

Doxiciclina em pacientes com linfangioleiomiomatose: segurança e eficácia no bloqueio de metaloproteínas*

Doxycycline use in patients with lymphangioleiomyomatosis: safety and efficacy in metalloproteinase blockade

Suzana Pinheiro Pimenta, Bruno Guedes Baldi, Milena Marques Pagliarelli Acencio, Ronaldo Adib Kairalla, Carlos Roberto Ribeiro Carvalho

Resumo

Objetivo: A linfangioleiomiomatose (LAM) é caracterizada pela presença de cistos pulmonares, cuja formação está associada à hiperreatividade de metaloproteínas de matriz (MMP), principalmente MMP-2 e MMP-9. Objetivamos comparar os níveis dessas MMPs entre pacientes com LAM e controles saudáveis, assim como avaliar, nas pacientes com LAM, a segurança e a eficácia do tratamento com doxiciclina, um potente inibidor de MMPs. **Métodos:** Estudo clínico prospectivo no qual as pacientes com LAM receberam doxiciclina (100 mg/dia) por seis meses, coletando-se amostras de urina e sangue para a dosagem de MMP-2 e MMP-9 antes e ao final do período. Foram ainda obtidas amostras de 10 mulheres saudáveis. **Resultados:** De 41 pacientes com LAM que iniciaram o tratamento, 34 concluíram o protocolo. Os níveis de MMP-9 sérica e urinária foram significativamente inferiores no grupo controle ($p < 0,0001$). Comparando-se os valores antes e após o tratamento, a mediana do nível sérico da MMP-9 reduziu de 919 ng/mL para 871 ng/mL ($p = 0,05$), enquanto a mediana da dosagem urinária de MMP-9 diminuiu de 11.558 pg/mL para 7.315 pg/mL ($p = 0,10$). A mediana da MMP-2 sérica apresentou um decréscimo significativo após o tratamento ($p = 0,04$). Não foram detectados níveis de MMP-2 urinária. Epigastralgia, náuseas e diarreia foram os efeitos adversos mais prevalentes, e geralmente autolimitados. Apenas 1 paciente interrompeu o tratamento devido a efeitos colaterais. **Conclusões:** Pela primeira vez, conseguiu-se evidenciar em pacientes com LAM a redução dos níveis séricos e urinários de MMPs após o uso de doxiciclina, que se mostrou uma medicação segura, com efeitos colaterais leves e toleráveis.

Descritores: Linfangioleiomiomatose; Metaloproteínas da matriz; Doxiciclina.

Abstract

Objective: Lymphangioleiomyomatosis (LAM) is characterized by lung cysts, whose development is associated with matrix metalloproteinase (MMP) hyperactivity, principally that of MMP-2 and MMP-9. Our objective was to compare LAM patients and controls in terms of the levels of these MMPs, as well as to determine the safety and efficacy of treatment with doxycycline, a potent MMP inhibitor. **Methods:** Prospective clinical study involving female LAM patients who received doxycycline (100 mg/day) for six months. Urine and blood samples were collected for the quantification of MMP-2 and MMP-9 before and after the treatment period. Samples from 10 healthy women were also collected. **Results:** Of the 41 LAM patients who started the treatment, 34 completed the protocol. Serum and urinary MMP-9 levels were significantly lower in the controls than in the LAM patients ($p < 0.0001$). Comparing pre- and post-treatment values, we found that the median level of MMP-9 in serum decreased from 919 ng/mL to 871 ng/mL ($p = 0.05$), whereas that of MMP-9 in urine decreased from 11,558 pg/mL to 7,315 pg/mL ($p = 0.10$). After treatment, the median level of MMP-2 in serum was significantly lower ($p = 0.04$) and urinary MMP-2 levels were undetectable. Nausea, diarrhea, and epigastric pain were the most prevalent adverse effects and were often self-limiting. There was only one case in which the patient discontinued the treatment because of side effects. **Conclusions:** We have demonstrated, for the first time, a decrease in serum and urine levels of MMPs in LAM patients treated with doxycycline, which proved to be a safe medication, with mild and well-tolerated side effects.

