

Thaiz Ferraz Borin

**Aumento da IL-1 β no processo de arterialização de enxertos
venosos utilizando modelos *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo***

**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. José Eduardo Krieger

**São Paulo
2007**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Borin, Thaiz Ferraz

Aumento da IL-1 β no processo de arterialização de enxertos venosos utilizando modelos *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo* / Thaiz Ferraz Borin. -- São Paulo, 2007.

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

Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: José Eduardo Krieger.

Descritores: 1.Veia safena 2.Revascularização miocárdica 3.Análise de seqüência com séries de oligonucleotídeos

USP/FM/SBD-392/07

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LBGCM) do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora Nacional de Estudos e Projetos (FINEP) e Fundação Zerbini.

===== **DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais, Luzia e Guerino
Com todo meu Amor.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger, pela orientação, confiança em meu potencial e oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

A Dra. Ayumi Azeia Miyakawa, pela co-orientação e atenção integral durante todo o desenvolvimento deste trabalho, pelo aprendizado do raciocínio científico, pela paciência, pelos puxões de orelha, apoio e confiança no meu trabalho.

A minha grande amiga e doutoranda Luciene Cristina Gastalho Campos Luiz, pela amizade, carinho, atenção, paciência, conselhos, apoio nos momentos mais difíceis e pelo exemplo de integridade.

Ao meu amigo Janilton Alves, pela amizade, carinho e companheirismo nas intermináveis horas de histologia e microscopia.

Ao Leandro Cardoso, pela dedicação, amizade e competência com que me auxiliou realizando todas as cirurgias do modelo animal que precisei.

A Profa. Dra. Dorotéia Sousa e a Glória Motta, pessoas fundamentais para o meu ingresso no mundo científico, pois acreditaram em meu potencial e apostaram todo seu conhecimento para que eu pudesse ter a oportunidade de realizar este sonho.

A *Profa. Dra. Sílvia Lacchini* pelos ensinamentos na histologia e as valiosas sugestões durante a realização deste trabalho.

As funcionárias do Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, *Ana Scaripo, Ângela Batista, Maria Cristina e Esmeralda*, que me ensinaram e auxiliaram nas diversas imunohistoquímicas apresentadas nesta tese.

Aos amigos que estão e estiveram no grupo de Biologia Vascular do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor, em especial, *Dra. Ayumi Miyakawa, Ana Paula Takano, Arthur Nery, Bruno Cenas, Fernando Pacheco, Luciene Campos, Ricardo Azzoli, Thais Girão, Valério Baraúna, Vinícius Bassanese e Wendy Rios*, pela convivência profissional e reuniões intermináveis, pelas horas de prazer e estresse, por agüentarem meu mau e bom humor, por ouvir minhas histórias trágicas e engraçadas, pela amizade e companheirismo.

Aos funcionários do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor e colaboradores, *Alexandre Pereira, Dna. Antonia, Dr. Bryan Strauss, Dra. Birgit Newman, Carlos Aragão, Daniela Jardim, Daniel Gregio, Débora Bergara, Dra. Débora Schechtman, Edson Moreira, Isabel Cristina, Isolmar Schettert, Janilton Alves, José Arruda, Dr. José Xavier Neto, Dra. Lisete, Marcilene Floriano, Márcio Chaves, Marisa, Maíde, Milena, Newton Lopes, Noely Ferreira, Dna. Odila, Dr. Paulo Oliveira, Renata*

Carmona, Silvana Campos e Dra. Silvana Chiaregato, pelo carinho e auxílio técnico em todos os momentos durante a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor, Alessandra Giughiano, Alessandra Medeiros, Allysson Coelho, Amanda, Ana Azambuja, Ângelo Mendes, Beatriz, Dra. Bianca Pauletti, Camila Fernandes, Camila Maciel, Carol Carvalho, Dra. Cláudia Becker, Dr. Christian, Cristiane, Danilo, Daniela Borba, Débora Sobreira, Elena Danoviz, Érika Rabak, Dra. Fabiana Evangelista, Fernanda Pimentel, Dra. Giovana Gonçalves, Guilherme Ambar, Gabriel, Giancarlo, Dr. Gustavo Justo, Kosana Castilho, Dr. Kélio Miranda, Dra. Ivy Anéas, João Paulo, José Pereira, Juliana Nakamura, Junior Ademir Pretti, Dra. Kátia Gomes, Dra. Luciana Gioli, Dra. Luciana Vasquez, Dr. Luciano Borges, Dra. Marcela, Dr. Márcio Badjelman, Marcos Simões, Marilene Parzan, Mariliza Velho, Michelle Vasconcelos, Dra. Mirian Alaniz, Dra. Paula Vassalo, Paula Fratinni, Priscila Chinarro, Rafael Soares, Raquel, Renata, Regiane, Dra. Roberta Cravo, Rodrigo Castro, Rodrigo Gonçalves, Samantha Vieira, Samantha, Sandra, Sílvia Sakurai, Dra. Simone Maciel, Thaís Salles, Thalita, Thilie, Tiago Sobreira, Tiago Pereira, Vinícius Rocha e Yuri, pela amizade e participação direta ou indireta na conclusão desta tese.

Aos amigos e amigas, Aletéia Pazzoto, Dna. Darci, Elaine Aquino, Fábio França, Fernanda Oshiro, Fernando Torrente, Gisele Pereira, Júlio César Campos, Luís Campos, Mariana Bucci, Patrícia

Pascoto, Paula Casaburi, Paulo Gradella, Rita Gastalho, Roselaine Michelin e Wilson Luiz, pela amizade, convivência e apoio.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Austa de São José do Rio Preto, Fernando, Gilberto, Edmilson, Susi e José Roberto, que auxiliaram diretamente em meu conforto emocional por facilitarem inúmeras vezes à estada de minha mãe em São Paulo.

A todos os amigos de Rio Preto, em especial minha Madrinha Ilda Barbosa, Anderson e Mirian Barbosa Augusto, que sempre pediram que as bênçãos de Deus fossem derramadas sobre mim.

A toda minha família, tios e tias, primas e primos, avós, sobrinhos e, em especial meus irmãos Josiane e Gilson, que mesmo a distância, me apoiaram e incentivaram em todos os momentos.

A Deus, que estede todo o tempo comigo, que muitas vezes chorando de saudade, colocou alguém em meu caminho para me confortar, que me deu coragem, paciência, persistência e muito fôlego.

A todos vocês, Muito Obrigada!

Um dia agente aprende que...

“Depois de algum tempo você aprende a sutil diferença, entre dar a mão e acorrentar uma alma. (...) Começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança; aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão. (...) Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias, e o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida, e que bons amigos são a família que nos permitiram escolher. (...) Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos. Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser. Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto. Aprende que não importa onde já chegou, mas para onde se vai, mas se você não sabe para onde está a ir, qualquer lugar serve. Aprende que ou você controla seus atos ou eles o controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem dois lados. Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as conseqüências. Aprende que paciência requer muita prática. (...) aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários você celebrou; aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha; (...) Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte. Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás, portanto, plante seu jardim e decore sua alma ao invés de esperar que alguém lhe traga flores, e você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. Descobre que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida! Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se, não fosse o medo que temos de tentar.”

