

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

The Importance of the Interaction between Leukocyte Integrin Mac-1 and Platelet Glycoprotein Ib- α for Leukocyte Recruitment by Platelets and for the Inflammatory Response to Vascular Injury.

Alexandre C. Zago, Daniel I. Simon, Yunmei Wang, Masashi Sakuma, Zhiping Chen, Kevin Croce, Valentin Ustinov, Can Shi, Eulógio E. Martinez Filho

Instituto do Coração (InCor) - Universidade de São Paulo, Brigham and Women's Hospital/Harvard University, Boston, Massachusetts, EUA, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, The Cleveland Clinic Foundation of Medicine, Houston, Texas, EUA

Resumo

Objetivo: Avaliar a importância da interação entre a integrina Mac-1 dos leucócitos ($\alpha_M\beta_2$) e a glicoproteína (GP) Ib α das plaquetas para o recrutamento de leucócitos após a lesão vascular e o efeito da neutralização da interação Mac-1-GPIb α sobre a proliferação celular e a hiperplasia neointimal desencadeadas por lesão vascular.

Métodos: Um peptídeo denominado M2 ou anticorpo anti-M2 foi desenvolvido para bloquear a interação Mac-1-GPIb α . Esse peptídeo foi injetado e comparado com anticorpo-controle em camundongos C57B1/6J submetidos a lesão vascular da artéria femoral com corda-guia. Um, cinco ou 28 dias após a lesão vascular, as artérias femorais foram retiradas para a realização de morfometria e imuno-histoquímica.

Resultados: O bloqueio da interação Mac-1-GPIb α promoveu uma redução estatisticamente significativa do número de leucócitos na camada média no primeiro dia após a lesão vascular (controle: $7,9 \pm 5,0\%$ do total de células versus anti-M2: $2,0 \pm 1,6\%$, $p=0,021$), bem como determinou uma diminuição estatisticamente significativa do acúmulo de leucócitos na neointima em cinco e 28 dias (controle: $42,3 \pm 12,9\%$ versus anti-M2: $24,6 \pm 10,8\%$, $p=0,047$ e controle: $7,9 \pm 3,0\%$ versus anti-M2: $3,3 \pm 1,3\%$, $p=0,012$; respectivamente). A proliferação celular na camada média do vaso em cinco dias pós-lesão foi reduzida com o bloqueio da interação Mac-1-GPIb α (controle: $5,0 \pm 2,9\%$ do total de células versus anti-M2: $1,8 \pm 0,5\%$; $p=0,043$), assim como houve diminuição significativa da proliferação celular na camada íntima do vaso em 28 dias (controle: $3,8 \pm 1,7\%$ versus anti-M2: $2,0 \pm 1,2\%$; $p=0,047$). O bloqueio da interação Mac-1-GPIb α também determinou uma redução estatisticamente significativa do espessamento intimal em 28 dias pós-lesão (controle: $10,395 \pm 3,549 \mu\text{m}^2$ versus anti-M2: $4,561 \pm 4,915 \mu\text{m}^2$; $p=0,012$).

Conclusão: O recrutamento de leucócitos após a lesão vascular é dependente da interação Mac-1-GPIb α e a neutralização dessa interação inibe a proliferação celular e a formação neointimal. (Arq Bras Cardiol 2008;90(1):54-63)

Palavras-chave: Moléculas de adesão celular, inflamação, leucócitos, plaquetas, reestenose coronária.

Summary

Objective: To assess the importance of the interaction between leukocyte integrin Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) and platelet glycoprotein (GP) Ib- α for leukocyte recruitment after vascular injury and the effect of the neutralization of the Mac-1-GPIb α interaction on cell proliferation and the neointimal hyperplasia triggered by the vascular injury.

Methods: A peptide called M2 or anti-M2 antibody was developed to block the Mac-1-GPIb α interaction. This peptide was injected and compared to a control-peptide in C57B1/6J mice submitted to vascular injury of the femoral artery with a guide wire. One, five or 28 days after the vascular injury, the femoral arteries were removed for morphometric and immunohistochemical analyses.

