sido relacionada com o recrutamento de monócitos em locais de lesão aterosclerótica (endotélio inflamado) através de moléculas de adesão P-seletina.³⁷⁻³⁹

Outra quimocina relevante ao processo inflamatório vascular secretada pelas plaquetas é o FP4, a proteína mais abundante secretada por plaquetas ativadas. Essa quimocina atua como quimio-atrativo para os monócitos, promovendo sua diferenciação em macrófagos⁴⁰. Também pode promover a retenção de lipoproteínas, agravando as ações aterogênicas da hipercolesterolemia, através da retenção de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) nas superfícies celulares pela inibição da degradação destas pelos

receptores LDL⁴¹. Adicionalmente, o FP4 aumenta de maneira expressiva a esterificação e captação de LDL oxidado pelos macrófagos⁴².

As plaquetas armazenam CD40L em grande quantidade, que é rapidamente liberado quando ativadas. O CD40L expresso na superfície de plaquetas ativadas liga-se ao CD40 das células endoteliais, estimulando a liberação de IL-8 e MCP-1, os quais constituem os principais quimio-atrativos de neutrófilos e monócitos. Por sua vez, o CD40L também aumenta a expressão de receptores endoteliais de adesão como a E-seletina, a molécula de adesão do endotélio-1 (VCAM-1) e a ICAM-1, os quais atuam como mediadores da adesão de neutrófilos, monócitos e linfócitos na parede do vaso inflamado.⁴³

Portanto, como discutido anteriormente, são complexos e ainda não totalmente compreendidos os mecanismos pelos quais as plaquetas aderem aos locais de lesão vascular. Entretanto, sabe-se que a adesão de plaquetas constitui uma das etapas iniciais do processo inflamatório e que a ativação destas é fundamental para a produção de proteínas mediadoras e moduladoras da inflamação vascular, assim como para o recrutamento de leucócitos que também são essenciais para a continuidade do processo inflamatório vascular.

1.2 RECRUTAMENTO DE LEUCÓCITOS MEDIADO POR PLAQUETAS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO VASCULAR

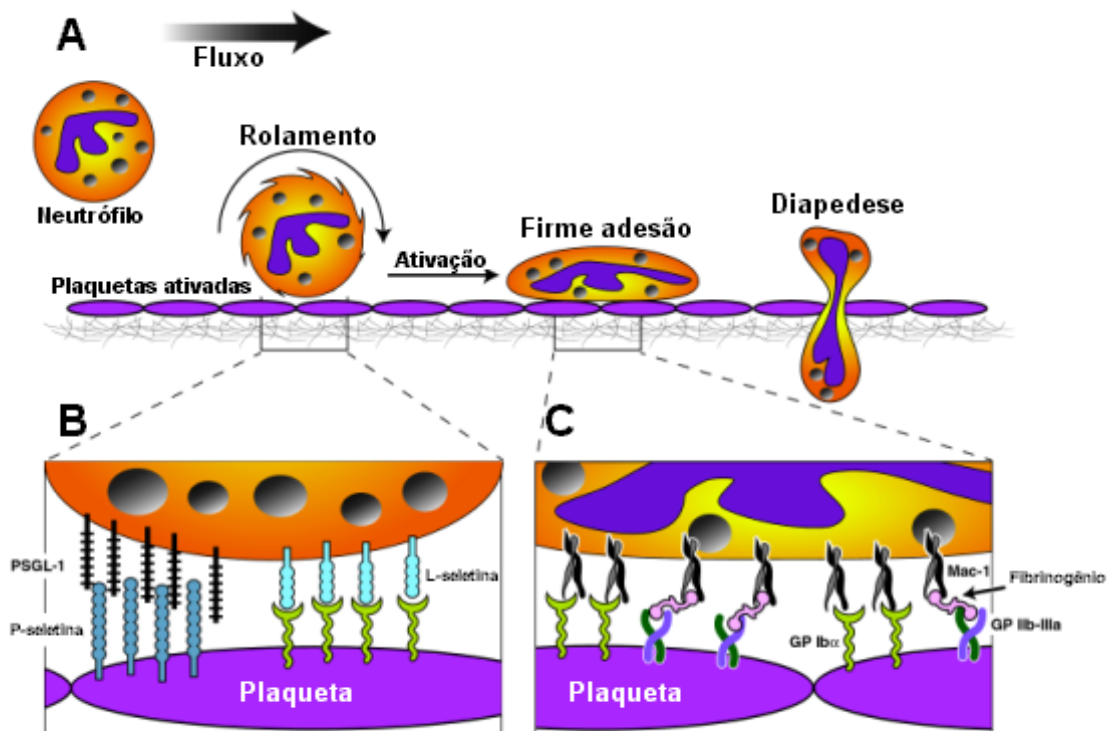
Uma vez aderidas à parede vascular, as plaquetas formam uma superfície adesiva para o recrutamento de leucócitos circulantes, assim, requerendo uma série de eventos adesivos e sinalizadores que resultam na infiltração de células inflamatórias na parede vascular.

As etapas do recrutamento de leucócitos são: adesão mediada por seletinas e rolamento sobre a superfície de plaquetas, ativação dos leucócitos, firme adesão mediada por integrinas e diapedese (Figura 1).⁴⁴⁻⁴⁶

Os leucócitos são inicialmente aderidos à superfície composta por plaquetas ativadas. A seguir, há o rolamento dos leucócitos sobre esta superfície, por intermédio das P-seletinas expressas na superfície das plaquetas que se ligam às glicoproteínas ligantes das P-seletinas-1 (PSGL-1), expressas na superfície dos leucócitos. As L-seletinas expressas na superfície dos leucócitos também participam desta etapa. Deve-se salientar que esta interação plaquetas-neutrófilos mediada pela P-seletina na primeira etapa do recrutamento de leucócitos é reversível (Figura 1).⁴⁶⁻⁵²

Após a adesão e rolamento de leucócitos sobre a superfície de plaquetas ativadas, ocorre a ativação dos leucócitos por intermédio de citocinas e receptores de superfície.⁴⁶

Figura 1 - Recrutamento de leucócitos mediado por plaquetas no processo inflamatório vascular



A. Etapas do recrutamento de leucócitos. B. Etapa de rolamento de leucócitos sobre uma superfície de plaquetas mediada por seletinas. C. Etapa de firme adesão de leucócitos sobre uma superfície de plaquetas via integrina Mac-1 e seus ligantes.

A próxima etapa é a de firme adesão de leucócitos à superfície de plaquetas ativadas, que é um processo mediado por integrinas da família β_2 : antígeno associado à função do leucócito-1 (LFA-1, $\alpha_L\beta_2$ ou CD11a/CD18), antígeno do macrófago-1 (Mac-1, $\alpha_M\beta_2$ ou CD11b/CD18) e integrina p150,95 ($\alpha_X\beta_2$ ou CD11c/CD18). Essas integrinas também se ligam a ligantes

endoteliais como as ICAM-1 e ICAM-2, proteínas da matriz extracelular associadas ao endotélio como o fibrinogênio e/ou a glicosaminoglicanos.^{53,54}

Entre as integrinas dos leucócitos acima citadas, destaca-se a Mac-1, a qual, em um estudo realizado por Diacovo e colaboradores, foi responsável por mediar em mais de 90% o processo de firme adesão de neutrófilos a uma superfície de plaquetas.⁴⁶ Segundo o mesmo estudo, as integrinas LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18) e p150,95 ($\alpha_x\beta_2$, CD11c/CD18) não desempenham função significativa neste processo. Portanto, a firme adesão dependente da integrina β_2 via Mac-1 foi o principal mecanismo responsável pelo aprisionamento de neutrófilos ativados por intermédio de plaquetas ativadas aderidas à superfície vascular.

Estudos clínicos recentes respaldam a importância da integrina Mac-1, pois demonstram hiper-regulação desta integrina na reestenose após angioplastia coronária, o que não ocorre com as demais integrinas β_2 , ou seja, LFA-1 e p150,95.⁵⁵

As propriedades ligantes multivalentes da integrina Mac-1 a tornam única na regulação da adesão de leucócitos no processo inflamatório após a lesão vascular. Essa integrina é capaz de se ligar ao fibrinogênio, às ICAM-1 e ao fator X, que constituem ligantes abundantes na parede vascular lesada. A integrina Mac-1 também é considerada o principal receptor do fibrinogênio

no leucócito, facilitando a adesão e a transmigração de neutrófilos e monócitos em locais de deposição de fibrina e plaquetas.⁵⁵

Um estudo *in vitro*, realizado com o bloqueio da integrina Mac-1 de monócitos via anticorpo M1/70, evidenciou inibição dose-dependente da ligação com o fibrinogênio.⁵⁵ Outros dois estudos envolvendo neutrófilos de pacientes que apresentam leucócitos com deficiência de adesão, caracterizada pela ausência geneticamente determinada de integrinas β_2 , demonstraram que estes neutrófilos são capazes de efetuar os processos de adesão e rolamento dependentes de seletinas, semelhante aos neutrófilos de pacientes hígidos, entretanto não são capazes de aderir firmemente à superfície de células endoteliais devido à ausência de integrinas β_2 , especialmente da integrina Mac-1, que é a principal responsável por este processo.^{56,57}

A interação de leucócitos e plaquetas via integrina Mac-1 dos leucócitos ocorre mediante ligantes na superfície das plaquetas, como os receptores GPIIb/IIIa, o fibrinogênio que se liga aos receptores plaquetários GPIIb/IIIa, as ICAM e as moléculas juncionais de adesão-3 (JAM-3) (Figura 1).⁵⁴

Uma vez que os leucócitos encontram-se firmemente aderidos às plaquetas na camada endotelial do vaso, inicia-se a última etapa do processo

de recrutamento de leucócitos, a qual é denominada diapedese e que consiste na migração do leucócito para o interior da parede do vaso.

1.3 INTERAÇÃO ENTRE LEUCÓCITOS E PLAQUETAS VIA RECEPTORES Mac-1 E GPIb α

Apesar da integrina Mac-1 ser capaz de se ligar a vários ligantes, não está definido o ligante responsável pelo acúmulo de leucócitos em locais de lesão vascular.

Integrinas são proteínas compostas por uma subunidade α e uma subunidade β . As integrinas que apresentam a subunidade α_m contêm um domínio (domínio I) composto por aproximadamente 200 aminoácidos que está envolvido em sítios de ligação⁵⁸ e é muito semelhante aos domínios A do FvW⁵⁹. O domínio A1 do FvW é responsável por mediar sua interação com o receptor plaquetário, ou seja, um componente do complexo das GPs Ib-IX-V. Devido à similaridade do domínio A1 do FvW com o domínio I da subunidade α da integrina Mac-1, desenvolveu-se a hipótese de que a GPIb α pudesse também ser capaz de se ligar à integrina Mac-1.

Essa hipótese foi avaliada em um estudo realizado por Simon e colaboradores, em que monócitos e células que expressam a integrina Mac-1 aderiram a poços de placas de cultura de tecido cobertos com GPIb α . Nesse

mesmo estudo, a especificidade da interação entre Mac-1 e GPIb α foi confirmada através da ligação de neutrófilos oriundos de camundongos selvagens com GPIb α purificado e com plaquetas, o que não ocorreu com neutrófilos provenientes de camundongos com deficiência da integrina Mac-1. Outro dado que corrobora a hipótese avaliada foi a inibição da adesão de neutrófilos oriundos de camundongos selvagens a plaquetas tratadas com mocaragina, uma protease que causa a clivagem específica de GPIb α . Ainda, nesse mesmo estudo, foi demonstrada a firme adesão de células THP-1, que contêm receptores Mac-1, a uma superfície composta por GPIb α , em fluxo contínuo.⁶⁰

Portanto, as observações anteriormente descritas permitem concluir que a integrina Mac-1 do leucócito interage com a GPIb α da plaqueta e que, nas condições em que o estudo foi realizado, a interação entre neutrófilos e plaquetas foi predominantemente entre os receptores Mac-1 e GPIb α .

O domínio I da subunidade α da integrina Mac-1 (domínio $\alpha_M I$) contribui amplamente para o reconhecimento de ligantes pela integrina Mac-1⁵⁸ e especificamente para a ligação da GPIb α da plaqueta⁶⁰. Essa região (domínio $\alpha_M I$) também está envolvida na ligação com ICAM-1, fragmento i do fator 3 do complemento (C3bi) e fibrinogênio^{61,62}.