William Shaskespeare

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Índice	ii
Índice de Figuras	iv
Índice de Tabelas	vii
Lista de Abreviaturas	ix
Resumo	xii
Abstract	xiv
1. Introdução	02
2. Objetivos	13
3. Materiais	15
3.1. Reagentes, Sais e Drogas	15
3.2. Kits e Anticorpos	16
3.3. Produtos Plásticos e Descartáveis	17
3.4. Equipamentos	17
4. Métodos	20
4.1. Obtenção das Veias Safenas Humanas	20
4.2. Obtenção de Enxerto Venoso Humano	20
4.3. Caracterização Funcional da IL1β <i>In Vitro</i>	21
4.3.1. Cultura Primária	21
4.3.2. Incorporação de [³H]timidina no DNA da Célula	21
4.4. Modelo de Enxerto Venoso no Rato	22
4.5. Análise Histológica	25
4.6. Morfometria	27
4.7. Densidade Celular	28
4.8. Morte Celular	29
4.9. Imunohistoquímicas	30
4.10. Expressão Gênica no Processo de Arterialização da Veia Jugular de Rato	33
4.10.1. Extração de RNA	33
4.10.2. Síntese de cDNA	33
4.10.3. RT-PCR em Tempo Real	33
4.11. Análise Estatística	34
5. Resultados	36
5.1. Avaliação da Produção de IL-1β em Enxertos de Veia Safena Humana	36
5.2. Análise Funcional <i>In Vitro</i> da IL-1β	37
5.3. Modelo de Arterialização de Segmento Venoso em Ratos	39
5.3.1. Análise Histológica e Morfométrica	40
5.3.2. Análise de Apoptose, Proliferação e Densidade Celular	48
5.4. Análise do Padrão de Expressão de IL-1β no Processo de Arterialização da Veia Jugular de Rato	53

6. Discussão	57
7. Conclusão	64
8. Implicações Clínicas	66
9. Anexo I	68
• Modelos de Arterialização de Segmento Venoso em Ratos	68
• Métodos	68
○ Enxerto de Veia Jugular Externa em Aorta Abdominal	68
○ Interligação entre Aorta Abdominal e Veia Cava Inferior ...	68
○ Interposição de Veia Jugular Externa em Artéria Carótida Comum	69
• Resultados	70
10. Anexo II	75
• Análise das Câmaras Cardíacas dos Ratos	75
• Métodos	75
• Resultados	75
11. Anexo III	78
• Análise da Influência do Tratamento com IL1RA no Processo de Arterialização da Veia Jugular de Rato	78
• Métodos	78
• Resultados	79
12. Anexo IV	82
• Aprovação da Comissão de Ética do Protocolo de Pesquisa nº418/03	82
13. Anexo V	84
• Aprovação da Comissão de Ética do Protocolo de Pesquisa nº638/04	84
14. Anexo VI	86
• Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	86
15. Referências Bibliográficas	90

Índice de Figuras

Figura 1. Sistema de Cultura <i>Ex Vivo</i> de Veia Safena Humana	07
Figura 2. Quantificação por RT-PCR em Tempo Real da Expressão dos Genes Candidatos Selecionados por <i>cDNA Microarray</i>	09
Figura 3. Quantificação por RT-PCR em Tempo Real da Expressão de IL1 β e Seus Componentes	10
Figura 4. Representação Esquemática da Conexão Artério-Venosa entre Veia Jugular Externa e Artéria Carótida Comum em Ratos	23
Figura 5. Quantificação da Área e Espessura da Veia Jugular Normal e da Veia Jugular Contra-lateral de Ratos	25
Figura 6. Esquema Representativo da Quantificação dos Vasos	28
Figura 7. Imunohistoquímica para IL1 β em Segmentos de Enxerto Venoso Humano a partir de Necropsia	37
Figura 8. Curva Dose Resposta da Incorporação de [3 H] Timidina no DNA de SMC Primária de Veia Safena Humana Tratadas com IL1 β ...	38
Figura 9. Ensaio de TUNEL em SMC Primária de Veia Safena Humana Tratadas com IL1 β	38
Figura 10. Produção de VEGF por SMC de Veia Safena Humana Estimuladas com IL1 β	39
Figura 11. Cortes Histológicos de Veia Jugular de Rato Arterializada, Corados com Tricrômio de Masson ao Longo do Tempo	41
Figura 12. Quantificação da Área de Fibrina na Veia Jugular de Rato Arterializada ao Longo do Tempo	42

Figura 13. Quantificação da Área e Espessura das Túnicas Íntima e Média + Adventícia em Relação ao Tempo de Arterialização da Veia Jugular de Rato	43
Figura 14. Cortes Histológicos de Veia Jugular de Rato Arterializada, Corados com Hematoxilina e Eosina ao Longo do Tempo	44
Figura 15. Quantificação de Imunohistoquímica para α -Actina de SMC em Segmentos Venosos Arterializados de Rato ao Longo do Tempo ...	45
Figura 16. Cortes Histológicos de Veia Jugular de Rato Arterializada Corados com Verhoeff e Van Gienson ao Longo do Tempo	46
Figura 17. Fotos Representativas de Imunohistoquímica para α -Actina de SMC Contra-corada com Miller em Veia Jugular de Rato Arterializada ao Longo do Tempo	47
Figura 18. Análise de Apoptose, Proliferação e Densidade Celular dos Segmentos de Veia Jugular Arterializada ao Longo do Tempo	49
Figura 19. Fotos Representativas da Reação de TUNEL nos Segmentos Arterializados de Veia Jugular de Rato	50
Figura 20. Fotos Representativas da Imunohistoquímica para PCNA nos Segmentos Arterializados de Veia Jugular de Rato	51
Figura 21. Fotos Representativas da Coloração por <i>Hoechst</i> 33258 nos Segmentos Arterializados de Veia Jugular de Rato	52
Figura 22. Fotos Representativas de Imunohistoquímica para IL1 β em Veia Jugular de Rato Arterializada ao Longo do Tempo	54 e 55
Figura 23. Modelo de Fístula Artério-Venosa entre Aorta Abdominal e Veia Cava Inferior em Ratos	69
Figura 24. Enxerto de Veia Jugular Externa em Artéria Carótida Comum de Rato	70
Figura 25. Quantificação das Câmaras Cardíacas dos Ratos Submetidos à Arterialização de Segmento Venoso	76

Figura 26. Quantificação das Túnicas Íntima e Média + Adventícia da Veia Jugular de Rato Arterializada por 14 dias **80**

Figura 27. Análise de Densidade e Proliferação Celular nos Segmentos de Veia Jugular de Rato Arterializada por 14 dias **80**

Índice de Tabelas

Tabela 1. Genes Selecionados pela Análise de <i>cDNA Microarray</i>	08
Tabela 2. Número Total de Animais Utilizados nas Cirurgias de Conexão Artério-Venosa	23
Tabela 3. Lista dos Anticorpos e Reagentes Utilizados para Caracterização da Veia Jugular de Rato Arterializada	32
Tabela 4. Expressão Gênica de IL1 β no Processo de Arterialização da Veia Jugular de Rato	53
Tabela 5. Resumo Geral dos Modelos Testados de Arterialização Venosa <i>In Vivo</i>	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AVC – acidente vascular cerebral
BMP2 – proteína morfogênica óssea 2
BSA – albumina sérica bovina
CAPPesq – Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar
CSF3 – fator estimulatório de colônia 3
DAB – diaminobenzidina tetrahidroclorida
DAC – doença arterial coronariana
DCV – doenças cardiovasculares
DMEM – meio de cultura de células modificado da Dulbecco
DNA – ácido desoxirribonucléico
dNTPs – desoxinucleotídeos trifosfato
E2F – fator de transcrição E2
eNOS – óxido nítrico sintase endotelial
ERK – quinase regulada por sinal extracelular
FBS – soro fetal bovino
GRO – oncogene de crescimento regulado
HE – hematoxilina e eosina
HI – hiperplasia intimal
HRP – peroxidase equina
IAM – infarto agudo do miocárdio
ICAM-1 – molécula de adesão intracelular
IL1RA – antagonista da interleucina 1 β
IL1RI – receptor tipo 1 da interleucina 1 β
IL1 β – interleucina 1 β
IL-6 – interleucina 6
IL-8 – interleucina 8
JNK – quinase c-jun aminoterminal
LEI – lâmina elástica interna
MAP quinase – proteína quinase ativada por mitógeno
NO – óxido nítrico
MMP – metaloproteinase matricial

OMS – organização mundial da saúde

pb – pares de bases

PBS – solução de bicarbonato de sódio e fosfato

PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas

RNA – ácido ribonucléico

RNAi – ácido ribonucléico de interferência

RT-PCR – transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase

SAGE – análise serial de expressão gênica

SMC – células de músculo liso

TGF- β – fator de crescimento transformante beta

TNFIA - fator de necrose tumoral proteína induzida 3 alfa

TUNEL – inserção de uma uracila marcada no deoxinucleotídeo terminal pela enzima transferase

VCAM-1 – molécula de adesão celular vascular

VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular

VVG – verhoeff e van gienson

RESUMO

Borin T. F. **Aumento da IL-1 β no processo de arterialização de enxertos venosos utilizando modelos *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 100p.