Results: The blocking of the Mac-1-GPIb α interaction promoted a statistically significant reduction in the number of leukocytes in the neointimal layer on the first day after the vascular injury (control: $7.9 \pm 5.0\%$ of the cell total versus anti-M2: $2.0 \pm 1.6\%$, $p=0.021$), as well as determined a statistically significant decrease in leukocyte accumulation in the neointimal layer on days 5 and 28 (control: $42.3 \pm 12.9\%$ versus anti-M2: $24.6 \pm 10.8\%$, $p=0.047$ and control: $7.9 \pm 3.0\%$ versus anti-M2: $3.3 \pm 1.3\%$, $p=0.012$; respectively). Cell proliferation in the neointimal layer of the vessel five days post-injury was reduced with the blocking of the Mac-1-GPIb α interaction (control: $5.0 \pm 2.9\%$ of the cell total versus anti-M2: $1.8 \pm 0.5\%$; $p=0.043$), along with a significant decrease in cell proliferation in the vessel neointimal layer 28 days post-injury (control: $3.8 \pm 1.7\%$ versus anti-M2: $2.0 \pm 1.2\%$; $p=0.047$). The blocking of the Mac-1-GPIb α interaction also determined a statistically significant decrease of the intimal thickening 28 days post-injury (control: $10,395 \pm 3,549 \mu\text{m}^2$ versus anti-M2: $4,561 \pm 4,915 \mu\text{m}^2$; $p=0.012$).

Conclusion: Leukocyte recruitment after a vascular injury depends on the Mac-1-GPIb α interaction and the neutralization of this interaction inhibits cell proliferation and neointimal formation. (Arq Bras Cardiol 2008;90(1):52-60)

Key words: Cell adhesion molecules; inflammation; leukocytes; blood platelets; coronary restenosis.

Full English text available from www.arquivosonline.com.br

Correspondência: Alexandre do Canto Zago •

Rua Ramiro Barcelos, 2350 - 2º andar - Hemodinâmica - 90035-003 - Porto Alegre, RS - Brasil

E-mail: zagoac@cardiol.br / zagoac@uol.com.br

Artigo recebido em 20/12/06; revisado recebido em 28/03/07; aceito em 09/05/07.

Artigo Original

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 endoteliais¹.

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

Uma vez aderidas à parede vascular, as plaquetas formam uma superfície adesiva para o recrutamento de leucócitos circulantes, que envolve as seguintes etapas: adesão mediada por seletinas e rolamento sobre a superfície de plaquetas, ativação dos leucócitos, firme adesão mediada por integrinas e diapedese⁴⁻⁶.

A etapa de firme adesão de leucócitos à superfície de plaquetas ativadas é mediada por integrinas da família β_2 , onde se destaca a integrina Mac-1, também conhecida como antígeno do macrófago-1, $\alpha_M\beta_2$ ou CD11b/CD18.

Um estudo em camundongos com deficiência de integrina Mac-1 e submetidos a lesão vascular evidenciou diminuição da migração e do acúmulo de leucócitos na parede arterial e atenuação da proliferação neointimal⁷. Outro estudo, que avaliou o bloqueio da integrina Mac-1 com um anticorpo *pan ligante* chamado M1/70, mostrou redução do recrutamento de leucócitos e da proliferação neointimal em 14 dias após angioplastia com balão ou implante de *stent* em coelhos⁸.

Simon e cols. recentemente localizaram o sítio de ligação da integrina Mac-1 dos leucócitos com a glicoproteína (GP) Iba das plaquetas dentro do segmento $\alpha_M(P^{201}-K^{217})$ do domínio $\alpha_M I^9$, o que possibilitou o desenvolvimento de um peptídeo denominado M2 ou anti-M2.

Estudos *in vitro* com o peptídeo M2 mostraram redução significativa da adesão de células 293, que expressam a integrina Mac-1, à sGPIb α , assim como diminuição significativa da adesão de leucócitos humanos a plaquetas sob fluxo contínuo¹⁰.

O presente estudo tem como objetivos avaliar a importância da interação entre a integrina Mac-1 dos leucócitos e a glicoproteína Iba das plaquetas para o recrutamento de leucócitos após a lesão vascular e o efeito da neutralização da interação entre a integrina Mac-1 e a glicoproteína Iba sobre a proliferação celular e a hiperplasia neointimal desencadeadas por lesão vascular.

Métodos

Materiais

Peptídeos correspondentes ao sítio de ligação da integrina Mac-1 nos receptores GPIb 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.

Cinqüenta e três camundongos machos C57Bl/6J, com idade entre oito e dez 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).

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 GPIb α , foi desenvolvido mediante a imunização de coelhos com o peptídeo C-²⁰¹PITQLLGRHTHTATGIRK²¹⁷ acoplado a KLH (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, EUA), correspondendo a seqüência humana $\alpha_M(P^{201}-K^{217})$.