Simon e colaboradores recentemente localizaram o sítio de ligação da integrina Mac-1 com a GPIb α dentro do segmento $\alpha_M(P^{201}-K^{217})$ do domínio α_M I, utilizando a estratégia baseada nas diferenças da ligação entre a GPIb α e os domínios I α_M I e α_L I. Este estudo envolveu vários experimentos independentes, incluindo pesquisa de células mutantes, peptídeos sintéticos, mutagênese e análises tipo ganho de função.⁵⁴ A inserção de somente dois aminoácidos dentro do segmento α_L I converteu-o em uma proteína ligante a GPIb α . Assim sendo, pode-se concluir que um pequeno segmento com uma estrutura definida dentro do domínio α_M I da integrina Mac-1 é necessário e suficiente para a ligação com a GPIb α .

A compreensão da função biológica da integrina Mac-1 está intimamente relacionada à identificação do ligante biologicamente relevante para esta integrina. Deste modo, avaliou-se, em um estudo *in vitro*, a hipótese de que um anticorpo específico ao segmento $\alpha_M(P^{201}-K^{217})$ reduziria a adesão entre a integrina Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) e a GPIb α , sem interferir nos outros ligantes, como descrito adiante, assim como também inibiria o acúmulo local de leucócitos após a lesão vascular *in vivo*, como avaliado no presente estudo.

1.4 PROCESSO DE REPARO À LESÃO VASCULAR

O processo de reparo à lesão vascular envolve células endoteliais, plaquetas e leucócitos, que interagem entre si mediante citocinas, quimocinas e outras proteínas sinalizadoras.

Este processo constitui-se de várias etapas e inicia-se imediatamente após a angioplastia por cateter-balão ou implante de stent, com a de-
endotelização da superfície do vaso, o esmagamento da placa ateromatosa com freqüente dissecção envolvendo a camada média e ocasionalmente também a camada adventícia e o estiramento da artéria.^{45,63}

A seguir, uma camada composta de plaquetas e fibrina deposita-se no segmento vascular lesado e as plaquetas ativadas expressam moléculas de adesão como as P-seletinas, que interagem com as PSGL-1 na superfície dos leucócitos, ocasionando a adesão e rolamento dos mesmos na superfície vascular.^{45,63}

Na seqüência, ocorre a etapa de firme adesão dos leucócitos por intermédio de integrinas, em que se destaca a integrina β_2 Mac-1, a qual se liga, diretamente, ao receptor plaquetário GPIIb/IIIa e, indiretamente, através do fibrinogênio ao receptor plaquetário GPIIb/IIIa.

A migração de leucócitos, através da camada de plaquetas e fibrina para o interior da parede arterial (diapedese), é dependente de gradientes químicos

de quimocinas, as quais são liberadas por células musculares lisas e macrófagos residentes na parede do vaso.^{45,63}

A próxima etapa é a de proliferação celular ou granulação, em que fatores de crescimento liberados pelas plaquetas, leucócitos e células musculares lisas estimulam a migração de células musculares lisas da camada média para a neoíntima. Assim sendo, a neoíntima resultante consiste de células musculares lisas, matriz extracelular e macrófagos recrutados durante o período de várias semanas. A divisão celular também ocorre nesta etapa e parece ser essencial ao desenvolvimento da reestenose.^{45,63}

Após um período de semanas/meses, inicia-se o remodelamento vascular, que envolve a degradação da proteína da matriz extracelular e re-síntese, simultaneamente com a diminuição de elementos celulares e aumento da produção de matriz extracelular. A matriz extracelular, que é composta por vários subtipos de colágenos e por proteoglicanos⁶⁴, constitui o principal componente da placa reestenótica madura⁶⁵.

Na angioplastia com cateter-balão, a reorganização das células endoteliais, mediante a substituição de moléculas hidratadas por colágeno, pode levar ao remodelamento negativo do vaso (diminuição do diâmetro). Enquanto nas artérias tratadas com implante de stent, esta fase apresenta um

impacto menor devido ao mínimo remodelamento negativo, pois o stent atua como uma estrutura mecânica que mantém o diâmetro do vaso.⁶⁶⁻⁶⁸

Em ambas as técnicas, angioplastia com cateter-balão ou implante de stent, a re-endotelização ocorre em escala variável, sendo o principal mecanismo de reestenose em artérias tratadas com implante de stent. Convém salientar que alguns constituintes da camada de células endoteliais, tais como hialurona, fibronectina, osteopontina e vitronectina também facilitam a migração de células musculares lisas para a neoíntima.^{67,68}

1.5 IMPLICAÇÕES CLÍNICAS DO BLOQUEIO DA INTEGRINA Mac-1

Como discutido anteriormente, constatou-se a importância da interação da integrina Mac-1 dos leucócitos com o receptor GPIIb/IIIa das plaquetas na etapa de firme adesão de leucócitos (recrutamento de leucócitos) do processo inflamatório de reparo à lesão vascular. Essa etapa possui repercussões clínicas tanto na reestenose, principalmente intra-stent, onde a hiperplasia neointimal constitui o principal mecanismo fisiopatológico, como na formação da aterosclerose, na qual as plaquetas também estão envolvidas no recrutamento de leucócitos.

Assim sendo, estudos experimentais foram realizados para avaliar os efeitos do bloqueio da integrina Mac-1 na atenuação da resposta inflamatória

à lesão vascular. Um desses estudos avaliou o uso de um anticorpo anti-CD11b, chamado M1/70, no bloqueio da integrina Mac-1 em coelhos submetidos à angioplastia com cateter-balão ou implante de stent. Os resultados mostraram redução superior a duas vezes no recrutamento de leucócitos em 3, 6 e 14 dias após a lesão vascular, assim como diminuição estatisticamente significativa da proliferação neointimal em 14 dias após a angioplastia com cateter-balão ou com implante de stent em relação ao grupo controle.⁵⁵

Outro estudo realizado, em que camundongos geneticamente modificados, ou seja, apresentando deficiência de integrina Mac-1, foram submetidos à dilatação da artéria carótida com posterior desnudamento endotelial da mesma, evidenciou diminuição da migração e do acúmulo de leucócitos na parede arterial dos camundongos com deficiência de Mac-1 em relação ao grupo controle. Esse estudo também mostrou correlação entre a diminuição do acúmulo de leucócitos e a atenuação da proliferação neointimal após a lesão vascular, corroborando a hipótese de que a integrina Mac-1 desempenha função importante no processo inflamatório vascular.⁶⁹

Um estudo de adesão *in vitro* com o peptídeo M2 ou anticorpo anti-M2 mostrou que este inibiu significativamente a adesão de células 293, que expressam a integrina Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$), à sGPIb α , em 80%, quando comparado ao anticorpo controle, apresentando pouco ou nenhum efeito na adesão de

células 293 ao fibrinogênio (21%), à JAM-3 (13%) e à ICAM-1 (0%). Portanto, o peptídeo M2 inibe a adesão $\alpha_M\beta_2$ -sGPIb α , mas não a adesão $\alpha_M\beta_2$ com outros ligantes. No mesmo estudo, o peptídeo M2 inibiu a adesão de leucócitos humanos a plaquetas sob fluxo e esta inibição foi dose-dependente, pois doses de 1 μ g/ml, 5 μ g/ml e 25 μ g/ml de anti-M2 ocasionaram firme adesão de leucócitos nos seguintes percentuais: 48%, 21,5% e 7,9% ($p < 0,01$), respectivamente.⁷⁰

A aplicação de anticorpos anti-CD11b para o bloqueio da integrina Mac-1 poderia ser uma terapêutica muito eficaz para a prevenção da reestenose nas intervenções coronárias percutâneas, assim como poderia também ser testada e apresentar resultados interessantes na aterosclerose. Entretanto, como a integrina Mac-1 atua na regulação de funções essenciais desempenhadas pelos leucócitos, como adesão, migração, coagulação, proteólise, fagocitose, estresse oxidativo e sinalização^{53,71,72}, o completo bloqueio desta integrina poderia causar efeitos adversos importantes e potencialmente letais.

Deste modo, torna-se relevante a identificação precisa do sítio de ligação da integrina Mac-1 com o receptor plaquetário GPIb α para que se possa estabelecer um alvo terapêutico biologicamente eficaz e clinicamente seguro para a prevenção e o tratamento da trombose, aterosclerose e reestenose.

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos avaliar:

(1) a importância da interação entre a integrina Mac-1 dos leucócitos e a glicoproteína Ib α das plaquetas para o recrutamento de leucócitos após a lesão vascular; e

(2) o efeito da neutralização da interação entre a integrina Mac-1 e a glicoproteína Ib α sobre a proliferação celular e a hiperplasia neointimal desencadeadas por lesão vascular.

3 *METODOLOGIA*

3.1 MATERIAIS

Peptídeos correspondentes ao sítio de ligação da integrina Mac-1 nos receptores GPIIb α de camundongos (SGSG-²¹⁴LYFRHWLQENANNVYL²²⁹-C) e peptídeos controle (SGSG-VEAFHLNYYRNNVWLQ-C) foram obtidos do W.M. Keck Biotechnology Resource Center (Yale University, New Haven, CT, EUA). Os peptídeos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenados a -80°C.

Cincoenta e três camundongos machos C57Bl/6J, com idade entre 8 e 10 semanas, foram obtidos do viveiro da Harvard University (Boston, MA, EUA).

O marcador do antígeno comum leucocitário (CD45) – anticorpo anti-CD45 – foi adquirido da BD Biosciences (San Diego, CA, EUA); o marcador específico para neutrófilos de camundongos - anticorpo monoclonal 7/4 - foi fornecido pela Serotec (Indianápolis, IN, EUA); o marcador Mac-3 específico para macrófagos de camundongos – anticorpo monoclonal M3/84 – foi adquirido da BD Biosciences e a bromodeoxiuridina (BrdU) foi fornecida pela DAKO (Carpinteria, CA, EUA).

3.2 DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS

Um anticorpo policlonal peptídeo-específico denominado peptídeo M2 ou anticorpo anti-M2, com afinidade ao sítio de ligação da integrina Mac-1 ao receptor GPIIb α , foi desenvolvido mediante a imunização de coelhos com o peptídeo C-²⁰¹PITQLLGRTHTATGIRK²¹⁷ acoplado a KLH (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, EUA), correspondendo à seqüência humana α_m (P²⁰¹-K²¹⁷).

A seguir, foram realizados testes sangüíneos que demonstraram altos títulos de anti-soro ligados à fase sólida imobilizada, contendo a seqüência de aminoácidos C-P²⁰¹-K²¹⁷.

A última etapa foi a purificação do anticorpo policlonal peptídeo-específico – anticorpo anti-M2 ou peptídeo M2 – por cromatografia de afinidade (Zymed Laboratories).

Imunoglobulina IgG de coelhos não imunizados foi usada como anticorpo de controle.

3.3 TRATAMENTO COM ANTICORPO

Os camundongos C57Bl/6J foram divididos em 2 grupos de tratamento:

- peptídeo M2 de coelhos; e

- imunoglobulina IgG de coelhos não imunizados.

O peptídeo M2 ou anticorpo anti-M2 foi injetado com o objetivo de bloquear a interação da integrina Mac-1 dos leucócitos com a GPIb α das plaquetas, visando, deste modo, inibir a adesão de leucócitos na superfície do vaso coberta por plaquetas. A imunoglobulina IgG de coelhos não imunizados foi injetada para servir como controle, visto que não interage com a integrina Mac-1 dos leucócitos ou com a GPIb α das plaquetas, assim como não apresenta efeito inibitório na adesão entre leucócitos e plaquetas.