A revascularização cardíaca utilizando a ponte de safena é um procedimento bastante comum, usado para restabelecer o fluxo coronariano. O sucesso do implante depende da adaptação do vaso que estava em um regime hemodinâmico venoso, e passa subitamente para um regime arterial. Durante este processo adaptativo, ocorrem diversas alterações moleculares cujo conhecimento pode fornecer alternativas de melhoramento da patência dos enxertos venosos em leito arterial. Neste trabalho está sendo investigada a regulação da interleucina 1 beta (IL-1 β) tanto em veia safena humana como em modelo animal de arterialização venosa. A IL-1 β mostrou-se aumentada em veia safena humana arterializada tanto *in vivo* como *ex vivo*. Interessantemente, este aumento observado nos dias iniciais (1-5 dias) parece diminuir em tempos mais tardios (1-4 anos). Em modelo de arterialização de rato foi observado aumento de 12 vezes na expressão da IL-1 β após o primeiro dia de arterialização com diminuição posterior, mantendo-se em torno de 2 vezes maior em comparação a veia jugular normal. Além da regulação temporal da IL-1 β , foram também acompanhadas as alterações morfológicas que ocorrem durante o processo de arterialização venosa. Observou-se uma redução gradual de células musculares lisas (SMC), que quase desaparecem 3 dias após a cirurgia. Esta perda celular pode estar relacionada ao pico de apoptose observado já no primeiro dia de arterialização. Após 7 dias, as SMC reaparecem, porém, de maneira ainda desorganizada. Concomitante com o reaparecimento das SMC observou-se progressivo espessamento da camada média, assim como surgimento de uma camada neointima. A IL-1 β , devido ao seu padrão de regulação assim como sua localização durante o processo de arterialização, pode estar relacionada com as alterações estruturais verificadas na arterialização do enxerto. Estratégias de intervenção modulando a atividade da IL-1 β poderão fornecer indicativos da sua participação no remodelamento do enxerto venoso. Em conjunto, demonstramos que o modelo de arterialização de segmento venoso em rato reproduz várias das alterações morfológicas descritas na doença do enxerto venoso em humanos e por isso será útil na caracterização de genes candidatos que participam deste processo. A IL-1 β tem sua expressão aumentada em segmento venoso arterializado *in vivo* e *ex vivo*, podendo representar um interessante alvo para aplicação de metodologias de intervenção visando influenciar a adaptação de enxertos venosos com finalidade terapêutica.

Descritores: 1. Veia Safena 2. Revascularização Miocárdica 3. Análise de Sequência com Séries de Oligonucleotídeos

ABSTRACT

Borin T. F. **Increased IL-1 β during vein grafts arterialization: study of ex vivo, in vitro and in vivo models** [thesis]. São Paulo: Medical School, University of São Paulo; 2007. 100p.

The vein graft is subjected to increased tensile stress and the complex adaptive vein response to the arterial hemodynamic condition may predispose to bypass failure in some individuals. The understanding of molecular changes underlying this process may be useful for the development of novel therapeutical interventions to increase the vein graft patency. In this work, we investigated the early effect of arterialization on the expression of interleukina 1 beta (IL-1 β) gene in human saphenous vein and the time-course regulation in rat arterialization model. IL-1 β is upregulated in early stage of human saphenous vein arterialization *in vivo* and *ex vivo*. This increase is also observed in arterialized rat jugular vein which showed IL-1 β expression 12 times higher on day 1 compared to normal jugular vein. Later, the IL-1 β levels decreases and maintain the level about twice above normal jugular vein. Moreover, it is observed gradual reduction of smooth muscle cells (SMC), which almost disappeared on the 3rd day after surgery. Apoptosis, which is markedly increased on the 1st day, appears to be an important event during this process. At the 7th day, cellular density and SMC proliferation gradually increased till the 90th day. There was a gradual thickening of the medial layer and formation of neointimal with deposition of SMC in the subendotelial layer from day 7 on. Initially the medial layer appeared disorganized, day 7 to 14, then by day 28 it became more organized and the presence of an intimal layer with SMCs was evident. The neointimal layer increased gradually from day 7 on. These results provide evidence that the modulation of IL-1 β activity may be an interesting target to be explored in the future to increase the vein graft patency. Altogether, we demonstrate that the model of arterialization of venous segment in rat reproduces several of the morphological changes described in the venous graft disease in humans and thus will be useful in characterization of candidate genes involved in this process and testing them as a potential therapeutic targets. The IL-1 β expression is increased after 1 day of arterialization of vein segment *in vivo* and *ex vivo* and shall be an interesting target to be tested to influence the adaptation of venous grafts for therapeutic purpose.

Keywords: 1. Saphenous Vein 2. Myocardium Revascularization 3. Analysis of Oligonucleotides Sequence Series

INTRODUÇÃO

1. Introdução

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) as doenças cardiovasculares (DCV) são responsáveis por 16,7 milhões de mortes ao ano, com projeções para o ano de 2020, como causa principal de mortalidade e incapacitação (Avezum e cols., 2002 *apud* Lotufo, 2005). A redução da mortalidade por causas infectoparasitárias, o aumento da expectativa de vida, mudanças de estilo de vida e socioeconômicas associadas à urbanização e a suscetibilidade genética, vêm conduzindo a níveis cada vez mais elevados de fatores de risco para DCV tais como tabagismo, *diabetes mellitus*, hipertensão arterial e hipercolesterolemia (Avezum e cols., 2002 *apud* Lotufo, 2005).

Entre as DCV, a doença arterial coronária (DAC), destaca-se como uma das maiores causadoras de morte e incapacidade decorrente de complicações como o acidente vascular cerebral (AVC) e o infarto agudo do miocárdio (IAM). No entanto, a aterosclerose, doença inflamatória crônica caracterizada pela disfunção endotelial e acúmulo de lípidos na parede vascular, é a causa primária da DAC e da sobrecarga imposta ao sistema cardiovascular pela diminuição da complacência arterial e limitação da adaptação a essa sobrecarga (Libby, 2002). Atualmente, a terapêutica aplicada para aliviar as seqüelas da oclusão arterial coronariana, além da medicamentosa adjuvante, são os procedimentos invasivos como a angioplastia transluminal percutânea associada à colocação de *stents* (recobertos ou não) e a revascularização do miocárdio por enxertos venosos ou arteriais (Mitra e cols., 2006).