A seguir, foram realizados testes sanguíneos que demonstraram altos títulos de anti-soro ligados à fase sólida imobilizada contendo a seqüência de aminoácidos C-²⁰¹-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.

Tratamento com anticorpo

Os camundongos C57Bl/6J foram randomizados e divididos em dois grupos de tratamento:

- 1- peptídeo M2 de coelhos; e
- 2- 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, desse 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 nos dias 2, 4, 6, 8, 10 e 12 após a lesão da artéria femoral.

Lesão da artéria femoral

Camundongos C57Bl/6J machos com idade entre oito e dez semanas foram anestesiados no dia zero (0) com quetamina (80 mg/kg SC) e xilazina (5 mg/kg SC). A seguir, foi realizada uma incisão na virilha, dissecação e exposição da

artéria femoral, clameamento 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 clameamento foi removido e a corda-guia foi avançada até a bifurcação com a aorta e recuada até a posição anterior por três vezes (total de três inserções), visando causar lesão endoluminal na artéria femoral comum. Após a retirada da corda-guia, o local da arteriotomia foi ligado.

Esse modelo experimental, descrito por Roque e cols.¹¹ e utilizado no presente estudo por um operador sem conhecimento dos grupos de tratamento, se assemelha muito ao processo de reparo à lesão vascular observado em humanos após intervenção coronariana percutânea com implante de *stent*. A técnica de lesão vascular por corda-guia determina desnudamento do endotélio, deposição de plaquetas e fibrina e inflamação vascular proeminente, o que torna esse modelo experimental útil em demonstrar a função de células inflamatórias (leucócitos) recrutadas na modulação da formação neointimal¹²⁻¹⁴.

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

Retirada da artéria femoral e coleta de tecido

Um dia (anticorpo de controle: n= 6; anti-M2: n= 6), cinco 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 100 mmHg.

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

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

O baço e o intestino delgado de três animais foram utilizados como controle das reações de imuno-histoquímica, em razão da presença de abundante tecido linfóide (leucócitos) nesses tecidos.

Histologia e morfometria

As artérias femorais retiradas foram inicialmente fixadas em formalina e posteriormente processadas e emblocadas em parafina. Foram realizados dois cortes transversais com 1 mm de distância entre eles, 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.

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.

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 nessa 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 dois 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.

Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada utilizando a técnica de imunoperoxidase pelo sistema avidina-biotina, mediante o uso de anticorpos específicos para cada célula.

O anticorpo anti-CD45 (antígeno comum leucocitário) de camundongos foi utilizado como marcador de leucócitos, o anticorpo monoclonal 7/4 foi usado para a identificação de neutrófilos e o anticorpo monoclonal M3/84 ou anti-CD163 foi utilizado como marcador de 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 essa técnica permite avaliar e quantificar a proliferação. Portanto, essa 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.

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.

Artigo Original

Resultados

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 nesse 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 ($p=0,021$) (tab. 1) (gráfico 1) (fig. 1).

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 cinco 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 (tab. 1) (gráfico 1) (fig. 1).

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.

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 cinco 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 (tab. 1).

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 cinco dias pós-lesão, o acúmulo de macrófagos na neointima