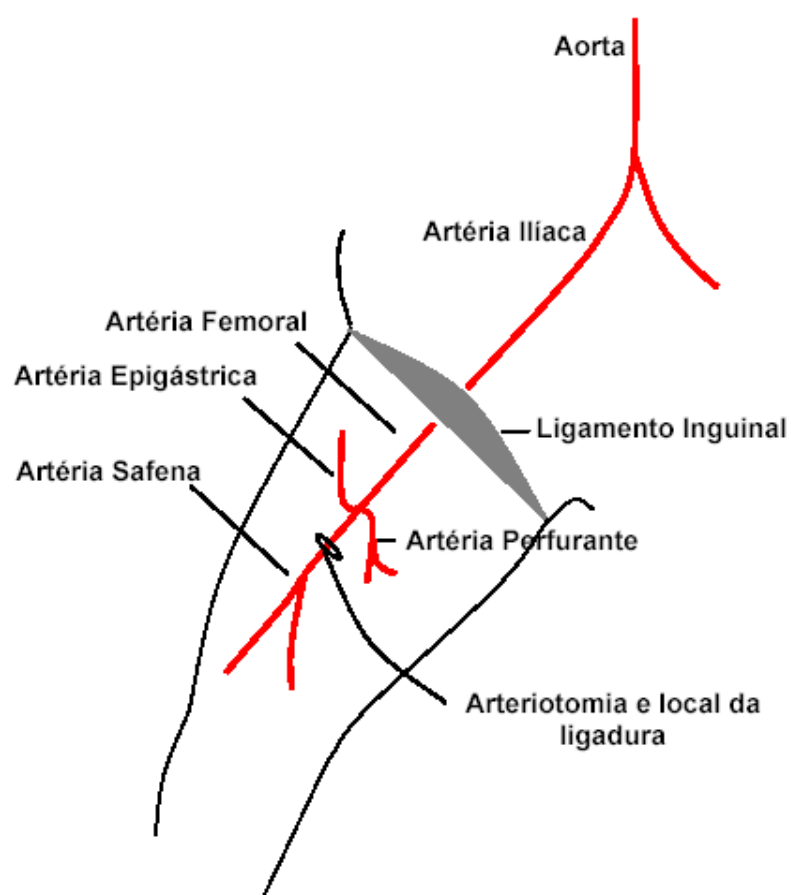
Os anticorpos foram injetados via intraperitoneal em uma dose de 250 μ g, quatro horas antes da lesão da artéria femoral (dia 0) e posteriormente em uma dose de 100 μ g intraperitoneal 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias após a lesão da artéria femoral.

3.4 LESÃO DA ARTÉRIA FEMORAL

Camundongos C57B1/6J machos com idade entre 8 e 10 semanas foram anestesiados no dia 0 com quetamina (80 mg/kg SC) e xilazina (5mg/kg SC). A seguir, foi realizada uma incisão na virilha, dissecação e exposição da artéria femoral, clampeamento temporário da artéria femoral no nível do ligamento inguinal e arteriotomia distal à artéria epigástrica sob visualização com microscópio cirúrgico.

Uma corda-guia 0,010” foi inserida na artéria femoral pelo orifício da arteriotomia, o clampeamento foi removido e a corda-guia foi avançada até a bifurcação com a aorta e recuada até a posição anterior por 3 vezes (total de 3 inserções), visando causar lesão endoluminal na artéria femoral comum. Após a retirada da corda-guia, o local da arteriotomia foi ligado (Figura 2).

Figura 2 - Anatomia da circulação arterial do membro inferior e abdominal de camundongos C57B1/6J.⁷³

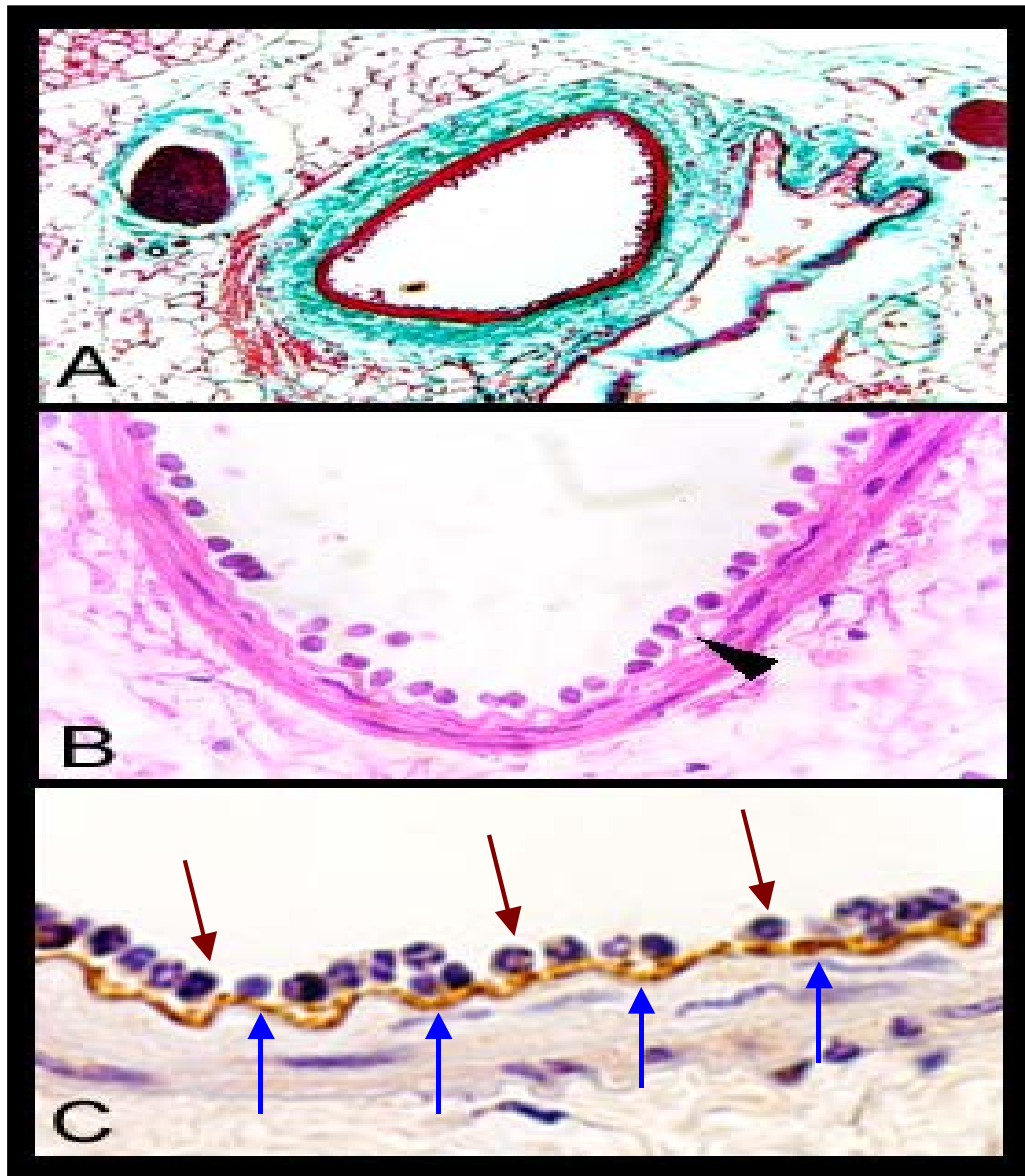


Observa-se o local da arteriotomia distal à artéria epigástrica.

Essa técnica de lesão da artéria femoral em camundongos foi descrita por Roque e colaboradores. Conforme o artigo publicado por Roque, a técnica ocasionou o desnudamento completo do endotélio do vaso lesado em 100% dos casos estudados. Uma hora após a lesão, observou-se a presença de uma camada de leucócitos, predominantemente neutrófilos, aderidos sobre uma fina camada de plaquetas (Figura 3). Em uma semana, plaquetas e macrófagos foram observados na superfície luminal do vaso lesado. As artérias femorais de camundongos utilizados como controle não apresentaram plaquetas e leucócitos na superfície luminal (Figura 4).⁷³

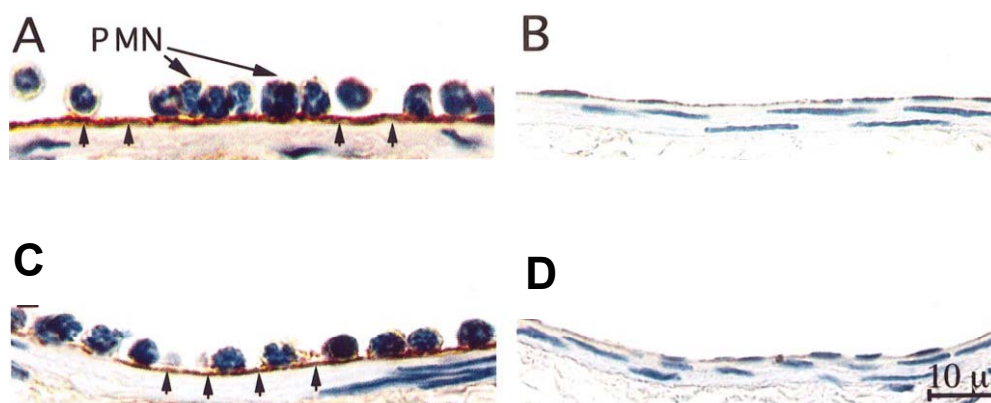
Nesse mesmo estudo de Roque e colaboradores, a hiperplasia intimal, definida como uma lesão proliferativa localizada entre a superfície endotelial e a lâmina elástica interna, cobriu $87 \pm 4,3\%$ da extensão da lâmina elástica interna em 2 semanas e $89 \pm 6\%$ em 4 semanas. A área intimal média foi de $9.655 \pm 1.258\mu\text{m}^2$ em 28 dias e a razão área da íntima/área da média foi de $1,1 \pm 0,1$ em 28 dias. Não houve proliferação intimal nas artérias dos camundongos-controle, portanto, a razão entre a área da íntima e a área da média foi igual a zero. A análise histológica por meio da coloração com α -actina mostrou que as células musculares lisas foram os principais componentes celulares da proliferação neointimal decorrente da lesão vascular.⁷³

Figura 3 - Resposta inflamatória inicial à lesão em artéria femoral de camundongo.



A. Corte transversal de artéria femoral de camundongo submetida à lesão com corda-guia. B. Presença de leucócitos (neutrófilos) sobre a superfície luminal da artéria femoral (seta curta) (200X). C. Neutrófilos (setas vermelhas) aderidos a uma fina camada de plaquetas em castanho (setas azuis) que envolve a superfície luminal do vaso (400X).⁷³

Figura 4 - Adesão precoce de plaquetas e leucócitos em artéria femoral de camundongo lesada.



- A e C. Corte transversal de artéria femoral lesada.
- B e D. Corte transversal de artéria femoral não lesada (controle).
- A e B. Coloração com anticorpo específico para antígeno plaquetário. As setas longas indicam leucócitos (neutrófilos) e as setas curtas a camada de plaquetas coradas.
- C e D. Coloração com anticorpo para os receptores P-seletina das plaquetas. As setas curtas indicam a camada de plaquetas coradas.⁷³

A lesão por corda-guia determina desnudamento do endotélio, deposição de plaquetas e fibrina e inflamação vascular proeminente⁷³, o que torna este modelo experimental útil em demonstrar a função de células inflamatórias (leucócitos) recrutadas na modulação da formação neointimal.^{12,74,75}

Conforme exposto acima, o modelo experimental descrito por Roque e utilizado neste estudo assemelha-se muito com o processo de reparo à lesão vascular, observado em humanos após intervenção coronária percutânea com implante de stent.

Todos os animais sobreviveram até o momento da eutanásia planejada sem sangramento ou sinais de infecção.

Os procedimentos e cuidados com animais foram revisados e aprovados pelo Harvard Medical School Standing Committee on Animals, que segue as regras estabelecidas pela American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care e pelo National Institutes of Health.

3.5 RETIRADA DA ARTÉRIA FEMORAL E COLETA DE TECIDO

Um dia (anticorpo de controle: n= 6; anti-M2: n= 6), 5 dias (anticorpo de controle: n= 9; anti-M2: n= 9) ou 28 dias (anticorpo de controle: n= 9; anti-M2: n= 9) após a lesão vascular, foi administrada anestesia, a cavidade peitoral foi aberta e a eutanásia dos animais foi realizada por sangramento mediante incisão no átrio direito.

Um cateter tipo butterfly (medida= 22) foi inserido no ventrículo esquerdo para perfusão *in situ* de solução salina 0,9%, seguida de fixação com

paraformaldeído 4% em 0,1M de tampão fosfato (pH= 7,3) por 10 minutos, a uma pressão de 100mmHg.

As artérias femorais direita e esquerda foram retiradas e imersas em paraformaldeído tamponado para posterior análise de morfometria e imunohistoquímica.