Keywords: Lymphangioleiomyomatosis; Matrix metalloproteinases; Doxycycline.

* Trabalho realizado no Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil. Endereço para correspondência: Suzana Pinheiro Pimenta, Rua Oscar Freire, 1929, apto. 401, Pinheiros, CEP 05409-011, São Paulo, SP, Brasil.

Tel. 55 11 3069-6000. E-mail: spp3847@yahoo.com.br

Apoio financeiro: Este estudo recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Recebido para publicação em 18/4/2011. Aprovado, após revisão, em 14/6/2011.

Introdução

A linfangioleiomiomatose (LAM) pulmonar é uma doença cística rara que afeta mulheres em idade fértil, com incidência de aproximadamente 2,6 por milhão de habitantes.⁽¹⁾ Pode ocorrer esporadicamente ou associada à síndrome autossômica denominada esclerose tuberosa.⁽²⁾

O quadro clínico mais frequente é caracterizado por dispneia, pneumotórax e angiomiolipoma renal; porém, o acometimento do sistema linfático, através de quilotórax ou linfangiomas, também pode estar presente.⁽³⁻⁶⁾ Na TC de tórax evidenciam-se cistos com paredes finas e bem delimitadas, distribuídos difusamente.⁽⁷⁾

Histologicamente são evidenciados aglomerados de células musculares lisas imaturas que podem ter aspecto fusiforme ou epitelióide, adjacentes às lesões císticas e acompanhando o feixe peribroncovascular. As células apresentam positividade para o anticorpo alfa actina de músculo liso, e aquelas do tipo epitelióide são marcadas adicionalmente com o anticorpo monoclonal *human melanoma black 45* na análise imuno-histoquímica.⁽⁸⁾ Receptores hormonais para estrogênio e progesterona também foram evidenciados nas células de LAM, sendo inicialmente descritos por Brentani et al.⁽⁹⁾

As células fusiformes expressam *matrix metalloproteinases* (MMPs, metaloproteinases de matriz), componentes funcionais da matriz extracelular (MEC) responsáveis pelo remodelamento pulmonar e linfangiogênese, tendo sua atividade regulada por *tissue inhibitors of MMP* (TIMP, inibidores teciduais de MMP).⁽¹⁰⁾ A degradação de fibras elásticas pode ser observada nas áreas com proliferação de células musculares lisas, por meio de microscopia eletrônica, em biópsias de pulmão de pacientes com LAM.⁽¹¹⁾ Na análise imuno-histoquímica, observou-se significativa reatividade de MMP-2 e MMP-9 no tecido pulmonar de portadoras de LAM, quando comparado com o tecido de pulmões normais.⁽¹²⁾ Matsui et al. evidenciaram intensa atividade de MMP-2 nas células de pacientes com LAM, bem como de *membrane type 1 MMP*, responsável por ativar a conversão da pró-enzima da MMP-2 na superfície da membrana celular.⁽¹³⁾

Concordante com a hiperreatividade tecidual das MMPs, descrita em pacientes com LAM, Odajima et al. demonstraram títulos séricos

e plasmáticos significativamente elevados de MMP-9 nessas pacientes, quando comparados aos de controles, quantificados por zimografia.⁽¹⁴⁾

Tem crescido o interesse na relação entre a patogênese da destruição cística pulmonar e a atividade das MMPs na LAM, inclusive como potencial alvo terapêutico. De fato, um relato de caso descreveu o uso de doxiciclina, um conhecido inibidor de MMPs, em uma paciente com LAM em lista de transplante pulmonar. Após o tratamento por quatro meses, a paciente apresentou melhora no VEF₁ e na troca gasosa, concomitante à redução expressiva dos níveis de MMPs dosados na urina.⁽¹⁵⁾

Até o momento, não existem ensaios clínicos prospectivos que tenham avaliado a eficácia e a segurança do uso de doxiciclina no bloqueio das MMPs em pacientes portadoras de LAM, o que nos incentivou a delinear este estudo.