O processo de revascularização do miocárdio desenvolvido no início da década de 70 representou um marco na terapêutica do infarto do miocárdio (Favaloro, 1969 e Garret e cols., 1973). Este procedimento tornou-se bastante comum e amplamente utilizado, pois se mostrou muito eficiente em aliviar os sintomas e melhorar a qualidade de vida (Angell e cols., 1977 e Roth e cols., 1979 *apud* Lytle e cols., 1985). O primeiro conduto vascular utilizado neste tipo de intervenção foi a veia safena, porém sua eficácia está limitada pelo acelerado desenvolvimento de aterosclerose o que leva à reduzida patência destes enxertos. Por este motivo, enxertos arteriais têm sido cada vez mais utilizados podendo-se citar a artéria torácica interna (mamária interna), a artéria radial, a artéria gastroepiplóica direita, e a artéria epigástrica inferior (Grondin e cols., 1984, Lytle e cols., 1985, Zeff, e cols., 1988, Oliveira e cols., 2005). Estima-se uma patência de 84,1% para enxertos arteriais e 56,3% para o enxerto de veia safena para um período de 10 anos pós-cirúrgico (Bulkley & Hutchins, 1977, Campeau e cols., 1983, Campeau e cols., 1984, Grondin e cols., 1984, Lytle, 1994). Apesar da eficiência dos enxertos arteriais, a veia safena ainda é bastante utilizada devido ao fácil acesso, ao seu tamanho e, principalmente, ao grande número de pacientes com várias oclusões em suas coronárias sendo necessário, além dos enxertos arteriais, o uso da ponte de veia safena como complementação cirúrgica. Dentro deste contexto, o entendimento dos eventos moleculares que ocorrem durante o processo de arterialização de enxertos venosos podem fornecer alternativas de intervenções para promover a melhora da patência dos mesmos.

Quando a veia safena é implantada no coração, é imediatamente submetida a uma nova condição hemodinâmica, ou seja, a uma maior pressão, maior *shear stress*

e, maior deformação radial. O sucesso do implante depende da adaptação do vaso que estava em um regime venoso, de baixa pressão, e passa para um regime arterial, de alta pressão e fluxo pulsátil. Estas forças hemodinâmicas são bastante importantes para a função vascular, pois influenciam o tônus vascular e a regulação gênica de diversas proteínas. Existem estudos *ex vivo* mostrando que o fluxo arterial na veia safena diminui a concentração e a atividade funcional da trombosmodulina (Gosling e cols., 1999), proteína que confere característica anti-trombogênica ao endotélio, altera a expressão da NO sintase endotelial (eNOS) e das moléculas de adesão intracelular (ICAM-1) e celular vascular (VCAM-1) (Golledge e cols., 1997), influenciando na adesividade do endotélio à plaquetas e aos monócitos.

Um fato interessante que ocorre no enxerto venoso interposto em artéria é a indução do processo apoptótico. A interposição de veia safena em artéria carótida de porco apresenta um pico apoptótico após 8 horas do enxerto, já a taxa de proliferação apresentou-se baixa durante o período do estudo de 48 horas (Rodriguez e col., 2000). Inicialmente a taxa de apoptose no enxerto venoso parece ser maior do que a taxa de proliferação, sendo que o pico de proliferação ocorre após 5-7 dias (Yamamura e col., 1994). Este processo de morte celular que ocorre logo após a interposição do enxerto é resultado do estresse em que a parede da veia é submetida quando colocada em regime arterial. Este regime hemodinâmico de maior fluxo e maior pressão causa um estiramento na parede da veia, cuja estrutura não está preparada para receber tal tensão. Quando uma membrana de politetrafluoetileno é colocada ao redor do enxerto venoso reduzindo a tensão e o estiramento da parede do vaso, a taxa de apoptose no enxerto é diminuída significativamente (Moore e col., 2001).

Fica evidente que o estiramento da parede do enxerto venoso em leito arterial provoca uma série de alterações estruturais e moleculares que contribuem para hiperplasia da íntima, que freqüentemente evolui para o processo aterosclerótico. Este processo pode estar relacionado com a regulação de fatores de crescimento como o derivado de plaquetas (PDGF) e o transformante beta (TGF- β) (Hoch e col., 1995), componentes da cascata das proteínas quinase ativada por mitógenos (MAP quinases) como a p38 (Mayr e cols., 2000), fatores de transcrição como E2F (Mann e cols., 1999), e proteínas que compõem e degradam a matriz extracelular como tenascina-C, e as metaloproteinases matriciais (MMP), respectivamente (Wallner e cols., 1999; Leville e cols., 2000). Além disto, vários outros genes têm sido relacionados com processos de proliferação de célula muscular lisa *in vitro* e *in vivo* em modelos de injúria vascular como, por exemplo, lesão por balão. Podemos citar a proteína morfogênica óssea 2 (BMP-2), decorina, e as MAP quinases como a quinase c-jun aminoterminal (JNK) e a quinase regulada por sinal extracelular (ERK) (Nakaoka e col., 1997; Fischer e cols., 2000; Zhan e col., 2003), cujo papel na arterialização do enxerto venoso merece ser investigado.

O processo de oclusão que ocorre nas pontes de safena envolve a participação de diversas proteínas e o estudo de como estas proteínas participam conjuntamente é uma importante abordagem para compreensão da fisiologia e fisiopatologia vascular. A dificuldade de compreender os processos patológicos em seus aspectos moleculares tem limitado o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes. Hoje estão sendo criadas novas oportunidades para a compreensão de problemas biológicos complexos e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de novas abordagens de diagnósticos e terapêuticas. Estão sendo disponibilizadas

estratégias para análise global de milhares de genes simultaneamente, entre elas podemos destacar o *differential display*, o seqüenciamento aleatório de bibliotecas de cDNA, o *SAGE (serial analysis of gene expression)* e o *cDNA microarray*.

No laboratório foi desenvolvido um sistema de cultura de veia safena humana, que permite o estudo vascular em condições hemodinâmicas controladas por períodos de até 1 semana (Figura 1). Este sistema permite a reprodução da situação hemodinâmica venosa (fluxo: 5mL/min) e arterial (fluxo: 50mL/min, pressão: 80mmHg) em cultura de veia safena, tentando simular as condições a que ela é submetida antes e depois do processo de revascularização cardíaca. As modificações que ocorrem após 24 horas estão sendo estudadas na tentativa de identificar as alterações iniciais que ocorrem no enxerto venoso. Acreditamos que são os eventos iniciais que desencadeiam o processo de arterialização do enxerto venoso e possivelmente as complicações posteriores como oclusão e aterosclerose.

Os dados gerados a partir do cultivo de veia safena humana no sistema de cultura *ex-vivo* por *cDNA microarray* permitirão a avaliação global das alterações moleculares do enxerto venoso, contribuindo para o entendimento do processo de arterialização e fornecendo genes candidatos para melhorar a patência do enxerto. Para gerar genes candidatos pela tecnologia de *cDNA microarray* foi utilizada uma plataforma de análise de seqüências com duas bases de *arrays* (A e B), contendo cada uma, 16000 séries de oligonucleotídeos humanos. As análises dos 2 experimentos apresentaram a expressão diferenciada, quando a veia safena humana é cultivada em regime hemodinâmico arterial, para o fator estimulatório de colônia 3 (CSF-3), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 8 (IL-8), oncogene de crescimento regulado 2 (GRO-2), oncogene de crescimento regulado 3 (GRO-3), fator de necrose

tumoral proteína induzida 3 alfa (TNFIA), oncogene de crescimento regulado 1 (GRO-1), interleucina 6 (IL-6), Inibidor de serina (ou cisteína) proteinase e Supressor de tumorigenicidade 16 (Tabela 1).