Todos os animais receberam BrdU na dose de 50mg/kg intraperitoneal (IP), 18 horas e 1 hora antes da eutanásia, para avaliar a proliferação celular na parede da artéria femoral.

O baço e o intestino delgado de 3 animais foram utilizados como controle das reações de imunohistoquímica, devido a presença de abundante tecido linfóide (leucócitos) nesses tecidos.

3.6 HISTOLOGIA E MORFOMETRIA

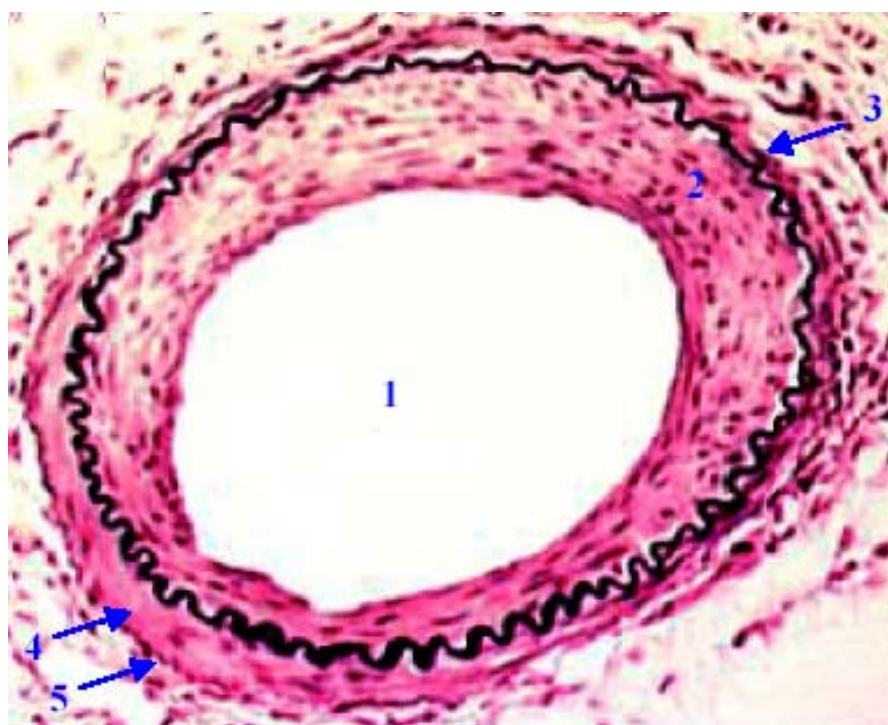
As artérias femorais retiradas foram inicialmente fixadas em formalina e posteriormente processadas e emblocadas em parafina. Foram realizados 2 cortes transversais com 1mm de distância entre os mesmos, os quais foram corados pela técnica de hematoxilina/eosina e pela coloração de Verhoeff.

Um pesquisador sem conhecimento do grupo tratamento aferiu as áreas luminal, intimal e medial de cada plano transversal, utilizando um microscópio

equipado com uma câmera CCD acoplada a um computador com o software NIH Image v1.60 (Figura 5).

A área luminal foi definida como a área interna cercada pela camada de células endoteliais; a área intimal foi definida como a área entre o lúmen e a lâmina elástica interna; e a área medial foi definida como a área entre as lâminas elásticas interna e externa.

Figura 5 - Corte transversal de artéria femoral de camundongo.



1. Lúmen. 2. Neoíntima. 3. Lâmina elástica interna. 4. Média. 5. Lâmina elástica externa.

Também foi calculada a razão entre as áreas intimal e medial (área intimal/área medial), para avaliar o efeito da inibição da interação Mac-1-GPIb α nesta relação, assim como para permitir futuras comparações com modelos experimentais utilizando animais de maior porte.

A área delimitada pela lâmina elástica externa foi aferida para avaliar o comportamento do tamanho do vaso nos dois grupos no decorrer do tempo, ou seja, determinar se houve remodelamento positivo ou negativo do vaso.

Os resultados dos 2 cortes transversais de cada artéria foram utilizados para o cálculo da média, a qual foi considerada na avaliação e análise estatística dos dados.

Para o cálculo da área medial e a avaliação da lâmina elástica externa em condições basais, ou seja, antes da lesão ou tratamento com anticorpo anti-M2, um grupo de camundongos (n=5) foi sacrificado para a realização de morfometria quantitativa.

3.7 IMUNOHISTOQUÍMICA

A imunohistoquímica foi realizada utilizando a técnica de imunoperoxidase pelo sistema avidina-biotina, utilizando-se os anticorpos anti-CD45 (antígeno comum leucocitário) de camundongos, marcador específico

para neutrófilos de camundongos (anticorpo monoclonal 7/4), marcador Mac-3 específico para macrófagos de camundongos (anticorpo monoclonal M3/84) e BrdU.

O anticorpo anti-CD45 reage tanto com aloantígenos como com todas as isoformas do antígeno comum leucocitário CD45+. O CD45 é uma glicoproteína transmembrânica expressa em altos níveis na superfície celular de todas as células de origem hematopoiética, exceto eritrócitos. Sua presença distingue os leucócitos dos eritrócitos e das células não-hematopoiéticas.

O anticorpo monoclonal 7/4 reconhece o antígeno 7/4 que é uma glicoproteína polimórfica presente na superfície celular de neutrófilos.

O anticorpo monoclonal M3/84, também denominado anti-CD163, reage com o receptor Mac-3, específico de macrófagos, que é uma glicoproteína expressa na superfície celular de macrófagos. Convém destacar que esta glicoproteína não é expressa por monócitos, células precursoras dos macrófagos.

A BrdU utiliza a substituição de nucleotídeo para trocar timidina por uridina na estrutura do DNA de células em divisão, tanto *in vitro* como *in vivo*. A identificação das células marcadas por esta técnica permite avaliar e quantificar a proliferação de células jovens ou recém-formadas. Portanto, esta

técnica constitui uma importante ferramenta na avaliação da proliferação de células musculares lisas, que predominam na composição da hiperplasia neointimal decorrente da resposta inflamatória à lesão vascular.

Cortes transversais de artéria femoral, corados imunologicamente, foram avaliados para quantificar o número de células positivamente imunocoradas em relação ao número total de células.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média \pm desvio-padrão (DP); as comparações entre os grupos foram realizadas por teste *t* não pareado; e os valores de probabilidade foram considerados estatisticamente significativos quando inferiores a 0,05.

4 RESULTADOS

A importância da interação $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α no recrutamento de leucócitos e na formação da neoíntima foi determinada através da lesão da artéria femoral com corda-guia em camundongos tratados com anticorpo anti-M2 ou IgG não-imune (controle) antes e intercaladamente durante 12 dias após a lesão.

4.1 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE LEUCÓCITOS, NEUTRÓFILOS E MACRÓFAGOS NA ARTÉRIA FEMORAL DE CAMUNDONGOS APÓS A LESÃO VASCULAR COM O BLOQUEIO DA INTERAÇÃO $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α

Primeiramente, examinou-se o recrutamento de leucócitos pós-lesão em relação ao tempo. A função da interação $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α neste processo foi estabelecida, visto que houve diferença no acúmulo de leucócitos na parede do vaso do grupo de camundongos tratados com o peptídeo M2 ou anti-M2 em comparação ao grupo controle.

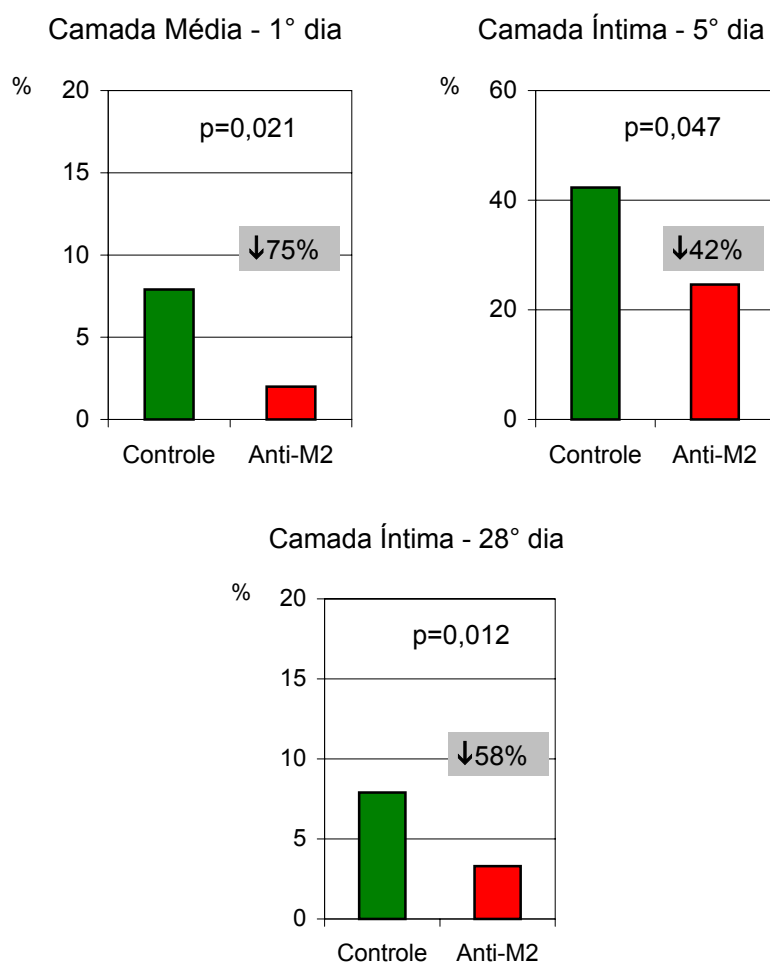
As células inflamatórias CD45-positivas (leucócitos) invasoras da camada média do vaso no primeiro dia pós-lesão foram reduzidas em 75%, ou seja, de $7,9 \pm 5,0\%$ do total de células na camada média do grupo de camundongos tratados com IgG não-imune (controle) para $2,0 \pm 1,6\%$ no grupo tratado com anti-M2 ($p=0,021$) (Tabela 1) (Gráfico 1) (Figura 6).

O acúmulo de leucócitos na neointima em desenvolvimento também foi significativamente reduzido mediante o tratamento com anti-M2, pois houve uma redução de 42% em 5 dias (controle: $42,3 \pm 12,9\%$ do total de células na neointima *versus* anti-M2: $24,6 \pm 10,8\%$; $p=0,047$) e de 58% em 28 dias (controle: $7,9 \pm 3,0\%$ *versus* anti-M2: $3,3 \pm 1,3\%$; $p=0,012$) no grupo de camundongos tratados com anti-M2 em comparação ao grupo controle (Tabela 1) (Gráfico 1) (Figura 6).