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

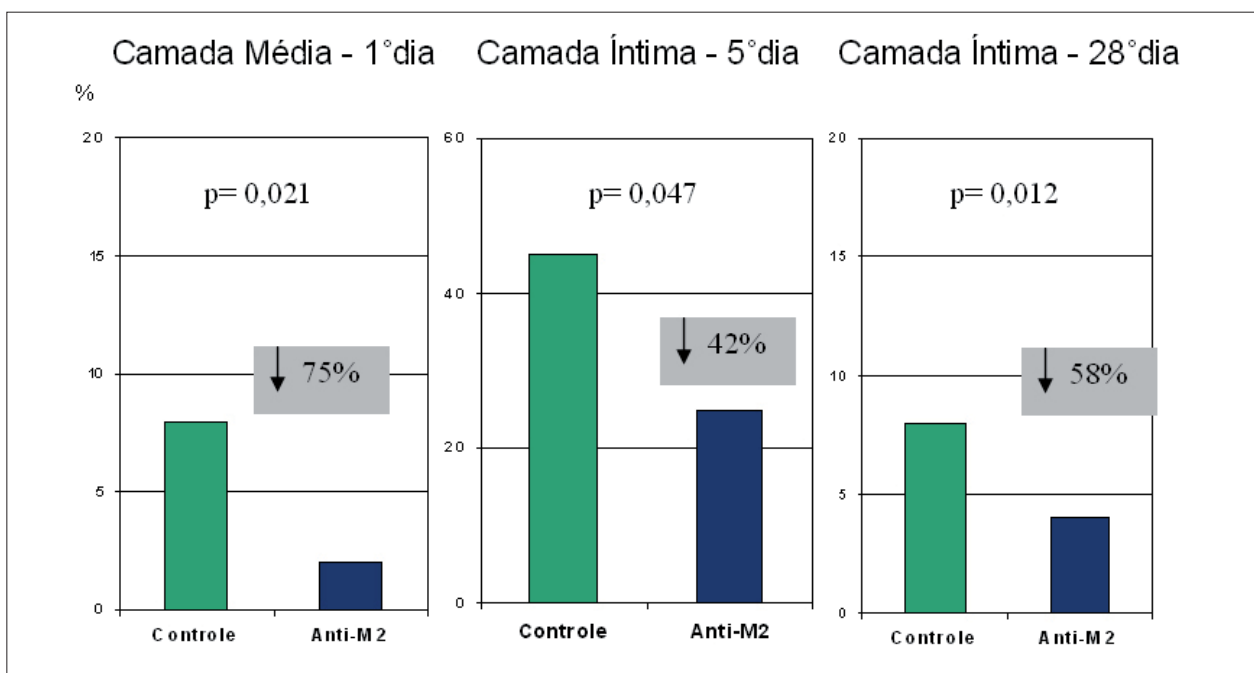


Gráfico 1 - Acúmulo de leucócitos (CD45+) na artéria femoral de camundongos após a lesão vascular.