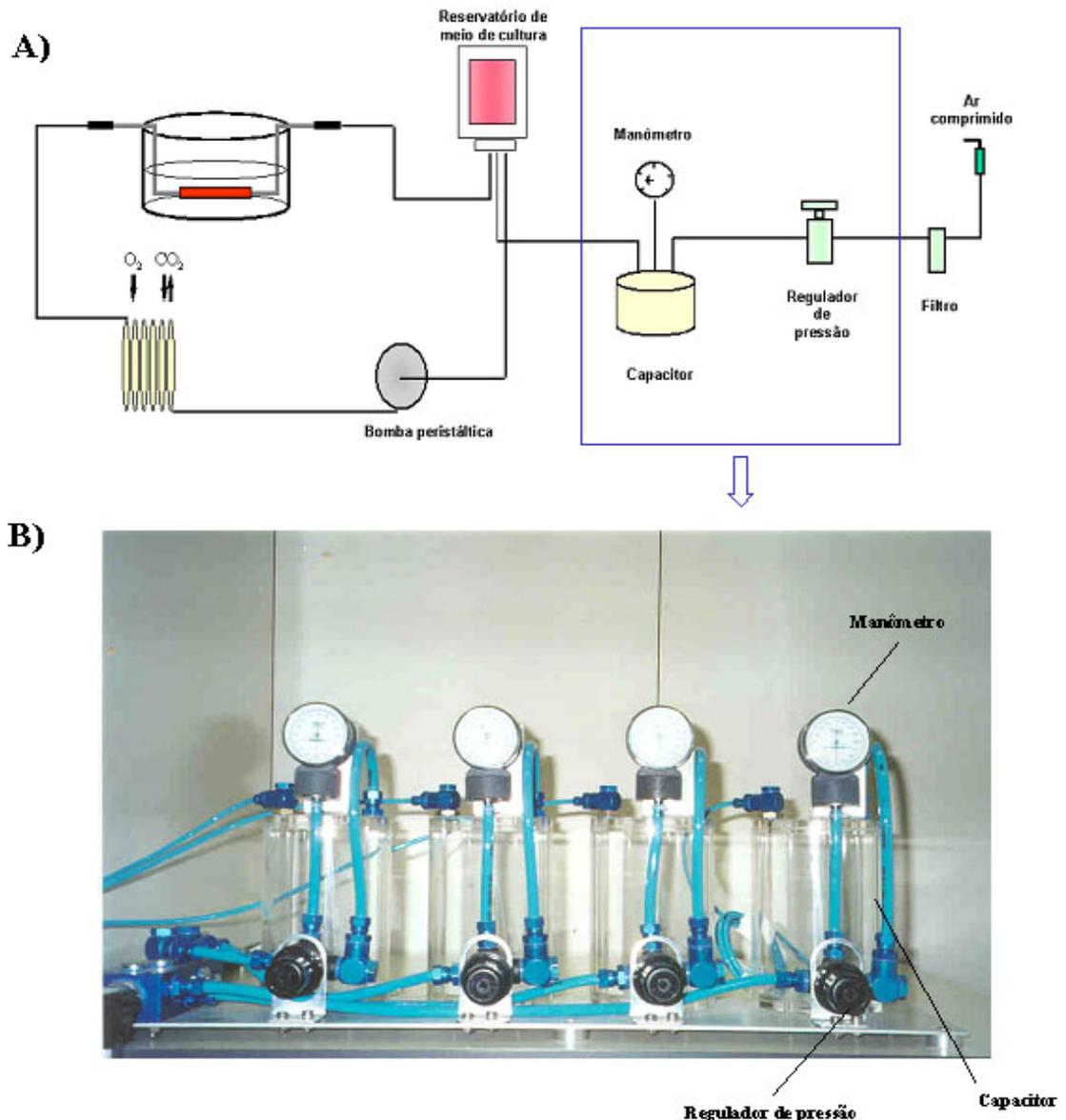


Figura 1. Sistema de cultura ex vivo de veia safena humana. (A) Segmento de veia safena (~2 cm) é colocado na cuba de cultivo e conectado ao sistema. O meio de cultura é retirado do seu reservatório, através de uma bomba peristáltica ajustável, que faz com que o meio flua através de tubo de silicone levando nutrientes para o vaso. Além disto, o sistema possui um (B) aparato de pressurização que permite o controle da pressão de forma independente do fluxo.

Os genes IL-1 β , GRO-3, IL-8, CSF-3, TNFIA e IL-6 foram selecionados para confirmação da expressão por RT-PCR em tempo real, sendo que somente IL-1 β , GRO-3 e IL-6 mostraram aumento significativo em relação à condição venosa (Figura 2). A IL-1 β , por apresentar-se 3 vezes nos resultados de *cDNA microarray* e pelo seu já conhecido envolvimento em processos patológicos vasculares, foi o gene escolhido para validação funcional.

Tabela 1. Genes selecionados pela análise de *cDNA microarray*, plataforma contendo 16000 cDNAs humanos, realizado em veia safena humana cultivada em regime hemodinâmico venoso (V) e arterial (A) por 24h. Os valores representados nos *arrays* A e B são a relação entre as condições experimental e controle para cada gene encontrado.

Gene	“Array” A (A/V)	“Array” B (A/V)
Fator estimulatório de colônia 3 (CSF3)	1,9	2,1
Interleucina1, beta (IL 1 β)	2,2	2,5
Interleucina 8 (IL 8)	2,3	1,8
Oncogene GRO3	2,1	2,5
Oncogene GRO2	2,1	2,6
Oncogene GRO3	2,0	2,4
Interleucina 8 (IL 8)	2,7	2,2
Fator de necrose tumoral proteína induzida 3 alfa (TNFIA)	1,6	1,7
Oncogene GRO1	2,4	2,6
Interleucina 6 – interferon, beta2	2,2	1,99
Interleucina 1, beta (IL 1 β)	2,4	2,5
Inibidor de serina (ou cisteína) proteinase	1,7	2,2
Interleucina 1, beta (IL 1 β)	2,1	2,0
Fator de necrose tumoral proteína induzida 3 alfa (TNFIA)	1,9	1,7
Supressor de tumorigenicidade 16	3,9	2,5
Supressor de tumorigenicidade 16	1,9	3,1

(A/V) = fluorescência da veia cultivada em regime arterial/fluorescência da veia cultivada em regime venoso

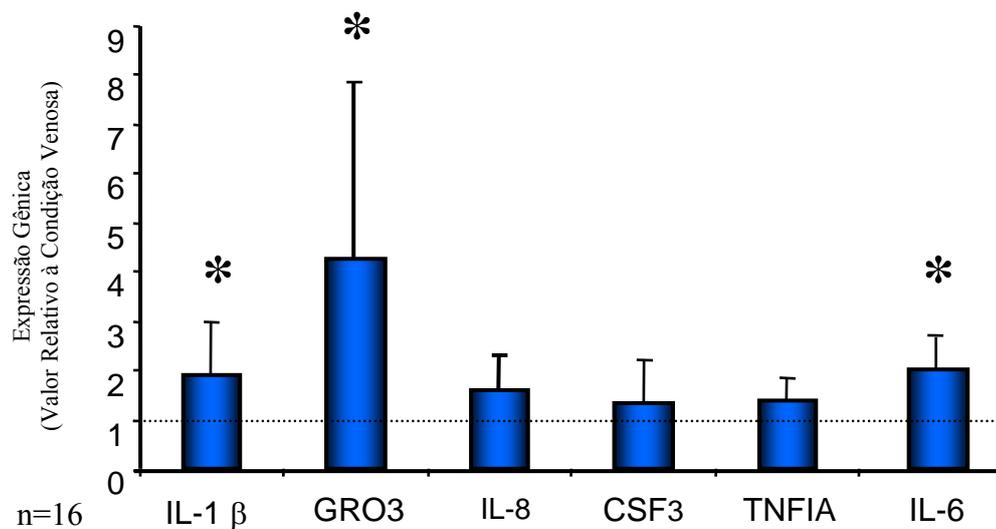


Figura 2. Quantificação por RT-PCR em tempo real da expressão dos genes candidatos em 16 pacientes. Veias safenas de cada paciente foram cultivadas em regime venoso (5 mL/min) e arterial (50 mL/min - 80 mmHg) por 1 dia. * $p < 0.05$ vs controle.