Tabela 1 - Análise quantitativa de leucócitos, neutrófilos e macrófagos na artéria femoral de camundongos após a lesão vascular

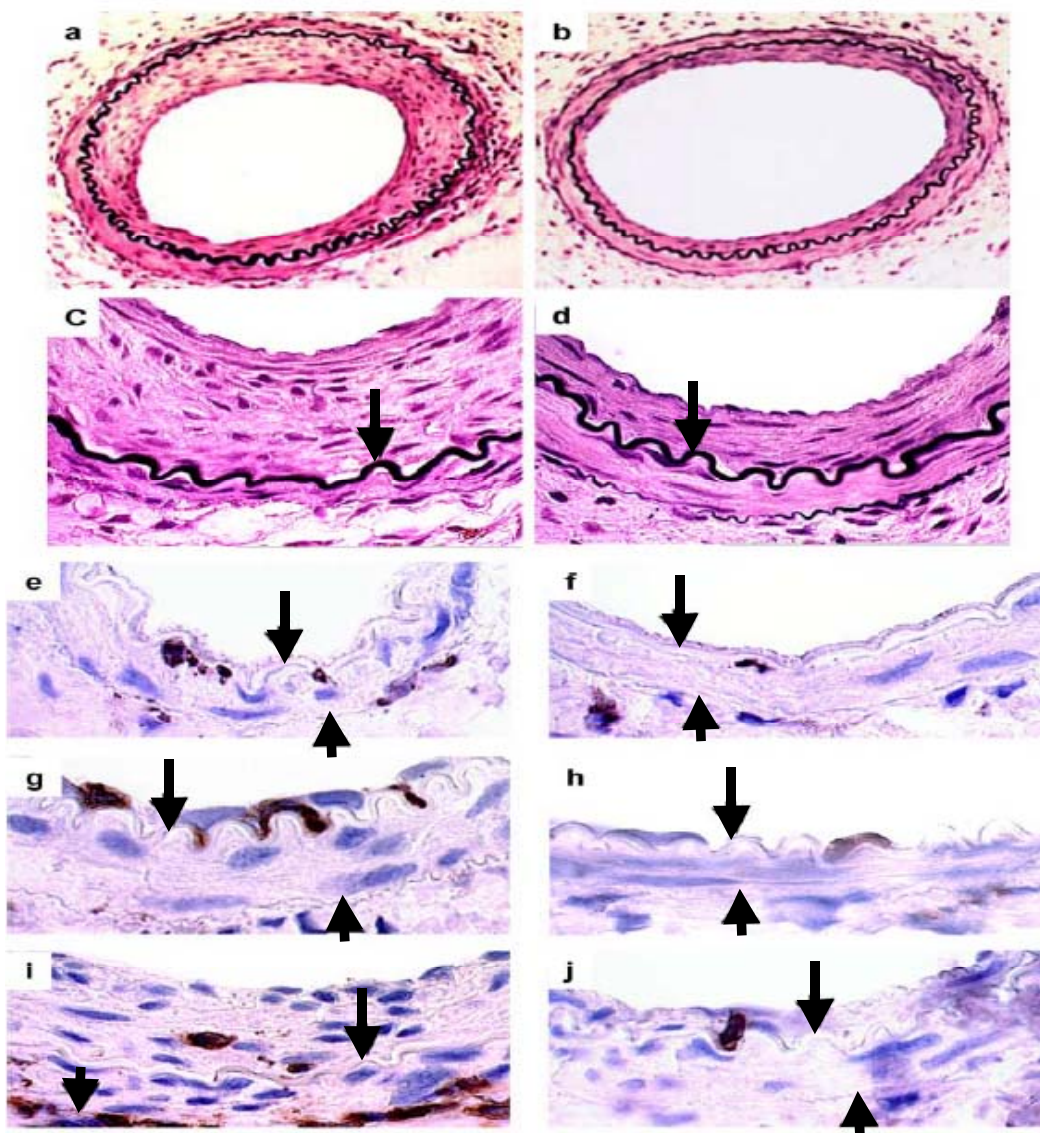
	Controle	Anti-M2	p
Leucócitos (CD45+), %			
1° dia (média)	7,9±5,0	2,0±1,6	0,021
5° dia (neointima)	42,3±12,9	24,6±10,8	0,047
28° dia (neointima)	7,9±3,0	3,3±1,3	0,012
Neutrófilos (MAb7/4+), %			
1° dia (média)	8,9±6,7	2,2±1,6	0,043
5° dia (neointima)	26,2±8,0	13,9±4,9	0,036
Macrófagos (Mac-3+), %			
5° dia (neointima)	13,8±6,2	6,5±4,7	0,040
28° dia (neointima)	7,4±3,7	3,1±1,2	0,022

Gráfico 1 - Acúmulo de leucócitos (CD45+) na artéria femoral de camundongos após a lesão vascular.



A análise de células CD45-positivas foi expandida por técnicas imunológicas de coloração utilizando marcadores celulares específicos, com o objetivo de quantificar a presença de neutrófilos e macrófagos.

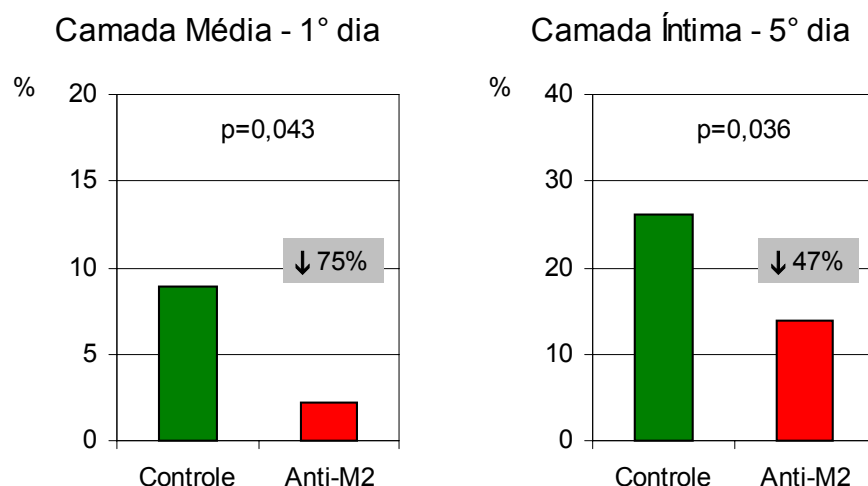
Figura 6 - Fotografias de artérias femorais de camundongos após a lesão vascular.



(a) Anticorpo-controle (38X); (b) anti-M2 (38X); (c) anticorpo-controle (150X); (d) anti-M2 (150X). As setas longas indicam a lâmina elástica interna e as setas curtas a lâmina elástica externa. A neoíntima separa a lâmina elástica interna do lúmen. Células CD45+ em castanho (150X): (e) anticorpo-controle - 1° dia; (f) anti-M2 - 1° dia; (g) anticorpo-controle - 5° dia; (h) anti-M2 - 5° dia; (i) anticorpo-controle - 28° dia; e (j) anti-M2 - 28° dia.

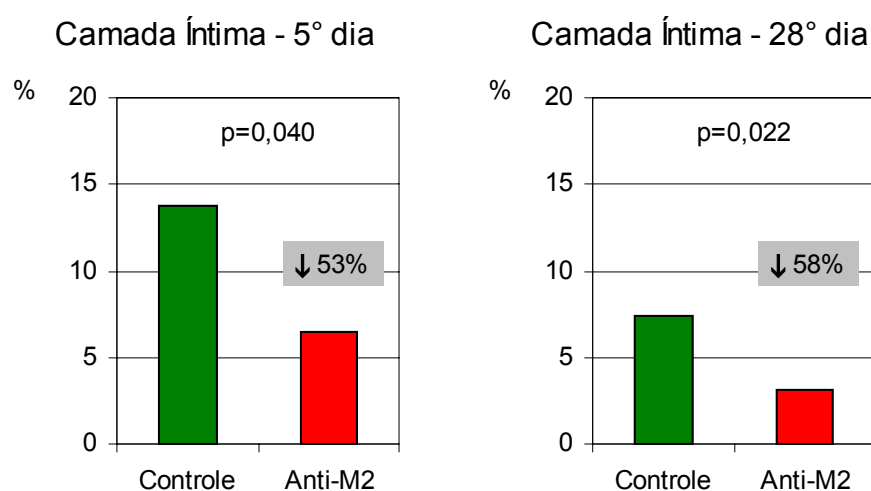
O acúmulo de neutrófilos (células positivas para o anticorpo monoclonal 7/4), dentro da camada média do vaso no primeiro dia pós-lesão, foi reduzido em 75% no grupo de camundongos tratados com anti-M2, em relação ao grupo controle (controle: $8,9 \pm 6,7\%$ versus anti-M2: $2,2 \pm 1,6\%$; $p=0,043$). Em 5 dias pós-lesão, o acúmulo de neutrófilos na neointima em desenvolvimento foi 47% menor no grupo de camundongos tratados com anti-M2, em comparação ao grupo controle (controle: $26,2 \pm 8,0\%$ versus anti-M2: $13,9 \pm 4,9\%$; $p=0,036$). Não foram detectados neutrófilos nas camadas íntima e média em 28 dias pós-lesão em ambos os grupos de tratamento (Tabela 1) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Acúmulo de neutrófilos (Mab7/4+) na artéria femoral de camundongos após a lesão vascular



Os macrófagos (células positivas para Mac-3) foram praticamente indetectáveis no primeiro dia pós-lesão (<0,5% do total de células da camada média). Em 5 dias pós-lesão, o acúmulo de macrófagos na neointima foi reduzido em 53% no grupo de camundongos tratados com anti-M2, em relação ao grupo controle (controle: $13,8 \pm 6,2\%$ versus anti-M2: $6,5 \pm 4,7\%$; $p=0,040$). Enquanto que, em 28 dias pós-lesão, houve redução de 58% no acúmulo de macrófagos na neointima de camundongos tratados com anti-M2, em relação ao grupo controle (controle: $7,4 \pm 3,7\%$ versus anti-M2: $3,1 \pm 1,2\%$; $p=0,022$) (Tabela 1) (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Acúmulo de macrófagos (Mac-3+) na artéria femoral de camundongos após a lesão vascular



4.2 EFEITO DO BLOQUEIO DA INTERAÇÃO $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR APÓS A LESÃO VASCULAR

Proliferação celular expressiva foi observada em 5 dias após a lesão vascular no grupo de camundongos tratados com anticorpo-controle e a proliferação celular continuou ainda evidente em 28 dias.

Entretanto, o tratamento de camundongos com o anticorpo anti-M2 determinou uma redução estatisticamente significativa de 64% da proliferação celular na camada média do vaso em 5 dias após a lesão (controle: $5,0 \pm 2,9\%$ do total de células na camada média do vaso *versus* anti-M2: $1,8 \pm 0,5\%$; $p=0,043$) e de 47% da proliferação celular na camada íntima do vaso em 28 dias (controle: $3,8 \pm 1,7\%$ do total de células na camada íntima do vaso *versus* anti-M2: $2,0 \pm 1,2\%$; $p=0,047$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise quantitativa da proliferação celular (células BrdU+) na artéria femoral de camundongos após a lesão vascular

	Controle	Anti-M2	p
Células BrdU+, %			
5° dia (média)	$5,0 \pm 2,9$	$1,8 \pm 0,5$	0,043
28° dia (neoíntima)	$3,8 \pm 1,7$	$2,0 \pm 1,2$	0,047

4.3 EFEITO DO BLOQUEIO DA INTERAÇÃO $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α NA MORFOMETRIA QUANTITATIVA DAS ÁREAS INTIMAL E MEDIAL APÓS A LESÃO VASCULAR

Em camundongos tratados com o anticorpo-controle, o espessamento intimal iniciou 5 dias após a lesão e progrediu significativamente entre 5 e 28 dias pós-lesão.

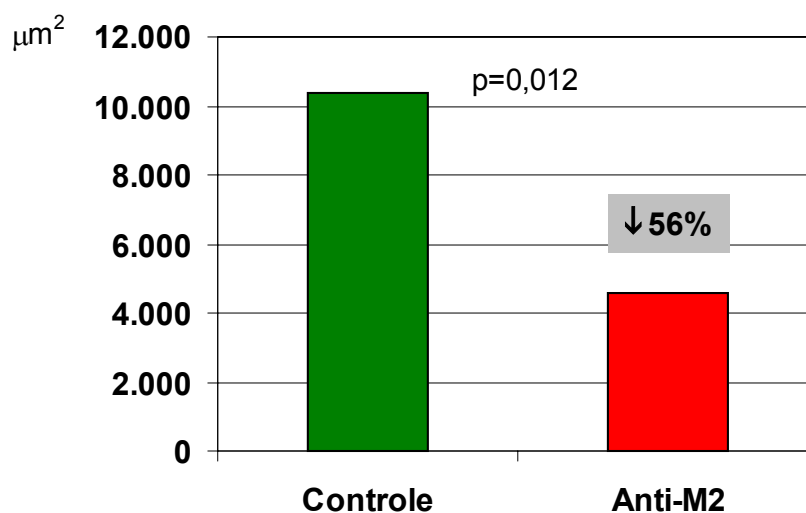
O bloqueio da interação $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α , promovido pelo tratamento com o anticorpo anti-M2 ou peptídeo M2, resultou na diminuição do espessamento intimal (neoíntima) em 5 dias após a lesão, em relação ao grupo-controle (controle: $921 \pm 534\mu\text{m}^2$ *versus* anti-M2: $505 \pm 357\mu\text{m}^2$; $p=0,077$), assim como na redução estatisticamente significativa da neoíntima em 28 dias em comparação ao grupo-controle (controle: $10.395 \pm 3.549\mu\text{m}^2$ *versus* anti-M2: $4.561 \pm 4.915\mu\text{m}^2$; $p=0,012$) (Tabela 3) (Figura 6).