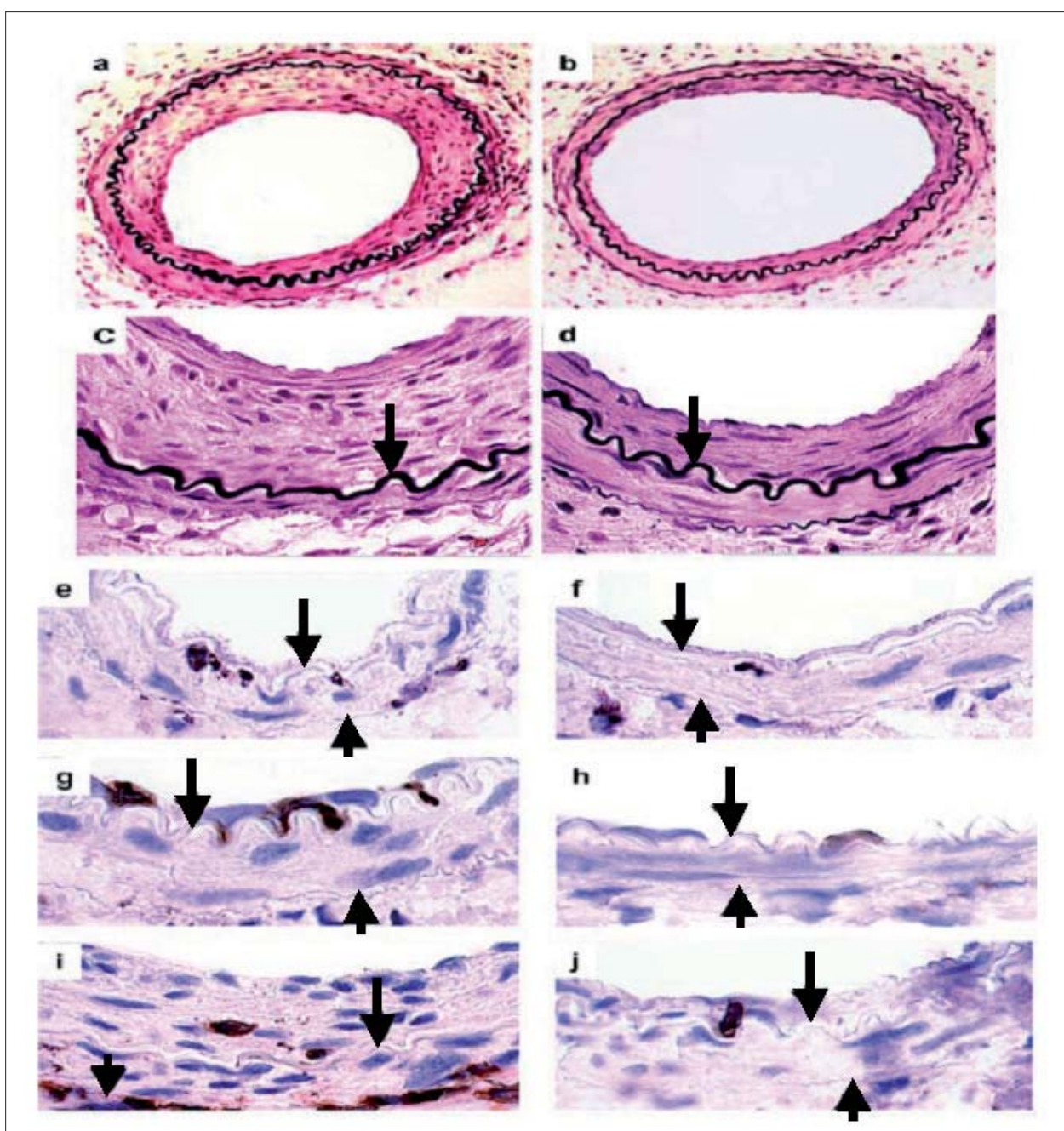


Fig. 1 - Fotografias de artérias femorais de camundongos após a lesão vascular. (a) Anticorpo-controle (38X); (b) anti-M2 (38X); (c) anticorpo-controle (150X); (d) anti-M2 (150X). As setas longas indicam a lâmina elástica interna e as setas curtas a lâmina elástica externa. A neointima separa a lâmina 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. (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 neointima 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.

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 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: $3,1 \pm 1,2\%$; $p=0,022$) (tab. 1).

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 cinco

Artigo Original

dias após a lesão vascular no grupo de camundongos tratados com anticorpo controle e a proliferação celular continuou ainda evidente em 28 dias.

O tratamento de camundongos com o anticorpo anti-M2 determinou, entretanto, uma redução estatisticamente significativa de 64% da proliferação celular na camada média do vaso em cinco 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: $2,0 \pm 1,2\%$; $p=0,047$) (tab. 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

Efeito do bloqueio da interação $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α na morfometria quantitativa das áreas íntima e medial após a lesão vascular

Em camundongos tratados com o anticorpo controle, o espessamento intimal iniciou cinco dias após a lesão e progrediu significativamente entre cinco 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 cinco 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: $4.561 \pm 4.915 \mu\text{m}^2$; $p=0,012$) (tab. 3) (fig. 1).

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 ± 1.203	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	$0,08 \pm 0,05$	$0,05 \pm 0,03$	0,079
28° dia	$1,20 \pm 0,62$	$0,53 \pm 0,62$	0,036

O bloqueio da interação $\alpha_M\beta_2$ -GPIb α em camundongos tratados com o anticorpo anti-M2 ou peptídeo M2 determinou, portanto, uma redução de 56% do espessamento intimal em 28 dias, em relação ao grupo-controle (gráfico 2).

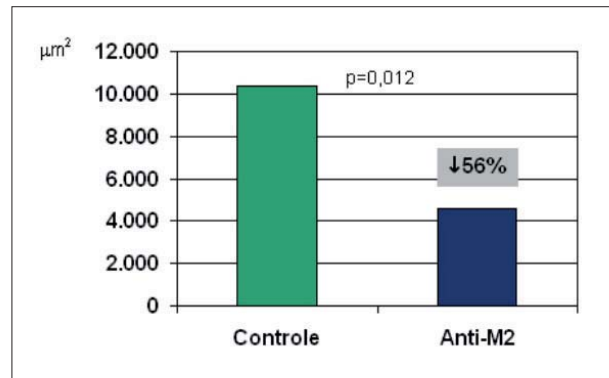


Gráfico 2 - Área íntima da artéria femoral de camundongos em 28 dias após a lesão vascular.

A área da camada média não foi afetada pelo tratamento com o anticorpo anti-M2. Assim sendo, a relação entre as áreas da camada íntima e da camada média, expressa pela razão área íntima/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: $0,53 \pm 0,62$; $p=0,036$) (tab. 3) (gráfico 3).