Os objetivos do presente protocolo foram comparar as dosagens séricas e urinárias de MMP-2 e MMP-9 em pacientes com LAM e em mulheres saudáveis, avaliar a eficácia do uso de doxiciclina em inibir as MMPs e avaliar a segurança dessa medicação em pacientes com LAM.

Métodos

Desenvolvemos um estudo clínico prospectivo no qual todas as pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Doenças Intersticiais do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), no período entre novembro de 2006 e julho de 2009, com diagnóstico clínico-radiológico e/ou histopatológico de LAM, foram convidadas a participar do estudo. Como um grupo controle, foram avaliadas também 10 mulheres sem doenças respiratórias, sem nenhuma condição médica e sem história prévia de tabagismo.

O termo de consentimento e o protocolo foram aprovados pelo Comitê de Ética do HC-FMUSP.

As pacientes com LAM submeteram-se à coleta de amostras de urina e de sangue para as dosagens de MMP-2 e MMP-9, sendo obtidas igualmente amostras de sangue e de urina dos controles.

A seguir, as pacientes receberam doxiciclina na dose de 100 mg/dia durante seis meses,

coletando-se novas amostras séricas e urinárias ao final desse período.

Todas as amostras de sangue e de urina coletadas foram centrifugadas a 1.500 rpm durante 10 min e armazenadas a -80°C para posterior análise.

Os níveis séricos e urinários de MMP-2 e de MMP-9 foram mensurados através do método ELISA (R&D System, Inc., Minneapolis, MN, EUA) em acordo com as instruções do fabricante. Placas com 96 poços (Costar; Corning Inc., Cambridge, MA, EUA) foram sensibilizadas com 100 μL de anticorpo monoclonal e incubadas por 18 h a 4°C . Posteriormente, as placas foram bloqueadas, para evitar ligações inespecíficas, com 300 μL de solução de bloqueio (BSA a 2%) e incubadas por 2 h a 37°C . Após o bloqueio, foram adicionados 100 μL das amostras por poço e 100 μL dos padrões diluídos previamente em PBS. As placas foram incubadas por 18 h a 4°C , sendo então adicionados 100 μL do anticorpo conjugado (biotinilado) e, após o período de incubação, foram adicionados 100 μL de *streptavidin-conjugated horseradish peroxidase* (1:250) por poço, e as placas foram incubadas por mais 30 min a 37°C .

A revelação foi realizada através da adição de 100 μL da solução de revelação (peróxido de hidrogênio + tetrametilbenzidina) por poço, e as placas foram incubadas de 5 a 30 min a 37°C , de acordo com cada proteína. A reação foi interrompida com 50 μL de ácido sulfúrico a 30% por poço, e as placas foram agitadas lentamente.

Os títulos de MMPs foram quantificados por comparação de densidade óptica em um leitor de ELISA (Power Wave; Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA) utilizando um filtro de 450 nm. O limite de detecção para MMP-2 foi de 156,2 pg/mL, e aquele para MMP-9 foi de 15,6 pg/mL.

A análise estatística foi realizada utilizando o software *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, EUA). As variáveis paramétricas, definidas pela curva de normalidade em histograma, foram expressas em médias e desvios-padrão e comparadas pelo teste t de Student. As variáveis não paramétricas foram expressas através de medianas e intervalos interquartílicos (II) e comparadas utilizando o teste de Wilcoxon para as variáveis pareadas e o teste de Mann-Whitney

para as variáveis não pareadas. A significância estatística foi assumida para valores de $p < 0,05$.

Resultados

Todas as 42 pacientes com diagnóstico de LAM acompanhadas em nosso serviço, no período do estudo, foram convidadas a participar do protocolo. Dessas, apenas 1 paciente foi excluída por ter sido submetida a transplante pulmonar.