Tabela 3 - Análise morfométrica das áreas íntima e medial da artéria femoral de camundongos após a lesão vascular

	Controle	Anti-M2	p
Área da Camada Íntima (μm^2)			
5° dia	921±534	505±357	0,077
28° dia	10.395±3.549	4.561±4.915	0,012
Área da Camada Média (μm^2)			
0 dia	9.583±1203	ND	
5° dia	10.839±1.297	11.211±1.642	0,62
28° dia	9.342±1.762	9.172±1.925	0,85
Área Íntima/Média			
5° dia	0,08±0,05	0,05±0,03	0,079
28° dia	1,20±0,62	0,53±0,62	0,036

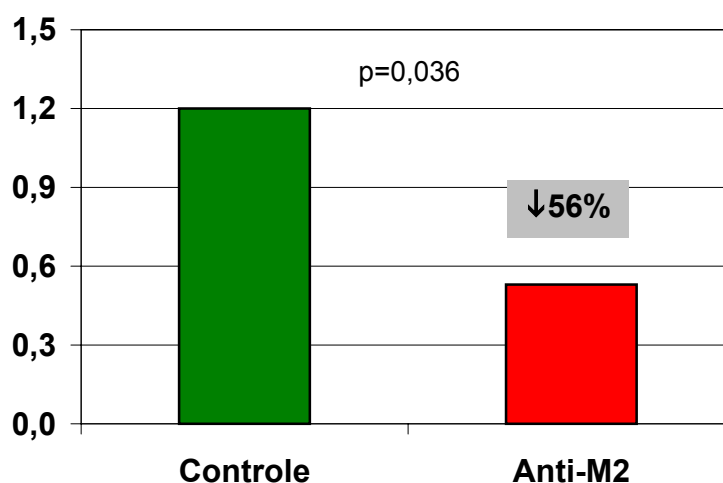
Portanto, o bloqueio da interação $\alpha_M\beta_2\text{-GPIIb}\alpha$ em camundongos tratados com o anticorpo anti-M2 ou peptídeo M2 determinou uma redução de 56% do espessamento íntima em 28 dias, em relação ao grupo-controle (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Área intimal da artéria femoral de camundongos em 28 dias após a lesão vascular



A área da camada média não foi afetada pelo tratamento com o anticorpo anti-M2, em 5 ou 28 dias, após a lesão vascular. Assim sendo, a relação entre as áreas da camada íntima e da camada média expressa pela razão área intimal/área medial (I:M), em 28 dias, foi 56% inferior nos camundongos tratados com o anticorpo anti-M2, em comparação ao grupo-controle (controle: $1,20 \pm 0,62$ versus anti-M2: $0,53 \pm 0,62$; $p=0,036$) (Tabela 3) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Razão entre a área da camada íntima e a área da camada média (I:M) em 28 dias após a lesão vascular



4.4 MORFOMETRIA QUANTITATIVA DA LÂMINA ELÁSTICA EXTERNA DA ARTÉRIA FEMORAL DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ANTI-M2 APÓS A LESÃO VASCULAR

O espessamento das camadas íntima e média foi acompanhado por progressivo aumento de tamanho do vaso (remodelamento positivo), conforme avaliado pela aferição da área da lâmina elástica externa em diferentes períodos de tempo (Tabela 4).

Tabela 4 - Área da lâmina elástica externa da artéria femoral de camundongos após a lesão vascular

	Controle	Anti-M2	p
Lâmina Elástica Externa, μm^2			
0 dia*	31.792±11.293	NA	
5° dia	35.491±4.915	29.258±9.217	0,12
28° dia	34.692±8.955	34.651±8.351	0,99

* A área da lâmina elástica externa foi determinada antes da lesão vascular
NA significa não aferido

O remodelamento positivo do vaso foi semelhante nos dois grupos de tratamento, tanto em 5 dias ($p=0,12$) quanto em 28 dias após a lesão vascular ($p=0,99$).

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi demonstrado que o anticorpo que possui como alvo o segmento P²⁰¹-K²¹⁷ do domínio I α_M reduz o acúmulo de leucócitos, a proliferação celular e o espessamento da neointima após a lesão vascular *in vivo*. Essas observações demonstram que a GPIb α das plaquetas é um ligante fisiologicamente relevante para o receptor $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1) dos leucócitos e que a interação $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α é fundamental para a atividade pró-inflamatória do leucócito no processo de reparo à lesão vascular.

A integrina $\alpha_M\beta_2$ regula importantes funções leucocitárias como adesão, migração, coagulação, proteólise, fagocitose, estresse oxidativo e sinalização por ligar-se a diversos ligantes, tais como fibrinogênio^{76,77}, ICAM-1⁷⁸, fator X⁷⁹, C3bi⁷⁶, GPIb α ^{54,60} e JAM-3⁸⁰.

A identificação precisa do ligante responsável pelo acúmulo de leucócitos nos locais de lesão vascular cobertos por plaquetas aderidas era até o momento desconhecida. Embora estudos prévios mostraram que a integrina $\alpha_M\beta_2$ facilita diretamente o recrutamento de leucócitos nos locais de deposição de plaquetas e fibrina⁴⁶, a verdadeira importância biológica de contra-receptores de plaquetas para $\alpha_M\beta_2$, tais como GPIb α , JAM-3 e fibrinogênio ligado à GPIIb/IIIa, é pouco conhecida.

Um estudo prévio de Simon e colaboradores, no qual foi efetuado o bloqueio da integrina $\alpha_M\beta_2$ com o anticorpo monoclonal M1/70, não foi conclusivo em relação à identificação do contra-receptor fisiológico para a integrina $\alpha_M\beta_2$, porque o M1/70 é um anticorpo *pan ligante*, ou seja, bloqueia todo o receptor Mac-1($\alpha_M\beta_2$).⁵⁵ Por esse mesmo motivo, não é possível a utilização do M1/70 em estudos clínicos, apesar dos resultados satisfatórios nesse estudo experimental, visto que a integrina $\alpha_M\beta_2$ regula importantes funções leucocitárias e seu bloqueio total determinaria efeitos adversos graves e potencialmente letais.

Outro estudo de Simon e colaboradores identificou a $\alpha_M\beta_2$ como um determinante molecular de espessamento da neoíntima após lesão vascular. Verificou-se que a ausência seletiva de $\alpha_M\beta_2$ em camundongos deficientes da integrina Mac-1 prejudica a migração de leucócitos transplaqueitários para o interior da parede do vaso, diminuindo o acúmulo de leucócitos na camada média do vaso e o espessamento da neoíntima após angioplastia experimental. Nesse mesmo estudo, a deficiência de $\alpha_M\beta_2$ foi associada com uma redução de 67% no acúmulo precoce de leucócitos.⁶⁹

De modo interessante, a magnitude da redução do acúmulo precoce de leucócitos no estudo anteriormente descrito foi similar àquela obtida com o bloqueio da interação $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α através do peptídeo M2 no presente estudo (75% de inibição de células CD45 positivas), sugerindo que o recrutamento de

leucócitos é largamente dependente da interação entre $\alpha_M\beta_2$ e GPIb α . Essa observação também é consistente com outra decorrente de um estudo *in vitro* previamente realizado por Simon e colaboradores, na qual a interação predominante entre neutrófilos e plaquetas aderidas a uma superfície, depois de vigorosas lavagens, parece ser mediada pela interação $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α , visto que o peptídeo M2 ocasionou inibição superior a 80% da adesão de neutrófilos⁵⁴.

A relativa especificidade da ação inibitória do anti-M2 em relação a GPIb α , ou seja, não interage com a ICAM-1, o fibrinogênio e a JAM-3, sugere uma contribuição pequena de outros ligantes para a integrina $\alpha_M\beta_2$ no contexto da lesão vascular, com endotélio desnudo e deposição plaquetária.⁷⁰

Outros potenciais ligantes para a integrina $\alpha_M\beta_2$ presentes na membrana das plaquetas incluem o fibrinogênio que se liga a GPIIb/IIIa^{76,77}, a ICAM-2⁸¹ e a JAM-3⁸⁰.

A interação leucócito-plaqueta, mediada por pontes de fibrinogênio entre $\alpha_M\beta_2$ e GPIIb/IIIa, foi estudada por Ostrovsky e colaboradores, que demonstraram, em um estudo experimental *in vitro*, que tanto peptídeos RGDS quanto a troca de plaquetas normais por plaquetas trombostênicas (ausência de GPIIb/IIIa) não afetam o acúmulo de leucócitos sobre uma superfície de plaquetas.⁸² A deficiência de β_3 (subunidade da GPIIIa) também

não afetou o recrutamento de leucócitos ou a formação de neointima em camundongos submetidos a modelo experimental de lesão da artéria femoral, idêntico ao do presente estudo.⁷⁴

Embora a integrina $\alpha_M\beta_2$ ligue-se com a ICAM-1, este receptor não é encontrado em plaquetas, as quais expressam um receptor similar - ICAM-2. Diacovo e colaboradores demonstraram que o bloqueio da ICAM-2 não tem efeito na firme adesão de neutrófilos sobre uma superfície de plaquetas ativadas, sob fluxo contínuo.⁴⁶

Por fim, Santoso e colaboradores publicaram recentemente que a integrina $\alpha_M\beta_2$ também pode se ligar a JAM-3 das plaquetas, cooperando com a GPIb α para a adesão entre neutrófilos e plaquetas *in vitro*.⁸⁰ Entretanto, foi demonstrado em um estudo prévio que o anti-M2 teve um efeito inibitório mínimo (13% de inibição) na interação entre os receptores $\alpha_M\beta_2$ e JAM-3.⁷⁰

Um estudo *in vitro* realizado por Simon e colaboradores, utilizando o peptídeo M2, evidenciou que o recrutamento de leucócitos pelas plaquetas é mediado em grande parte pela interação entre a integrina Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) dos leucócitos e a GPIb α das plaquetas, tanto em humanos quanto em camundongos, uma vez que o modelo biológico é muito similar e os percentuais de inibição resultantes dos estudos de adesão foram estatisticamente significativos e comparáveis (80% em humanos e 70% em

camundongos). Mesmo sob condições de fluxo, os resultados de inibição da adesão também foram estatisticamente significativos e similares (92% em humanos e 81% em camundongos).⁷⁰

No presente estudo, os dados do experimento de lesão vascular em camundongos permitem concluir que o recrutamento de leucócitos, após a lesão vascular, é dependente da interação entre a integrina Mac-1 e a GPIb α , pois um anticorpo específico (anti-M2 ou peptídeo M2) direcionado ao bloqueio do segmento P²⁰¹-K²¹⁷ do domínio I α_M , que é responsável pela interação da integrina Mac-1 do leucócito com a GPIb α da plaqueta, promoveu uma redução estatisticamente significativa de 75% no acúmulo de leucócitos na camada média da parede do vaso, no primeiro dia pós-lesão, e reduziu em 42% e 58% o acúmulo de leucócitos na camada íntima da parede do vaso, em 5 e 28 dias após a lesão vascular, respectivamente.

Da mesma forma, os dados da morfometria deste experimento de lesão vascular evidenciaram, através da neutralização da interação Mac-1-GPIb α , que esta interação modula a proliferação celular vascular e a formação neointimal. O anticorpo anti-M2 direcionado ao bloqueio da interação Mac-1-GPIb α foi capaz de reduzir significativamente a proliferação celular na camada média da parede do vaso em 64%, no quinto dia pós-lesão, e a proliferação celular na camada íntima em 47%, em 28 dias após a lesão,

assim como também diminuiu a formação neointimal em 56%, em 28 dias após a lesão vascular ($p=0,012$).

Embora o tratamento com o anti-M2 tenha reduzido o espessamento da neoíntima em 56%, um efeito inibitório menos robusto, quando comparado ao percentual de 80% de inibição do espessamento da neoíntima, com a completa deficiência de $\alpha_M\beta_2$ em camundongos geneticamente modificados, em relação a camundongos selvagens, o resultado do anti-M2, neste primeiro estudo *in vivo*, foi melhor ou pelo menos similar ao efeito da rapamicina em estudos experimentais.