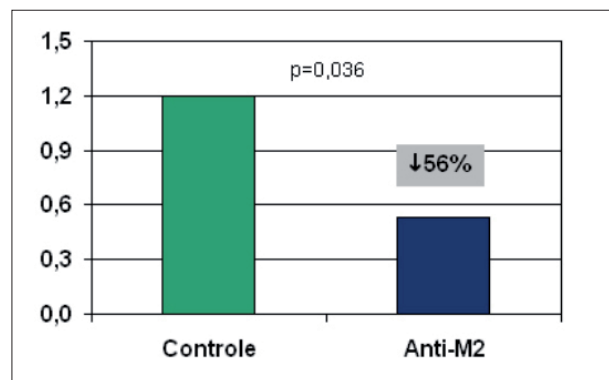


Gráfico 3 - Razão entre a área da camada íntima e a área da camada média (I:M) em 28 dias após a lesão vascular.

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 (tab. 4).

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

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 \pm 11.293	NA	
5° dia	35.491 \pm 4.915	29.258 \pm 9.217	0,12
28° dia	34.692 \pm 8.955	34.651 \pm 8.351	0,99

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

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 GPIIb α das plaquetas é um ligante fisiologicamente relevante para o receptor $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ (Mac-1) dos leucócitos e que a interação $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ -GPIIb α é fundamental para a atividade pró-inflamatória do leucócito no processo de reparo à lesão vascular.

A integrina $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ regula importantes funções leucocitárias como adesão, migração, coagulação, proteólise, fagocitose, estresse oxidativo e sinalização por ligar-se a diversos ligantes, tais como fibrinogênio^{15,16}, ICAM-1¹⁷, fator X¹⁸, C3b¹⁵, GPIIb α ^{9,19} e JAM-3²⁰.

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 tenham mostrado que a integrina $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ facilita diretamente o recrutamento de leucócitos nos locais de deposição de plaquetas e fibrina⁶, a verdadeira importância biológica de contra-receptores de plaquetas para $\alpha_{\text{M}}\beta_2$, tais como GPIIb α , JAM-3 e fibrinogênio ligado à GPIIb/IIIa, é pouco conhecida.

Um estudo de Rogers e cols.⁸, no qual foi efetuado o bloqueio da integrina $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ com o anticorpo monoclonal M1/70, não foi conclusivo em relação à identificação do contra-receptor fisiológico para a integrina $\alpha_{\text{M}}\beta_2$, porque o M1/70 é um anticorpo *pan ligante*, ou seja, bloqueia todo o receptor Mac-1 ($\alpha_{\text{M}}\beta_2$).⁸ 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 $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ regula importantes funções leucocitárias e seu bloqueio total determinaria efeitos adversos graves e potencialmente letais.

Outro estudo de Simon e cols.⁷ identificou a $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ como um determinante molecular de espessamento da neointima após lesão vascular. Verificou-se que a ausência seletiva de $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ em camundongos deficientes da integrina Mac-1 prejudica a migração de leucócitos transplaquetários para o interior da parede do vaso, diminuindo o acúmulo de leucócitos na camada média do vaso e o espessamento da neointima após angioplastia experimental. Nesse mesmo estudo, a deficiência de $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ foi associada com uma redução de 67% no acúmulo precoce de leucócitos⁷.

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 $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ -GPIIb 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 $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ e GPIIb α . Essa observação também é consistente com outra decorrente de um estudo *in vitro* previamente realizado por Ehlers e cols.⁹, na qual a interação predominante entre neutrófilos e plaquetas aderidas a uma superfície, depois de vigorosas lavagens, parece ser mediada pela interação $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ -GPIIb α , visto que o peptídeo M2 ocasionou inibição superior a 80% da adesão de neutrófilos⁹.

A relativa especificidade da ação inibitória do anti-M2 em relação a GPIIb 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 $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ no contexto da lesão vascular, com endotélio desnudo e deposição plaquetária¹⁰.

Outros potenciais ligantes para a integrina $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ presentes na membrana das plaquetas incluem o fibrinogênio que se liga a GPIIb/IIIa^{15,16}, a ICAM-2²¹ e a JAM-3²⁰.

A interação leucócito-plaqueta, mediada por pontes de fibrinogênio entre $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ e GPIIb/IIIa, foi estudada por Ostrovsky e cols.²², que demonstraram, em um estudo experimental *in vitro*, que tanto peptídeos RGDS quanto a troca de plaquetas normais por plaquetas trombocitárias (ausência de GPIIb/IIIa) não afetam o acúmulo de leucócitos sobre uma superfície de plaquetas²². 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 estudo¹³.