No total, 41 pacientes iniciaram o tratamento com 100 mg/dia de doxiciclina. A média de idade das pacientes era de 41 ± 9 anos, enquanto a dos controles era 40 ± 4 anos. Nenhuma era fumante atual, sendo que 10 (24%) eram ex-tabagistas, e 27 (66%) haviam apresentado pneumotórax previamente. O diagnóstico de LAM foi estabelecido por estudo histopatológico em 37 (93%), sendo por biópsia pulmonar em 35 e por biópsia de outro sítio em 2. O diagnóstico clínico-radiológico, definido pela associação da presença de angiomiolipomas renais e cistos pulmonares, foi realizado em 4 pacientes.

Durante o seguimento, 7 pacientes não completaram o estudo: por piora dos sintomas respiratórios, em 1 (admitida em lista de transplante pulmonar após quatro semanas do início do protocolo); por sintomas relacionados aos efeitos colaterais associados à doxiciclina (colite aguda) após um mês de uso, em 1; por desistência do protocolo, em 1; e por não retornarem para a dosagem de MMP aos seis meses, em 4; essas pacientes continuaram utilizando doxiciclina, sem apresentar quaisquer efeitos adversos.

Ao final do estudo, 34 pacientes completaram seis meses de tratamento e realizaram as dosagens de MMP-2 e MMP-9 no sangue e na urina. As características clínico-funcionais desse grupo encontram-se nas Tabelas 1 e 2.

O grupo controle compreendeu 10 mulheres sem doenças respiratórias, sem outras comorbidades e sem história prévia de tabagismo, com média de idade de 40 ± 4 anos. Não houve diferença estatística em relação à idade entre os dois grupos ($p = 0,29$).

No grupo controle, a mediana dos valores de MMP-9 sérica e urinária foram, respectivamente, 89,6 ng/mL (II: 80 a 102) e 200 pg/mL (II: 89 a 263). Comparando esses valores aos das pacientes com LAM, houve diferenças significativas para ambos ($p < 0.0001$), conforme mostram as

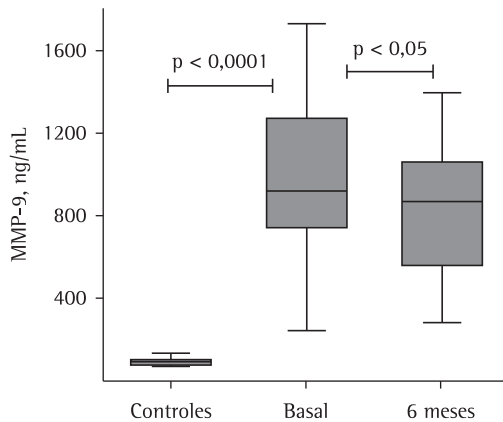


Figura 1 - Níveis de metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) sérica em 10 controles e em 34 pacientes com linfangioleiomiomatose, antes e após o uso de doxiciclina.

Figuras 1 e 2. Os níveis de MMP-2 no sangue e na urina estavam abaixo do limite de detecção nos controles.

Após o tratamento com doxiciclina por seis meses, foi observada uma redução global na mediana dos níveis séricos de MMP-9 nas pacientes com LAM – de 919 ng/mL (II: 742 a 1.268) para 871 ng/mL (II: 564 a 1.053; $p = 0,05$) – conforme mostrado na Figura 1. Em 20 dessas pacientes (59%), a variação proporcional da mediana, em relação ao nível basal, foi de -34% (II: -45% a -15%), enquanto, nas 14 pacientes restantes, houve estabilização ou incremento, com mediana de 8% (II: 3% a 35%).

Em relação aos níveis urinários de MMP-9, a mediana dos níveis basais foi de 11.558 pg/

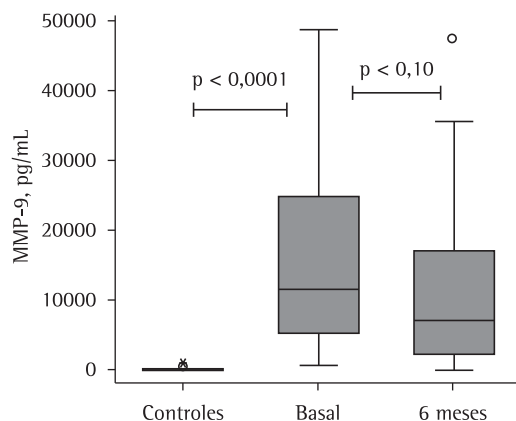


Figura 2 - Níveis de metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) urinária em 10 controles e em 34 pacientes com linfangioleiomiomatose, antes e após o uso de doxiciclina.