A IL-1 β é uma citocina cuja produção é regulada por mecanismos transcricionais e pós-translacionais. A atividade da IL-1 β ocorre através da interação com o receptor IL-1R1 cuja cascata de sinalização resulta em ativação de NF- κ B e AP-1. Esta atividade é modulada pelo antagonista natural do receptor de IL-1, o IL-1RA, que é capaz de ligar-se ao receptor IL-1R1, mas sem desencadear a sinalização intracelular. Para melhor caracterizar a participação da IL-1 β nos eventos observados na veia safena cultivada em regime hemodinâmico arterial, foram também avaliados a expressão do IL1R1 e IL-1RA. É interessante notar que a quando a veia safena é submetida à condição hemodinâmica arterial ocorre aumento da expressão de IL-1 β , diminuição do IL-1RA, enquanto que a expressão do receptor IL1R1 não é alterada (Figura 3). Assim, com o aumento da expressão de IL-1 β e diminuição da expressão

do seu antagonista IL-1RA, a IL-1 β vai estar mais disponível para atuar no receptor IL1R1.

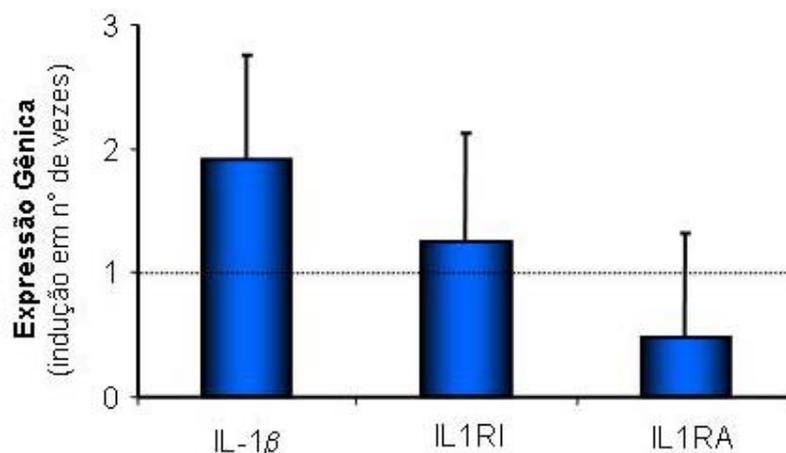


Figura 3. Quantificação por RT-PCR em tempo real da expressão da IL-1 β e seus componentes. Veias safenas de cada paciente foram cultivadas em regime venoso (5 mL/min) e arterial (50 mL/min - 80 mmHg) por 1 dia. n=16

A aterosclerose é considerada uma doença inflamatória crônica e a IL-1 β têm sido descrita como um componente importante para o seu desenvolvimento. Os monócitos, que participam ativamente do processo aterosclerótico, são uma das principais fontes de produção de IL-1 β que atua em diversos tipos celulares que compõem a lesão. Interessantemente, animais deficientes em IL-1 β apresentam menor lesão aterosclerótica (Kirii H, ATVB 2003) e aqueles deficientes em IL-1ra apresentam uma maior lesão vascular (Isoda K, Circulation 2003), mostrando a relevante participação deste sistema na doença aterosclerótica. Enquanto este sistema tem sido bastante estudado em processos patológicos arteriais, pouco se sabe sobre

sua participação em leito venoso. A doença do enxerto venoso apresenta vários aspectos semelhantes à aterosclerose encontrada em artérias e muito do que se sabe sobre a doença arterial tem sido extrapolada para o contexto venoso. Vale lembrar que veia e artéria, ainda que possuam composição semelhante, basicamente células endoteliais e musculares lisas, elas possuem funções distintas e estão expostas a estímulos hemodinâmicos e hormonais também distintos. Isto faz com que quando expostas a um mesmo estímulo, a veia possa responder de maneira diferente de uma artéria. Assim, ainda que se conheçam vários dos efeitos da IL-1 β no processo aterosclerótico arterial, o seu papel no enxerto venoso merece ser melhor investigado.

OBJETIVO

2. Objetivo

Caracterizar a expressão da IL-1 β no processo de arterialização venosa.

Objetivos específicos:

- Avaliar a produção de IL-1 β em enxerto venoso humano,
- Desenvolver um modelo em rato que mimetize as alterações estruturais e moleculares que ocorrem no enxerto venoso humano,
- Caracterizar o padrão temporal de regulação da IL-1 β no processo de arterialização venosa em rato.

3. Materiais

3.1 Reagentes, Sais e Drogas:

Dispostos conforme a procedência.

- Merck S/A:

Hematoxilina; Eosina; Etanol; Fucsina Ácida; Escarlata de *Briebrich*; Ácido Fosfomolibdico; Ácido Fosfotungstico; Peróxido de Hidrogênio; Citrato de Sódio; Ácido Tricloroacético; NaOH; Isopropanol; Glicerina.

- Sigma-Aldrich Co.:

Hoechst 33258; Triton X-100; NaCl; KCl; Na₂HPO₄; KH₂PO₄; NaHCO₃; Glucose; MgCl₂; EGTA; PIPES; *Fast Red*; Ácido Pírico; Resorcina; Dextrina; Nova Fucsina; Violeta Cristal; Azul B de Vitória; BSA; Brometo de Etídeo; HEPES.

- Gibco BRL - Invitrogen Co.:

DMEM; FBS; Penicilina; Estreptomicina; *Trizol*; Agarose; EDTA; Tris-HCl; DTT; dNTPs; oligo dT; RNAsin.

- Carlo Erba Reagenti:

Tiosulfato de Sódio; Azul de Anilina; Clorofórmio.

- Outros:

Formol (Rioquímica); Paraplast plus (Oxford Labware); *Citrisolv* (Fisher brand); Amônio Hidróxido, Ácido Acético e Ácido Clorídrico (Labsynth); Resina Erv-Mount (EasyPath); Cloreto de Ferro (Fluka); Peróxido de Hidrogênio e Pentobarbital (farmácia ICHCFMUSP); Leite desnatado (Nestlé); Gelatina (Vetec); Tripsina (Cultilab); [³H]timidina Radioativa e Líquido de Cintilação (Amersham Biosciences); Enzima Transcriptase Reversa *Improm II* (Promega); Xilol (Quimex); Lugol Forte (Dinâmica Reagentes Analíticos); Soro Fisiológico 0,9% estéril (Baxter); Ração (Nuvital); *Primers*; Heparina (Hipolabor); Ketalar (União Química S/A); Rompum (Vetbrandes).

3.2 Kits e Anticorpos:

In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Molecular Biochemicals); Anticorpo Monoclonal clone 1A4 contra α -actina de SMC (Sigma); DAB (Novocastra); Anticorpo policlonal contra PCNA (Zymed Laboratories, Inc.); kit LSAB + system-HRP Universal (Dakocytomation); kit LSAB + system-AP Universal (Dakocytomation); Anticorpo policlonal contra IL-1 β (Santa Cruz Biotechnology, Inc.); Anticorpo monoclonal contra VEGF-165 (R&D systems); *SYBR Green* kit (Applied Biosystems).