Embora a integrina $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ se ligue com a ICAM-1, esse receptor não é encontrado em plaquetas, as quais expressam um receptor similar – ICAM-2. Diacovo e cols. demonstraram que o bloqueio da ICAM-2 não tem efeito na firme adesão de neutrófilos sobre uma superfície de plaquetas ativadas, sob fluxo contínuo⁶.

Por fim, Santos e cols.²⁰ publicaram recentemente que a integrina $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ também pode se ligar a JAM-3 das plaquetas, cooperando com a GPIIb α para a adesão entre neutrófilos e plaquetas *in vitro*²⁰. Entretanto, foi demonstrado em um estudo prévio que o anti-M2 teve um efeito inibitório mínimo (13% de inibição) na interação entre os receptores $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ e JAM-3¹⁰.

Um estudo *in vitro* realizado por Wang e cols.¹⁰, utilizando o peptídeo M2, evidenciou que o recrutamento de leucócitos pelas plaquetas é mediado em grande parte pela interação entre a integrina Mac-1 ($\alpha_{\text{M}}\beta_2$) dos leucócitos e a GPIIb 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)¹⁰.

No presente estudo, os dados do experimento de lesão vascular em camundongos permitem concluir que

Artigo Original

o recrutamento de leucócitos, após a lesão vascular, é dependente da interação entre a integrina Mac-1 e a GPIIb α , pois um anticorpo específico (anti-M2 ou peptídeo M2) direcionado ao bloqueio do segmento P²⁰¹-K²¹⁷ do domínio α_M , que é responsável pela interação da integrina Mac-1 do leucócito com a GPIIb 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 cinco e 28 dias após a lesão vascular, respectivamente.

Da mesma forma, os dados da morfometria desse experimento de lesão vascular evidenciaram, através da neutralização da interação Mac-1-GPIIb α , que essa interação modula a proliferação celular vascular e a formação neointimal. O anticorpo anti-M2 direcionado ao bloqueio da interação Mac-1-GPIIb 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 neointima em 56%, um efeito inibitório menos robusto, quando comparado ao percentual de 80% de inibição do espessamento da neointima, com a completa deficiência de $\alpha_M\beta_2$ em camundongos geneticamente modificados, em relação a camundongos selvagens, o resultado do anti-M2, nesse 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 controle²³. Outro estudo, realizado por Gallo e cols.²⁴, demonstrou que a administração de rapamicina via intramuscular em suínos, três dias antes e 14 dias após a angioplastia com cateter-balão superdimensionado, em artéria coronária, reduziu o espessamento da neointima em 50%, em relação ao grupo controle no período de 28 dias²⁴.

Do mesmo modo, o resultado do anti-M2 foi melhor ou pelo menos comparável à maioria dos estudos com paclitaxel. Drachman e cols.²⁵ 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 controle²⁵. Um estudo em ratos, utilizando um modelo de lesão em artéria carótida, mostrou uma redução de 70% do espessamento neointimal no grupo tratado com paclitaxel²⁶. 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 quatro semanas, em comparação ao grupo controle^{27,28}.

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 quatro e 12 meses^{29,30}. Os estudos randomizados evidenciaram redução estatisticamente significativa das taxas de reestenose intra-*stent* em oito meses de 35,4-41,7% no *stent* convencional para 3,2-3,9% no *stent* com eluição de rapamicina^{31,32}. 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 seis meses³³.

O primeiro estudo com *stent* com eluição de paclitaxel em humanos também mostrou taxa de reestenose angiográfica em seis meses de 0%³⁴, enquanto os estudos randomizados evidenciaram redução da taxa de reestenose angiográfica em seis-nove meses de 17,9-24,4% no *stent* convencional para 2,3-5,5% no *stent* com eluição de paclitaxel^{35,36}. 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 um ano³⁷.

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-GPIIb α com o anticorpo anti-M2, nesse 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.

A neutralização da interação Mac-1-GPIIb α mediante o bloqueio do segmento α_M (P²⁰¹-K²¹⁷), com o anticorpo anti-M2, parece, portanto, ser uma novidade terapêutica promissora para a prevenção da reestenose após a intervenção coronariana 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 desse, 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 nesse modelo experimental pela 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 tenha sido 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 vascular⁵, 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*.