mL (II: 5.551 a 23.563) e a mediana após seis meses de tratamento com doxiciclina foi de 7.315 pg/mL (II: 2.393 a 16.683; $p = 0,10$), conforme mostrado na Figura 2. Houve decréscimo nos títulos em 21 pacientes (62%), apresentando uma variação da mediana, em relação ao valor basal, de -58% (II: -90% a -45%) e, nas 13 pacientes restantes, houve um incremento mediano de 65% (II: 23% a 79%).

Os títulos de MMP-2 sérica apresentaram uma mediana basal abaixo do nível de detecção (percentil 75: 833 pg/mL) e uma mediana após o tratamento com doxiciclina também abaixo do limite de detecção (percentil 75: 592 pg/mL; $p = 0,04$). Houve decréscimo nos títulos em 11 pacientes (32%), apresentando uma variação da mediana de -12% (II: -75% a -12%), e, nas 23 pacientes restantes, houve estabilização ou incremento, com mediana e II abaixo do limite de detecção. Todos os níveis de MMP-2 urinária estavam abaixo do limite de detecção.

Durante o uso da doxiciclina, com exceção de 1 paciente que apresentou colite aguda relacionada à doxiciclina, nenhuma outra paciente necessitou descontinuar o tratamento por efeitos colaterais.

Algumas pacientes apresentaram efeitos adversos, especialmente gastrointestinais. A epigastralgia foi o mais prevalente, estando presente em 47% dos casos, geralmente de leve intensidade e com o desaparecimento dos sintomas em duas semanas. Foram utilizados inibidores de bomba de prótons em metade delas. Foram observadas também náuseas, em 21%, e diarreia, em 21%, de leve intensidade e autolimitadas.

Dois pacientes queixaram-se de prurido e reação de fotossensibilidade; ambos os sintomas foram prontamente revertidos após o afastamento à exposição excessiva ao sol e o uso de protetor solar.

Discussão

O presente estudo mostrou que os níveis séricos e urinários de MMP-9 encontrados no grupo de pacientes com LAM foram elevados quando comparados com aqueles do grupo controle. Os títulos de MMP-2 na urina não foram detectados em nenhum dos dois grupos e aqueles de MMP-2 sérica não foram evidenciados no grupo controle.

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas das 34 pacientes com linfangioleiomiomatose que completaram o estudo.

Características	n = 34
Idade, anos, média ± dp	43,0 ± 8,6
Tabagismo prévio, n (%)	8 (24)
Esclerose tuberosa, n (%)	5 (15)
Dispneia, n (%)	29 (85)
Derrame quiloso, n (%)	4 (12)
Pneumotórax, n (%)	23 (68)
Angiomolipoma, n (%)	14 (41)
Diagnóstico	
Histopatológico, n (%)	31 (91)
Clínico-radiológico, n (%)	3 (9)

O achado de hiperreatividade das MMPs em doenças císticas pulmonares tem sido relatado na literatura. Em pacientes com histiocitose de células de Langerhans, Hayashi et al., usando microscopia confocal, demonstraram moderada a intensa atividade de MMP-2 nas áreas onde havia células de Langerhans concomitantes à lesão na membrana basal do epitélio alveolar.⁽¹⁶⁾ Na doença de depósito das cadeias leves, evidenciou-se a degradação da MEC no parênquima pulmonar, associada à expressão de MMP-1, MMP-2, MMP-9 e MMP-14 nesses sítios, além da ausência de TIMP-1 e TIMP-2.⁽¹⁷⁾

O desbalanço entre MMPs e seus inibidores também tem sido implicado na patogênese de outras doenças pulmonares, como enfisema e asma.⁽¹⁸⁾ Níveis urinários de MMP-2 têm sido associados à atividade e à resposta ao tratamento em uma variedade de neoplasias.⁽¹⁹⁾