3.3 Produtos Plásticos e Descartáveis:

Placas de Cultura de Células de 6 e 24 Poços, Pipetas graduadas estéreis 25mL e Garrafas T75 (Nunc); Rodinho Estéril para Raspagem de Placa de Cultura (Costar Co.); Placas Real Time (Applied Biosystems); Tubos Falcons Estéreis 15 e 50mL e Pipetas graduadas estéreis 2, 5 e 10mL (Cellstar); Lâminas Foscas Lapidadas, Lamínulas e *Pap Pen Liquid Blocker* (EasyPath); Cassetes M480 (Simport Plastics); Fio de Sutura 10.0 (Ethicon, Johnson & Johnson); Gaiolas e Bebedouros (Beiramar Ltda); Papel Filtro (3M Co.); Tubos para Líquido de Cintilação (Wheaton); Ponteiras P1000, P200 e P2 e Eppendorfs estéreis 1500 e 200uL (Scientific Specialties Inc.);

3.4 Equipamentos:

Agitador Magnético Corning Modelo PC320 (Laboratory Stirrer); Autoclave Universal Modelo 105 (FABBE Primar Ind. Ltda); Balança AB104, Mettler PM2000 (Mettler Instrument Co.) e BG4001 (Gehaka); Banho-maria FABBE Modelo 169 (Primar IDL. Ltda); Câmara de Newbauer (Loptik Labor); Centrífuga Eppendorf Refrigerada Modelo 5417R (Brinkmann Instruments, Inc.); Centrífuga Sorvall RT7 (DuPont Company); Concentrador de Amostras *Concentrator5301* (Eppendorf); Contador Beta - *Flexi-Vial* Liquid Scintillation Counter 1209 (LKB Wallac, Inc.); Cubas para Eletroforese (Owl Separation System Inc.); Espectrofotômetro ND1000 (NanoDrop); Estufa 65°C (Quimis); Estufa de Cultura Orion 502 (FANEM); Fluxo Laminar (Veco do Brasil Ind.); Foco de Luz NI150 (Nikon Instruments Inc.); Fonte FB105 (Fisher Scientific) e Modelo 250 (Life Technologies, Gibco BRL

Electrophoresis Power Supply); Freezer -20°C (Brastemp); Freezer -80C (Forma Scientific, Bio Freezer); Inclusor de Tecidos Leica EG1160 (Leica Histology & E. M. Products); Incubadora de CO₂ Umidecida à 37C Modelo 3110 (Forma Scientific); Lupa Cirúrgica D.F. Vasconcellos M900 (DFV); Mesa Cirúrgica Aquecida K-MOD100 (Baxter Healthcare Co.); Microcentrífuga (Wealtec Co.); Microondas (Continental); Micropipetas Automáticas Reguláveis P1000, P200, P20, P10 e P2 (Gilson Medical Electronics); Microscópio de Fluorescência *modelo Axiovert 200* (Carl Zeiss, Inc.); Microscópio de Luz Leica DMLS (Leica Histology & E. M. Products); Microscópio Invertido Nikon TMS (Nikon, Inc.); Micrótomo Ergostar HM200 (Microm); Panela a Vapor Pascal (Dakocytomation); PH metro 40 pHmeter (Beckman); Pipetador Pipetting AID (Gilson Medical Electronics); Processador de Tecidos Leica TP1020 (Leica Histology & E. M. Products); Programa *GraphPad Prism versão 4.0* (GraphPad); Programa *Leica Qwin versão 2.2 Q500IW* (Leica Histology & E. M. Products); Refrigerador 4°C (Brastemp); RT-PCR Tempo Real ABI PRISM 7700 *Sequence Detector* (Applied Biosystems); Sistema de Cultura ex vivo (adaptado a partir de CELLMAX - Spectrum Laboratories); Sistema de Filtração de Água Ultrapura MilliQ Plus (Millipore Co.); Sistema de Imagem Eagle Eye II (Stratagene); Termocicladora PTC 200 (MJ Research, Inc.); Triturador e Homogeneizador de Tecidos PowerGen 125 (Fisher Scientific); Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Inc.).

4. Métodos

4.1. Obtenção das Veias Safenas Humanas:

As veias safenas humanas foram obtidas de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio por ponte de safena no Instituto do Coração (InCor), HC-FMUSP. Após o procedimento cirúrgico, os segmentos de veia safena retirados dos pacientes que não foram utilizados durante a cirurgia, foram levados ao Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor em soro fisiológico 0,9% estéril. Este protocolo de pesquisa nº638/04 juntamente com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexos V e VI).

4.2. Obtenção de Enxerto Venoso Humano :

Segmentos de enxerto venoso obtidos de material de necropsia foram selecionados retrospectivamente. Foi analisado o terço médio de enxertos venosos não trombosados com períodos pós-cirúrgicos de 1-5 dias (n=13) e 1-4 anos (n=15), cuja causa morte não foi por evento cardiovascular. Por se tratar de um protocolo de pesquisa retrospectivo, não houve a necessidade de termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelos familiares, assim, este protocolo foi adicionado ao projeto nº638/04, ambos aprovados pela CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.3. Caracterização Funcional da IL-1 β *in vitro*:

4.3.1. Cultura primária:

Fragmentos de veia safena humana, após a retirada da camada endotelial por atrito mecânico, foram cortados em pequenos pedaços e aderidos em placas de cultura tratadas com gelatina 0,3%. Após aproximadamente 1 semana com o crescimento de células musculares lisas foram ampliadas e caracterizadas com anticorpo anti- α actina SMC. As SMC de veia safena humana foram cultivados em meio de cultura modificado da Dulbecco (DMEM) suplementado com 20% de soro fetal bovino (FBS), 100U/mL de penicilina (P) e 100U/mL de estreptomicina (S) em estufa umidecida à 37C e 5% de CO₂.

4.3.2. Incorporação de [³H]timidina no DNA da célula:

Células de músculo liso primárias de veia safena humana foram cultivadas em placas de 24 poços (2x10⁴ células/poço) e mantidas em meio de cultura DMEM e suplementos por 20 horas. Em seguida, as células foram incubados por três dias com DMEM, P/S e 0,5% de Albumina bovina sérica (BSA) para sincronização do ciclo celular em G₀. O estímulo para proliferação celular foi de 48 horas sendo que a [³H]timidina (10uCi/mL) foi adicionada nas últimas 24 horas.

Para a determinação da quantidade de [³H]timidina incorporada ao DNA, as células foram lavadas com PBS, incubadas por 5 minutos com 15% de ácido tricloroacético (TCA), desidratadas com álcool absoluto duas vezes por 5 minutos e

lisadas com 250uL de NaOH a 0,25N. Após 10 minutos foi feita a remoção celular por raspagem da placa, 100uL dessa solução foi diluída em 400uL de água MilliQ e, adicionada em 5mL de líquido de cintilação para contagem no Contador Beta - *Flexi-Vial*.

4.4. Modelo de Enxerto Venoso no Rato:

- Conexão Artério-Venosa da Veia Jugular Externa em Artéria Carótida Comum:

Foram usados ratos Wistar machos de 12 a 14 semanas de idade, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os ratos foram mantidos, por todo o período com livre acesso a água e comida, temperatura controlada entre 22 e 24°C, com ciclo claro-escuro de 12 horas e, em número de no máximo 5 animais por gaiola. O protocolo de pesquisa nº418/03, abaixo, foi aprovado pela CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da FMUSP (Anexo IV).

Ratos pesando 250g a 350g foram heparinizados com 70UI/Kg via intraperitoneal. Após trinta minutos foram anestesiados com ketalar (50mg/Kg) e rompum (10mg/Kg). A veia jugular externa direita foi dissecada na porção distal, clampeada e cortada. A artéria carótida comum, depois de dissecada, foi clampeada e cortada. A veia jugular externa foi então ligada à artéria carótida comum por anastomose término-terminal, utilizando o fio de sutura 10.0, formando uma junção artério-venosa da veia jugular na artéria carótida (Figura 4). Após a ligadura cirúrgica, o fluxo sanguíneo foi restabelecido e os animais acompanhados por 1, 3, 7,

14, 28 e 90 dias. A tabela 2 apresenta o número de cirurgias realizadas distribuída entre os grupos de estudo e o número utilizado em cada experimento.