Conclusões

O recrutamento de leucócitos após a lesão vascular

é dependente da interação entre a integrina Mac-1 dos leucócitos ($\alpha_M\beta_2$) e a glicoproteína Iba das plaquetas e a neutralização da interação Mac-1-GPIIb α inibe a proliferação celular e a formação neointimal.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de doutorado de Alexandre do Canto Zago pela Universidade de São Paulo-USP e Harvard University.

Referências

- Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest.* 2005; 115: 3378-84.
- Tanaka H, Sukhova GK, Swanson SJ, Clinton SK, Ganz P, Cybulsky MI, et al. Sustained activation of vascular cells and leukocytes in the rabbit aorta after balloon injury. *Circulation.* 1993; 88: 1788-803.
- 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.
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994; 76: 301-14.
- Costa MA, Simon DI. The molecular basis of restenosis and drug eluting stents. *Circulation.* 2005; 111: 2257-73.
- 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 α_2 -integrin CD11b/CD18. *Blood.* 1996; 88: 146-57.
- 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.
- 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.
- Ehlers R, Ustinov V, Chen Z, Zhang X, Rao R, Lusinskas FW, et al. Targeting platelet-leukocyte interactions: identification of the integrin Mac-1 binding site for the platelet counter receptor Glycoprotein Iba. *J Exp Med.* 2003; 198: 1077-88.
- Wang Y, Sakuma M, Chen Z, Ustinov V, Shi C, Croce K, et al. Leukocyte engagement of platelet glycoprotein Iba via the integrin Mac-1 is critical for the biological response to vascular injury. *Circulation.* 2005; 112: 2993-3000.
- 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.
- Chen Z, Keaney JF Jr, Schulz E, Levison B, Shan L, Sakuma M, et al. 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.
- 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.
- Roque M, Kim WJ, Gazdoin M, Malik A, Reis ED, Fallon JT, et al. CCR2 deficiency decreases intimal hyperplasia after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 554-9.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong J, McIntire LV, et al. Platelet glycoprotein Iba is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med.* 2000; 192: 193-204.
- Santoso S, Sachs UJ, Kroll H, Linder M, Ruf A, Preissner KT, et al. 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.
- Diacovo TG, de Fougères 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.
- Ostrovsky L, King AJ, Bond S, Mitchell D, Lorant DE, Zimmerman GA, et al. A juxtacrine mechanism for neutrophil adhesion on platelets involves platelet-activating factor and a selectin-dependent activation process. *Blood.* 1998; 91: 3028-36.
- Gregory CR, Huie P, Billingham ME, Morris RE. Rapamycin inhibits arterial

Artigo Original

- 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.
24. Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, Marx S, Roque M, Adelman S, et al. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation*. 1999; 99: 2164-70.
25. Drachman DE, Edelman ER, Seifert P, Groothuis AR, Bornstein DA, Kamath KR, et al. 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.
26. Sollott SJ, Cheng L, Pauly RR, Jenkins GM, Monticone RE, Kuzuya M, et al. Taxol inhibits neointimal smooth muscle cell accumulation after angioplasty in the rat. *J Clin Invest*. 1995; 95: 1869-76.
27. Heldman AW, Cheng L, Jenkins GM, Heller PF, Kim DW, Ware M, et al. Paclitaxel stent coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis. *Circulation*. 2001; 103: 2289-95.
28. 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.
29. Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, Abizaid AS, Feres F, Pinto IMF, et al. Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries. *Circulation*. 2001; 103: 192-5.
30. Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, Rensing BJ, Abizaid AS, Tanajura LF, et al. Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents. *Circulation*. 2001; 104: 2007-11.
31. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, et al. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med*. 2003; 349: 1315-23.
32. Schofer J, Schlüter M, Gershlick AH, Wijns W, Garcia E, Schampaert E, et al. 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.
33. Lemos PA, Hoye A, Goedhart D, Arampatzis CA, Saia F, van der Giessen WJ, et al. 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.
34. Grube E, Silber S, Hauptmann KE, Mueller R, Buellesfeld L, Gerckens U, et al. 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.
35. Colombo A, Drzewiecki J, Banning A, Grube E, Hauptmann K, Silber S, et al. 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.
36. Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O'Shaughnessy C, Mann JT, et al. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2004; 350: 221-31.
37. Ong ATL, Serruys PW, Aoki J, Hoye A, van Mieghem CAC, Rodriguez-Granillo GA, et al. 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.