Tabela 2 - Resultados de provas de função pulmonar das 34 pacientes com linfangioleiomiomatose que completaram o estudo.^a

Variáveis	Resultados
CVF, L	3,2 ± 0,6
CVF, % do predito	93 ± 14
VEF ₁ , L	2,2 ± 0,7
VEF ₁ , % do predito	78 ± 25
VEF ₁ /CVF	0,7 ± 0,2
CPT, L	5,0 ± 0,8
CPT, % do predito	105 ± 14
VR, L	1,8 ± 0,6
VR, % do predito	133 ± 49
VR/CPT	0,35 ± 0,08
DLCO, mL/min/mmHg	16,2 ± 6,7
DLCO, % do predito	62 ± 25

^aValores expressos em média ± dp.

Na LAM, foi evidenciada hiperreatividade das MMP-2 e MMP-9 no tecido pulmonar das pacientes, quando comparada com controles.⁽¹²⁾ Quando dosada no sangue, a MMP-9 apresentou títulos mais elevados em pacientes com LAM do que nos títulos séricos de controles,⁽¹⁴⁾ e nosso estudo corroborou essa evidência.

A doxiciclina, pertencente à família das tetraciclina, é utilizada na prática clínica por seu efeito antimicrobiano. Quando administrada em baixas doses, essa age sobre o remodelamento da MEC, migração e proliferação celular *in vitro*.⁽²⁰⁾ Esse efeito é causado, em parte, pela inibição das MMPs, que pertencem a uma família de enzimas reguladas pela ativação de seus zimogênios, capazes de degradar os substratos da MEC, como gelatina, laminina, elastina e colágeno tipo I e IV.⁽²¹⁾

A doxiciclina vem sendo utilizada como bloqueador de MMPs em modelos experimentais, e foi evidenciada uma atividade antiangiogênese mediada por MMPs no cérebro de ratos após o uso dessa medicação.⁽²²⁾ Os derivados de tetraciclina reduzem a degradação tissular em aneurisma de aorta, assim como inibem a invasão local de células neoplásicas e sua metastatização.^(23,24) Chang et al. demonstraram o efeito da doxiciclina sobre a adesão de células de LAM *in vitro*, bem como sobre MMP-2 e MMP-9, revelando uma redução na proliferação celular, mas à custa de doses muito elevadas de doxiciclina, sem um bloqueio significativo sobre a expressão de MMPs.⁽²⁵⁾ Esses achados, no entanto, são questionáveis, visto que, até o presente momento, não há modelos animais de pulmão de LAM para o estudo apropriado da fisiopatologia dessa doença.

O mecanismo de ação da doxiciclina ainda permanece obscuro; porém, especula-se que sua ação de inibição de MMPs seja pela indução da atividade do TIMP.⁽²⁶⁾ No entanto, não dosamos TIMP em nosso protocolo.

Após o uso de doxiciclina por seis meses, conseguimos evidenciar a redução nos títulos séricos e urinários de MMP-9, assim como nos níveis séricos de MMP-2, nas pacientes com LAM. O bloqueio de MMP-9 sérica evidenciado em nosso estudo foi limítrofe ($p = 0,05$), sugerindo que o uso de doxiciclina por um tempo mais prolongado possa intensificar esse bloqueio. No caso da MMP-2, a redução evidenciada nos níveis séricos foi estatisticamente significativa.

Houve decréscimo nos títulos da MMP-9 urinária, sendo esse bloqueio igualmente limítrofe ($p = 0,10$).

Das 41 pacientes que foram recrutadas para o protocolo, 7 (17%) não realizaram a reavaliação no sexto mês, sendo que 4 não conseguiram retornar em tempo hábil por residirem em outro estado; entretanto, essas mantiveram o uso da medicação.