Um estudo em ratos submetidos à lesão da artéria carótida com cateter-balão mostrou redução de 45% do espessamento neointimal no grupo de ratos tratados com rapamicina, em 14 dias, em comparação ao grupo controle.⁸³ Outro estudo, realizado por Gallo e colaboradores, demonstrou que a administração de rapamicina via intramuscular, 3 dias antes e 14 dias após a angioplastia com cateter-balão superdimensionado, em artéria coronária, reduziu o espessamento da neoíntima em 50%, em relação ao grupo controle no período de 28 dias.⁸⁴

Do mesmo modo, o resultado do anti-M2 foi melhor ou pelo menos comparável à maioria dos estudos com paclitaxel. Drachman e colaboradores evidenciaram uma redução de 50% do espessamento neointimal em artérias ilíacas de coelhos tratados com paclitaxel e submetidos a implante de stents,

em relação ao grupo controle.⁸⁵ Um estudo em ratos, utilizando um modelo de lesão em artéria carótida, mostrou uma redução de 70% do espessamento neointimal no grupo tratado com paclitaxel.⁸⁶ Dois estudos em suínos tratados com stent superdimensionado, em artéria coronária, demonstraram que os stents recobertos com paclitaxel reduziram o espessamento da neointima em 40%, no período de 4 semanas, em comparação ao grupo controle.^{87,88}

Deve-se ressaltar que a rapamicina e o paclitaxel são os fármacos antiproliferativos celulares atualmente utilizados nos stents com eluição de fármacos, também denominados stents farmacológicos.

O primeiro estudo com stent com eluição de rapamicina em humanos mostrou taxa de reestenose angiográfica igual a 0% em 4 e 12 meses.^{89,90} Os estudos randomizados evidenciaram redução estatisticamente significativa das taxas de reestenose intra-stent em 8 meses de 35,4-41,7% no stent convencional para 3,2-3,9% no stent com eluição de rapamicina.^{91,92} Do mesmo modo, o estudo RESEARCH, que avaliou o desempenho do stent com eluição de rapamicina no mundo real, ou seja, em pacientes não selecionados por critérios de inclusão ou exclusão, confirmou esses promissores resultados na prática da Cardiologia Intervencionista, com índice de reestenose intra-stent de 6,3% em 6 meses.⁹³

O primeiro estudo com stent com eluição de paclitaxel em humanos também mostrou taxa de reestenose angiográfica em 6 meses de 0%⁹⁴,

enquanto os estudos randomizados evidenciaram redução da taxa de reestenose angiográfica em 6-9 meses de 17,9-24,4% no stent convencional para 2,3-5,5% no stent com eluição de paclitaxel^{95,96}. O estudo T-SEARCH avaliou os resultados do stent recoberto com paclitaxel no mundo real e evidenciou necessidade de revascularização do vaso-alvo em pacientes selecionados por critério clínico de apenas 5,4%, no período de 1 ano.⁹⁷

Diante dos resultados dos estudos experimentais e clínicos com a rapamicina e o paclitaxel, assim como do resultado inicial do bloqueio da interação Mac-1-GPIb α com o anticorpo anti-M2, neste estudo experimental, pode-se inferir a existência de um potencial benefício angiográfico e clínico para o anti-M2 ou peptídeo M2. Obviamente, diferenças na metodologia, via de administração dos fármacos e espécie de animais utilizados nos estudos experimentais citados com rapamicina e paclitaxel devem ser considerados na avaliação dos resultados quando comparados aos obtidos no presente estudo.

Portanto, a neutralização da interação Mac-1-GPIb α mediante o bloqueio do segmento $\alpha_M(P^{201}-K^{217})$, com o anticorpo anti-M2, parece ser uma novidade terapêutica promissora para a prevenção da reestenose após a intervenção coronária percutânea. Entretanto, estudos adicionais com a liberação local de anti-M2 em diferentes doses são fortemente recomendados,

visto que a liberação local provou ter um papel fundamental para o sucesso dos stents recobertos com fármacos antiproliferativos celulares.

Além disso, o anti-M2 reduz a firme adesão e a transmigração de leucócitos em locais de deposição de plaquetas, um dos primeiros passos da inflamação vascular. Assim sendo, o anti-M2 apresenta um efeito potencial contra a inflamação vascular e igualmente parece ser promissor no controle e/ou prevenção da doença arterial coronária e vascular agressiva/progressiva.

Uma das limitações deste estudo é que não se pode descartar a contribuição de outros ligantes do receptor $\alpha_M\beta_2$ e funções do mesmo, assim como não se pode excluir a participação de outras moléculas de adesão celular na resposta biológica à lesão vascular.

Igualmente, não foi avaliada a função da camada adventícia da parede do vaso como uma fonte de células inflamatórias infiltrantes, o que constitui outra limitação do estudo. Leucócitos podem infiltrar a parede do vaso tanto através do lúmen quanto através da adventícia, entretanto o recrutamento de leucócitos, via camada adventícia, é difícil de ser avaliado de forma confiável neste modelo experimental devido à necessidade de dissecação e isolamento da artéria dos tecidos circundantes para a realização da lesão com a corda-guia.

Ademais, embora o espessamento das camadas íntima e média foi acompanhado por progressivo aumento de tamanho do vaso ou remodelamento positivo, que foi similar nos camundongos tratados com anticorpo anti-M2 ou controle, as células da camada vascular adventícia influenciam o remodelamento vascular⁴⁵, sugerindo que modelos experimentais alternativos de lesão vascular serão necessários para investigar as respostas da camada vascular adventícia à lesão.

Por fim, o modelo experimental utilizado não contempla a presença de placa aterosclerótica preexistente no local do processo inflamatório e o implante de stent, fatores que podem ser considerados limitações adicionais deste estudo, visto que difere da prática clínica de tratamento de lesões ateroscleróticas com implante de stent.

6 CONCLUSÕES

Este estudo permite concluir que:

(1) o recrutamento de leucócitos após a lesão vascular é dependente da interação entre a integrina Mac-1 dos leucócitos e a glicoproteína Ib α das plaquetas; e

(2) a neutralização da interação entre a integrina Mac-1 e a glicoproteína Ib α inibe a proliferação celular e a formação neointimal.

7 REFERÊNCIAS

1. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*. 2005;115:3378-84.
2. Tanaka H, Sukhova GK, Swanson SJ, Clinton SK, Ganz P, Cybulsky MI, Libby P. Sustained activation of vascular cells and leukocytes in the rabbit aorta after balloon injury. *Circulation*. 1993;88:1788-803.
3. Rogers C, Welt FG, Karnovsky MJ, Edelman ER. Monocyte recruitment and neointimal hyperplasia in rabbits: coupled inhibitory effects of heparin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:1312-8.
4. Chen Z, Fukutomi T, Zago AC, Ehlers R, Detmers PA, Wright SD, Rogers C, Simon DI. Simvastatin reduces neointimal thickening in low-density lipoprotein receptor-deficient mice after experimental angioplasty without changing plasma lipids. *Circulation*. 2002;106:20-3.
5. Chen Z, Sakuma M, Zago AC, Zhang X, Shi C, Leng L, Mizue Y, Bucala R, Simon DI. Evidence for a role of macrophage migration inhibitory factor in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:709-14.
6. Farb A, Weber DK, Kolodgie FD, Burke AP, Virmani R. Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. *Circulation*. 2002;105:2974-80.

7. Gaspardone A, Crea F, Versaci F, Tomai F, Pellegrino A, Chiariello L, Gioffre PA. Predictive value of C-reactive protein after successful coronary-artery stenting in patients with stable angina. *Am J Cardiol.* 1998;82:515-8.
8. Inoue T, Sakai Y, Morooka S, Hayashi T, Takayanagi K, Takabatake Y. Expression of polymorphonuclear leukocyte adhesion molecules and its clinical significance in patients treated with percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28:1127-33.
9. Mickelson JK, Lakkis NM, Villarreal-Levy G, Hughes BJ, Smith CW. Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardiol.* 1996;28:345-53.
10. Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Puchner G, Schomig A. Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty. *J Am Coll Cardiol.* 1996;27:819-24.
11. Moreno PR, Bernardi VH, Lopez-Cuellar J, Newell JB, McMellon C, Gold HK, Palacios IF, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration predicts restenosis after coronary intervention in patients with unstable angina. *Circulation.* 1996;94:3098-102.

12. Chen Z, Keane JF, Jr., Schulz E, Levison B, Shan L, Sakuma M, Zhang X, Shi C, Hazen SL, Simon DI. Decreased neointimal formation in Nox2-deficient mice reveals a direct role for NADPH oxidase in the response to arterial injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:13014-9.

13. Assoian RK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, Miller PJ, Madtes DK, Raines EW, Ross R, Sporn MB. Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:6020-4.

14. Garbisa S, Ballin M, Daga-Gordini D, Fastelli G, Naturale M, Negro A, Semenzato G, Liotta LA. Transient expression of type IV collagenolytic metalloproteinase produced by human mononuclear phagocytes. *J Biol Chem*. 1986;261:2369-75.

15. Sukhova GK, Shi G-P, Simon DI, Chapman HA, Libby P. Expression of the elastinolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1998;102:576-83.

16. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*. 2002;8:1227-34.

17. Massberg S, Gawaz M, Gruner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhofer D, Heinzmann U, Nieswandt B. A crucial role of Glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med*. 2003;197:41-9.
18. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JW, Zirngibl H, Fassler R. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J*. 2001;20:2120-30.
19. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*. 2003;102:449-61.
20. Arya M, Lopez JA, Romo GM, Cruz MA, Kasirer-Friede A, Shattil SJ, Anvari B. Glycoprotein Ib-IX-mediated activation of Integrin alpha(IIb)beta(3): effects of receptor clustering and von Willebrand factor adhesion. *J Thromb Haemost*. 2003;1:1150-7.
21. Kasirer-Friede A, Ware J, Leng L, Marchese P, Ruggeri ZM, Shattil SJ. Lateral clustering of platelet GPIb-IX complexes leads to up-regulation of the adhesive function of integrin alpha IIbbeta3. *J Biol Chem*. 2002;277:11949-56.

22. Kahn ML. Platelet-collagen responses: molecular basis and therapeutic promise. *Semin Thromb Hemost.* 2004;30:419-25.

23. Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, Schiessler A, Schomig A. Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. *Circulation.* 1996;93:229-37.

24. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Reiningger A, Adelsberger H, Gebhardt A, Schomig A. Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation.* 1997;96:1809-18.

25. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha(v)beta3 integrin, and GPIIb/IIIa. *J Exp Med.* 1998;187:329-39.

26. Johnson RC, Mayadas TN, Frenette PS, Mebius RE, Subramaniam M, Lacasce A, Hynes RO, Wagner DD. Blood cell dynamics in P-selectin-deficient mice. *Blood.* 1995;86:1106-14.

27. Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:7450-4.

28. Frenette PS, Moyna C, Hartwell DW, Lowe JB, Hynes RO, Wagner DD. Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood*. 1998;91:1318-24.

29. Massberg S, Gruner S, Konrad I, Garcia Arguinzonis MI, Eigenthaler M, Hemler K, Kersting I, Schulz C, Muller I, Besta F, Nieswandt B, Heinzmann U, Walter U, Gawaz M. Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice. *Blood*. 2004;103:136-42.

30. Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood*. 1998;92:507-15.

31. Massberg S, Sausbier M, Klatt P, Bauer M, Pfeifer A, Siess W, Fassler R, Ruth P, Krombach F, Hofmann F. Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med*. 1999;189:1255-64.

32. Massberg S, Enders G, Matos FC, Tomic LI, Leiderer R, Eisenmenger S, Messmer K, Krombach F. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood*. 1999;94:3829-38.

33. Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res*. 2004;61:498-511.

34. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Schomig A, Neumann F. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2000;148:75-85.

35. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 1998;394:894-7.

36. Lu B, Rutledge B, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med*. 1998;187:601-8.

37. von Hundelshausen P, Weber KS, Huo Y, Proudfoot AE, Nelson PJ, Ley K, Weber C. RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation*. 2001;103:1772-7.
38. Schober A, Manka D, von Hundelshausen P, Huo Y, Hanrath P, Sarembock IJ, Ley K, Weber C. Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury. *Circulation*. 2002;106:1523-9.
39. von Hundelshausen P, Koenen RR, Sack M, Mause SF, Adriaens W, Proudfoot AE, Hackeng TM, Weber C. Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood*. 2005;105:924-30.
40. Scheuerer B, Ernst M, Dürrbaum-Landmann I, Fleischer J, Grage-Griebenow E, Brandt E, Flad HD, Petersen F. The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages. *Blood*. 2000;95:1158-66.
41. Sachais BS, Kuo A, Nassar T, Morgan J, Kariko K, Williams KJ, Feldman M, Aviram M, Shah N, Jarett L, Poncz M, Cines DB, Higazi AA. Platelet factor 4 binds to low-density lipoprotein receptors and disrupts the endocytic

machinery, resulting in retention of low-density lipoprotein on the cell surface.