A doxiciclina mostrou-se uma droga segura e bem tolerada pelas pacientes, sendo o trato gastrointestinal o mais afetado naquelas pacientes sintomáticas. Os sintomas eram geralmente autolimitados, e nos casos que necessitaram o uso de bloqueadores da bomba de prótons, houve resolução satisfatória desses sintomas. Apenas 1 paciente necessitou ser afastada do protocolo devido a um quadro de colite aguda, que foi revertido logo após suspensão da doxiciclina.

Pela primeira vez, demonstra-se que pacientes portadoras de LAM apresentam altas taxas de MMPs no sangue e na urina e que o uso diário de doxiciclina em doses baixas, por seis meses, reduziu esses níveis, com redução significativa nos níveis de MMP-2 sérica e redução limítrofe naqueles de MMP-9 sérica e urinária. Foi observado que a doxiciclina é uma medicação segura, com efeitos colaterais leves, reversíveis e bem tolerados pelas pacientes.

A LAM é uma doença rara e ainda sem tratamento curativo. Vários estudos realizados nos últimos 20 anos trouxeram informações fundamentais no reconhecimento da patogênese dessa doença; no entanto, observa-se uma escassez de estudos prospectivos e randomizados no campo da terapêutica. Recentemente, em um ensaio clínico duplo-cego e randomizado, utilizou-se a rapamicina, um inibidor de *mammalian target of rapamycin*, demonstrando a estabilização da função pulmonar e a melhora na qualidade de vida em pacientes com LAM.⁽²⁷⁾

A criação de registros nacionais e internacionais também é fundamental para possibilitar o acesso às pacientes para participação nesses estudos.⁽²⁸⁾

Os resultados obtidos em nosso estudo estimulam a realização de um protocolo prospectivo e randomizado para avaliar o impacto funcional e a sobrevida de pacientes com LAM sob o uso de doxiciclina.

Referências

1. Taveira-DaSilva AM, Steagall WK, Moss J. Lymphangioleiomyomatosis. *Cancer Control*. 2006;13(4):276-85.
2. Costello LC, Hartman TE, Ryu JH. High frequency of pulmonary lymphangioleiomyomatosis in women with tuberous sclerosis complex. *Mayo Clin Proc*. 2000;75(6):591-4.
3. Kitaichi M, Nishimura K, Itoh H, Izumi T. Pulmonary lymphangioleiomyomatosis: a report of 46 patients including a clinicopathologic study of prognostic factors. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151(2 Pt 1):527-33.
4. Chu SC, Horiba K, Usuki J, Avila NA, Chen CC, Travis WD, et al. Comprehensive evaluation of 35 patients with lymphangioleiomyomatosis. *Chest*. 1999;115(4):1041-52.
5. Johnson SR, Tattersfield AE. Clinical experience of lymphangioleiomyomatosis in the UK. *Thorax*. 2000;55(12):1052-7.
6. Ryu JH, Moss J, Beck GJ, Lee JC, Brown KK, Chapman JT, et al. The NHLBI lymphangioleiomyomatosis registry: characteristics of 230 patients at enrollment. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(1):105-11.
7. Aberle DR, Hansell DM, Brown K, Tashkin DP. Lymphangiomyomatosis: CT, chest radiographic, and functional correlations. *Radiology*. 1990;176(2):381-7.
8. Ferrans VJ, Yu ZX, Nelson WK, Valencia JC, Tatsuguchi A, Avila NA, et al. Lymphangioleiomyomatosis (LAM): a review of clinical and morphological features. *J Nippon Med Sch*. 2000;67(5):311-29.
9. Brentani MM, Carvalho CR, Saldiva PH, Pacheco MM, Oshima CT. Steroid receptors in pulmonary lymphangiomyomatosis. *Chest*. 1984;85(1):96-9.
10. Ji RC. Lymphatic endothelial cells, lymphangiogenesis, and extracellular matrix. *Lymphat Res Biol*. 2006;4(2):83-100.
11. Fukuda Y, Kawamoto M, Yamamoto A, Ishizaki M, Basset F, Masugi Y. Role of elastic fiber degradation in emphysema-like lesions of pulmonary lymphangiomyomatosis. *Hum Pathol*. 1990;21(12):1252-61.
12. Hayashi T, Fleming MV, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Moss J, Ferrans VJ, et al. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in pulmonary lymphangioleiomyomatosis (LAM). *Hum Pathol*. 1997;28(9):1071-8.
13. Matsui K, Takeda K, Yu ZX, Travis WD, Moss J, Ferrans VJ. Role for activation of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of pulmonary lymphangioleiomyomatosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(2):267-75.
14. Odajima N, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Inoue H, Seyama K, Nishimura M. Matrix metalloproteinases in blood from patients with LAM. *Respir Med*. 2009;103(1):124-9.
15. Moses MA, Harper J, Folkman J. Doxycycline treatment for lymphangioleiomyomatosis with urinary monitoring for MMPs. *N Engl J Med*. 2006;354(24):2621-2.
16. Hayashi T, Rush WL, Travis WD, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG, Ferrans VJ. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in pulmonary Langerhans' cell granulomatosis. *Arch Pathol Lab Med*. 1997;121(9):930-7.

17. Colombat M, Caudroy S, Lagonotte E, Mal H, Danel C, Stern M, et al. Pathomechanisms of cyst formation in pulmonary light chain deposition disease. *Eur Respir J*. 2008;32(5):1399-403.
18. Vignola AM, Paganin F, Capieu L, Scichilone N, Bellia M, Maakel L, et al. Airway remodelling assessed by sputum and high-resolution computed tomography in asthma and COPD. *Eur Respir J*. 2004;24(6):910-7.
19. Moses MA, Wiederschain D, Loughlin KR, Zurakowski D, Lamb CC, Freeman MR. Increased incidence of matrix metalloproteinases in urine of cancer patients. *Cancer Res*. 1998;58(7):1395-9.
20. Nelson ML. Chemical and biological dynamics of tetracyclines. *Adv Dent Res*. 1998;12(2):5-11.
21. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92(8):827-39.
22. Lee CZ, Xu B, Hashimoto T, McCulloch CE, Yang GY, Young WL. Doxycycline suppresses cerebral matrix metalloproteinase-9 and angiogenesis induced by focal hyperstimulation of vascular endothelial growth factor in a mouse model. *Stroke*. 2004;35(7):1715-9.
23. Fife RS, Sledge GW Jr. Effects of doxycycline on in vitro growth, migration, and gelatinase activity of breast carcinoma cells. *J Lab Clin Med*. 1995;125(3):407-11.
24. Tamargo RJ, Bok RA, Brem H. Angiogenesis inhibition by minocycline. *Cancer Res*. 1991;51(2):672-5.
25. Chang WY, Clements D, Johnson SR. Effect of doxycycline on proliferation, MMP production, and adhesion in LAM-related cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010;299(3):L393-400.
26. Yao JS, Shen F, Young WL, Yang GY. Comparison of doxycycline and minocycline in the inhibition of VEGF-induced smooth muscle cell migration. *Neurochem Int*. 2007;50(3):524-30.
27. McCormack FX, Inoue Y, Moss J, Singer LG, Strange C, Nakata K, et al. Efficacy and safety of sirolimus in lymphangioleiomyomatosis. *N Engl J Med*. 2011;364(17):1595-606.
28. Nurok M, Eslick I, Carvalho CR, Costabel U, D'Armiento J, Glanville AR, et al. The International LAM Registry: a component of an innovative web-based clinician, researcher, and patient-driven rare disease research platform. *Lymphat Res Biol*. 2010;8(1):81-7.

Sobre os autores

Suzana Pinheiro Pimenta

Médica Colaboradora. Divisão de Pneumologia, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

Bruno Guedes Baldi

Médico Assistente. Divisão de Pneumologia, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

Milena Marques Pagliarelli Acencio

Coordenadora. Laboratório de Pleura, Divisão de Pneumologia, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

Ronaldo Adib Kairalla

Professor Assistente. Divisão de Pneumologia, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

Carlos Roberto Ribeiro Carvalho

Professor Associado Livre-Docente de Pneumologia. Divisão de Pneumologia, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.