Blood. 2002;99:3613-22.

42. Nassar T, Sachais BS, Akkawi S, Kowalska MA, Bdeir K, Leitersdorf E, Hiss E, Ziporen L, Aviram M, Cines D, Poncz M, Higazi AA. Platelet factor 4 enhances the binding of oxidized low-density lipoprotein to vascular wall cells.

J Biol Chem. 2003;278:6187-93.

43. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998;391:591-4.

44. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994;76:301-14.

45. Costa MA, Simon DI. The molecular basis of restenosis and drug eluting stents. *Circulation*. 2005;111:2257-73.

46. Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, Bainton DF, Springer TA. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the β_2 -integrin CD11b/CD18. *Blood*. 1996;88:146-57.

47. McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest.* 1997;100:S97-103.
48. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronivitz M, Benjamin C, Hsu Y-M, Sajer S, Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature.* 1992;359:848-51.
49. Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell.* 1991;65:859-73.
50. Buttrum SM, Hatton R, Nash GB. Selectin-mediated rolling of neutrophils on immobilized platelets. *Blood.* 1993;82:1165-74.
51. Yeo EL, Sheppard J-AI, Feuerstein IA. Role of P-selectin and leukocyte activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear conditions (an injury vessel wall model). *Blood.* 1994;83:2498-507.
52. Lalor P, Nash GB. Adhesion of flowing leukocytes to immobilized platelets. *Br J Haematol.* 1995;89:725-32.

53. Plow E, Zhang L. A Mac-1 attack: integrin functions directly challenged in knockout mice. *J Clin Invest.* 1997;99:1145-6.

54. Ehlers R, Ustinov V, Chen Z, Zhang X, Rao R, Luscinskas FW, Lopez J, Plow E, Simon DI. Targeting platelet-leukocyte interactions: identification of the integrin Mac-1 binding site for the platelet counter receptor Glycoprotein IB α . *J Exp Med.* 2003;198:1077-88.

55. Rogers C, Edelman E, Simon DI. A mAb to the β_2 -leukocyte Integrin Mac-1 (CD11b/CD18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:10134-9.

56. Lawrence MB, Smith CW, Eskin SG, McIntire LV. Effect of venous shear stress on CD18-mediated neutrophil adhesion to cultured endothelium. *Blood.* 1990;75:227-37.

57. von Andrian UH, Berger EM, Ramezani L, Chambers JD, Ochs HD, Harlan JM, Paulson JC, Etzioni A, Arfors KE. In vivo behavior of neutrophils from two patients with distinct inherited leukocyte adhesion deficiency syndromes. *J Clin Invest.* 1993;91:2893-7.

58. Diamond MS, Garcia-Aguillar J, Brickford JK, Corbi AL, Springer TA. The I domains is a major recognition site on the leukocyte Integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J Cell Biol.* 1993;120:1031-43.

59. Sadler JE, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Harlan JM, Titani K, Davie EW. Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82:6394-8.

60. Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong J, McIntire LV, Ballantyne CM, Zhang L, Furman MI, Berndt MC, López JA. Platelet Glycoprotein Ib α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med.* 2000;192:193-204.

61. Zhou L, Lee DH, Plescia J, Lau CY, Altieri DC. Differential ligand binding specificities of recombinant CD11b/CD18 integrin I-domain. *J Biol Chem.* 1994;269:17075-9.

62. Ueda T, Rieu P, Brayer J, Arnaout MA. Identification of the complement iC3b binding site in the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:10680-4.

63. Welt FG, Rogers C. Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1769-76.

64. Riessen R, Isner JM, Blessing E, Loushin C, Nikol S, Wight TN. Regional differences in the distribution of the proteoglycans biglycan and decorin in the the extracellular matrix of atherosclerotic and restenotic human coronary arteries. *Am J Pathol.* 1994;144:962-74.

65. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR. Restenosis and proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol.* 1992;19:267-74.

66. Strauss BH, Robinson R, Batchelor WB, Chisholm RJ, Ravi G, Natarajan MK, Logan RA, Mehta SR, Levy DE, Ezrin AM, Keeley FW. In vivo collagen turnover following experimental balloon angioplasty injury and the role of matrix metalloproteinases. *Circ Res.* 1996;79:541-50.

67. Bauters C, Marotte F, Hamon M, Oliviero P, Farhadian F, Robert V, Samuel JL, Rappaport L. Accumulation of fetal fibronectin mRNAs after balloon denudation of rabbit arteries. *Circulation.* 1995;92:904-11.

68. Farb A, Kolodgie FD, Hwang JY, Burke AP, Tefera K, Weber DK, Wight TN, Virmani R. Extracellular matrix changes in stented human coronary arteries. *Circulation*. 2004;110:940-7.
69. Simon DI, Chen Z, Seifert P, Edelman E, Ballantyne CM, Rogers C. Decreased neointimal formation in Mac-1^{-/-} mice reveals a role for inflammation in vascular repair after angioplasty. *J Clin Invest*. 2000;105:293-300.
70. Wang Y, Sakuma M, Chen Z, Ustinov V, Shi C, Croce K, Zago AC, Lopez J, Andre P, Plow E, Simon DI. Leukocyte engagement of platelet glycoprotein Ib α via the integrin Mac-1 is critical for the biological response to vascular injury. *Circulation*. 2005;112:2993-3000.
71. Lu H, Smith CW, Perrard J, Bullard D, Tang L, Shappell SB, Entman ML, Beaudet AL, Ballantyne CM. LFA-1 is sufficient in mediating neutrophil emigration in Mac-1-deficient mice. *J Clin Invest*. 1997;99:1340-50.
72. Shi C, Zhang X, Chen Z, Robinson MK, Simon DI. Leukocyte integrin Mac-1 recruits toll/interleukin-1 receptor superfamily signaling intermediates to modulate NF-kappaB activity. *Circ Res*. 2001;89:859-65.

73. Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Zhang WX, Taubman MB, Reis ED. Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:335-42.
74. Smyth SS, Reis ED, Zhang W, Fallon JT, Gordon RE, Collier BS. Beta(3)-integrin-deficient mice but not P-selectin-deficient mice develop intimal hyperplasia after vascular injury: correlation with leukocyte recruitment to adherent platelets 1 hour after injury. *Circulation.* 2001;103:2501-7.
75. Roque M, Kim WJ, Gazdoin M, Malik A, Reis ED, Fallon JT, Badimon JJ, Charo IF, Taubman MB. CCR2 deficiency decreases intimal hyperplasia after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:554-9.
76. Wright SD, Weitz JS, Huang AJ, Levin SM, Silverstein SC, Loike JD. Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85:7734-8.
77. Altieri DC, Bader R, Mannucci PM, Edgington TS. Oligospecificity of the cellular adhesion receptor Mac-1 encompasses an inducible recognition specificity for fibrinogen. *J Cell Biol.* 1988;107:1893-900.

78. Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, Springer TA. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell*. 1991; 65:961-71.
79. Altieri DC, Morrissey JH, Edgington TS. Adhesive receptor Mac-1 coordinates the activation of factor X on stimulated cells of monocytic and myeloid differentiation: an alternative initiation of the coagulation cascade. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:7426-66.
80. Santoso S, Sachs UJ, Kroll H, Linder M, Ruf A, Preissner KT, Chavakis T. The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med*. 2002;196:679-91.
81. Diacovo TG, de Fougerolles AR, Bainton DF, Springer TA. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest*. 1994;94:1243-51.
82. Ostrovsky L, King AJ, Bond S, Mitchell D, Lorant DE, Zimmerman GA, Larsen R, Niu XF, Kubes P. A juxtacrine mechanism for neutrophil adhesion on platelets involves platelet-activating factor and a selectin-dependent activation process. *Blood*. 1998;91:3028-36.

83. Gregory CR, Huie P, Billingham ME, Morris RE. Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury. Its effect on cellular, growth factor, and cytokine response in injured vessels. *Transplantation*. 1993;55:1409-18.

84. Gallo R, Padurean 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;99:2164-70.

85. Drachman DE, Edelman ER, Seifert P, Groothuis AR, Bornstein DA, Kamath KR, Palasis M, Yang D, Nott SH, Rogers C. Neointimal thickening after stent delivery of paclitaxel: change in composition and arrest of growth over six months. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:2325-32.

86. Sollott SJ, Cheng L, Pauly RR, Jenkins GM, Monticone RE, Kuzuya M, Froehlich JP, Crow MT, Lakatta EG, Rowinsky EK et al. Taxol inhibits neointimal smooth muscle cell accumulation after angioplasty in the rat. *J Clin Invest*. 1995;95:1869-76.

87. Heldman AW, Cheng L, Jenkins GM, Heller PF, Kim DW, Ware M, Nater C, Hruban RH, Rezai B, Abella BS, Bunge KE, Kinsella JL, Sollott SJ, Lakatta

EG, Brinkler JA, Hunter WL, Froehlich JP. Paclitaxel stent coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis.

Circulation. 2001;103:2289-95.

88. Hong MK, Kornowski R, Bramwell O, Ragheb AO, Leon MB. Paclitaxel-coated Gianturco-Roubin II (GRII) stents reduce neointimal hyperplasia in a porcine coronary in-stent restenosis model. *Coron Artery Dis*. 2001;12:513-5.

89. Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, Abizaid AS, Feres F, Pinto IMF, Seixas AC, Staico R, Mattos LA, Sousa AGMR, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW. Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries. *Circulation*. 2001;103:192-5.

90. Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, Rensing BJ, Abizaid AS, Tanajura LF, Kozuma K, Langenhove GV, Sousa AGMR, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW. Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents. *Circulation*. 2001;104:2007-11.

91. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, Caputo RP, Kereiakes DJ, Williams DO, Teirstein PS, Jaeger JL, Kuntz RE. Sirolimus-eluting stents *versus* standard stents in

patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med.* 2003;349:1315-23.

92. Schofer J, Schlüter 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;362:1093-9.

93. Lemos PA, Hoye A, Goedhart D, Arampatzis CA, Saia F, van der Giessen WJ, McFadden E, Sianos G, Smits PC, Hofma SH, de Feyter PJ, van Domburg RT, Serruys PW. Clinical, angiographic, and procedural predictors of angiographic restenosis after sirolimus-eluting stent implantation in complex patients – an evaluation from the rapamycin-eluting stent evaluated at Rotterdam Cardiology Hospital (RESEARCH) Study. *Circulation.* 2004;109:1366-70.

94. Grube E, Silber S, Hauptmann KE, Mueller R, Buellesfeld L, Gerckens U, Russell ME. Six- and twelve-month results from a randomized, double-blind trial on a slow-release paclitaxel-eluting stent for de novo coronary lesions. *Circulation.* 2003;107:38-42.

95. Colombo A, Drzewiecki J, Banning A, Grube E, Hauptmann K, Silber S, Dudek D, Fort S, Schiele F, Zmudka K, Guagliumi G, Russell ME. Randomized study to assess the effectiveness of slow- and moderate-release polymer-based paclitaxel-eluting stents for coronary artery lesions. *Circulation*. 2003;108:788-94.

96. Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O'Shaughnessy C, Mann JT, Turco M, Caputo R, Bergin P, Greenberg J, Popma JJ, Russell ME. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2004;350:221-31.

97. Ong ATL, Serruys PW, Aoki J, Hoye A, van Mieghem CAG, Rodriguez-Granillo GA, Valgimigli M, Sonnenschein K, Regar E, van der Ent M, de Jaegere PPT, McFadden EP, Sianos G, van der Giessen WJ, de Feyter PJ, van Domburg RT. The unrestricted use of paclitaxel-*versus* sirolimus-eluting stents for coronary artery disease in an unselected population. One-year results of the Taxus-stent evaluated at Rotterdam Cardiology Hospital (T-SEARCH) Registry. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1135-41.