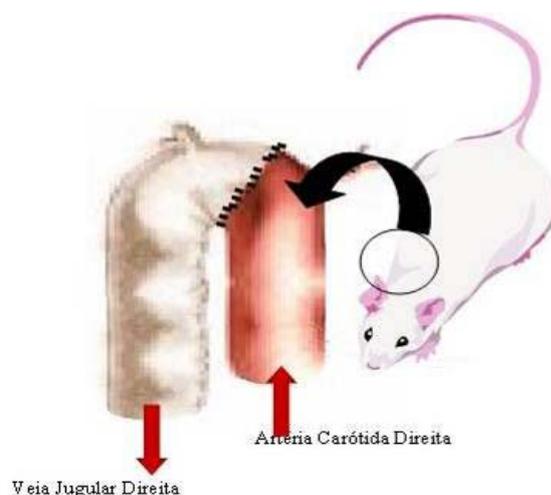


Figura 4. Representação esquemática da Conexão Artério-Venosa entre artéria carótida comum direita e veia jugular externa direita, realizada em ratos. As setas indicam a direção do fluxo sanguíneo.

Tabela 2. Número total de animais utilizados nas cirurgias de conexão artério-venosa, distribuída entre os grupos de estudo e o número utilizado em cada experimento.

Grupos	Histologia	RNA (piloto)	RNA (RT-PCR em Tempo Real)	Degradado	Proteína (Proteoma)	Microscopia Eletrônica	Óbitos	Total
1	7	25	11	2	9	2	-	56
3	10	20	12	2	5	2	-	51
7	10	14	8	4	-	1	-	37
14	10	7	5	4	5	1	-	32
28	10	6	4	9	3	1	-	33
90	5	5	4	6	-	1	-	21
IL1RA	9	-	-	-	-	-	-	9
Placebo	5	-	-	-	-	-	-	5
Total	66	77	44	27	22	8	107	351

Após esses períodos os animais foram sacrificados com superdoses de pentobarbital intraperitoneal (anestésico que provoca intensa secreção nas vias aéreas, por isso pouco utilizado para cirurgias) e heparina, esta última para evitar a coagulação sanguínea. Para análise histológica os animais foram perfundidos sob infusão e pressão constantes a 80mmHg, com soro fisiológico 0,9% acrescido de 14mM KCl para induzir a parada cardíaca em diástole e permitir a saída de todo o fluxo sanguíneo, em seguida foi infundido formaldeído tamponado a 4%, para fixação e conservação dos tecidos. O sítio cirúrgico foi exposto e a veia jugular foi dissecada, retirada e mantida em formaldeído tamponado a 4% até seu processamento. Para a avaliação da expressão gênica, após perfusão com soro fisiológico 0,9%, a veia jugular foi acondicionada individualmente em tubos estéreis, congelada imediatamente em nitrogênio líquido e armazenada em freezer -80°C.

Veias jugulares de animais intactos foram utilizadas como controle (n=5), uma vez que a veia jugular contra-lateral dos animais submetidos a cirurgia 1 dia (n=5), 3 dias (n=9), 7 dias (n=8), 14 dias (n=9), 28 dias (n=8) e 90 dias (n=5), apresentaram alterações estruturais devido ao aumento do fluxo sanguíneo após a cirurgia de junção artério-venosa (Figura 5).

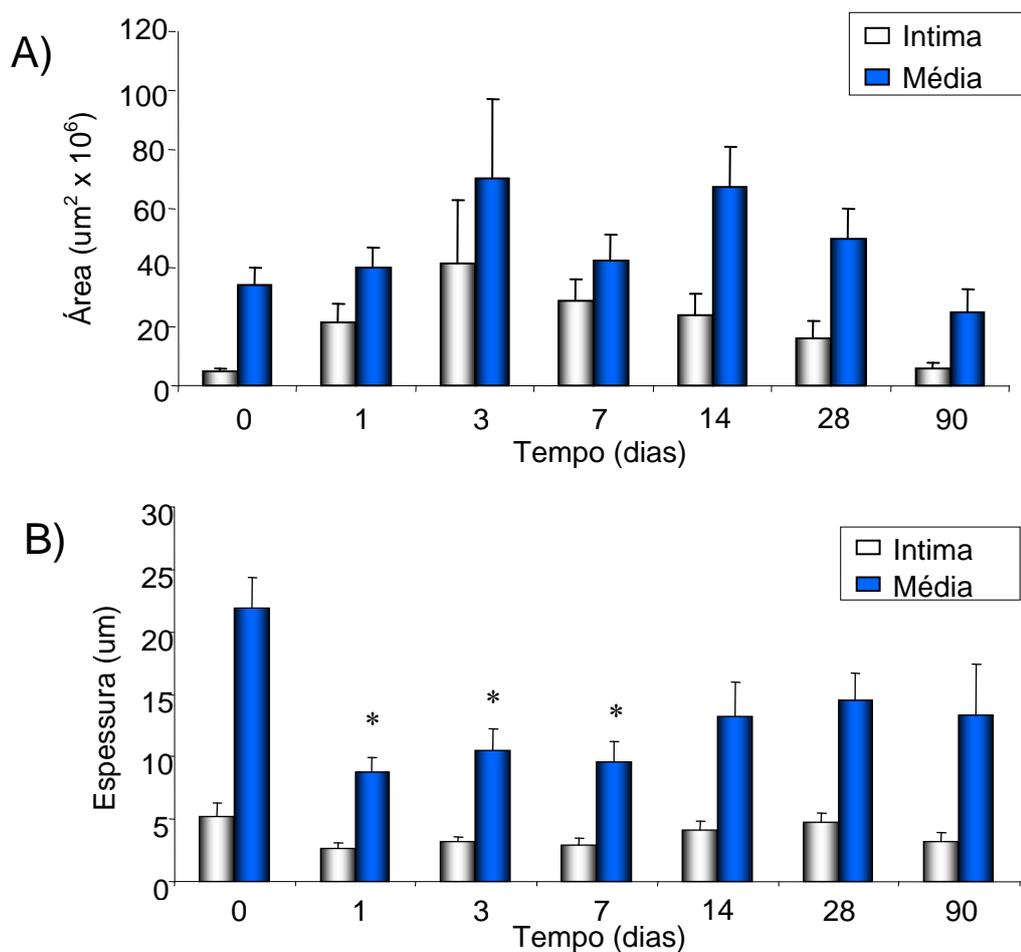


Figura 5. Quantificação da **A)** área e **B)** espessura da veia jugular normal (0) e da veia jugular contra-lateral dos ratos com cirurgia de conexão artério-venosa após 1, 3, 7, 14, 28 e 90 dias. As barras em branco representam a túnica íntima e em azul túnica média. * $p < 0,05$.

4.5. Análise Histológica:

Os segmentos do enxerto venoso, veia contra-lateral e veia jugular controle foram colocados em formalina tamponada 4% por um período de 24 a 48 horas. Então, o material foi processado e incluído em *paraplast*, em seguida cortado em

micrótomo em espessura de 3 μ m. Para padronizar o local de análise, os cortes foram iniciados a 400 μ m a partir da sutura.

Foram realizadas as seguintes colorações:

- Hematoxilina-Eosina (HE): que permite a visualização da integridade do tecido com coloração azul no núcleo e rosa no citoplasma.

Os tecidos foram desparafinizados em *citrisolv* (substituto do xilol), hidratados em graduações decrescentes de álcool e corados com hematoxilina de *Harris* por 7 minutos, enxaguados em água corrente e em seguida mergulhados rapidamente na seqüência de: ácido clorídrico a 0,01% para diferenciar a coloração, água corrente, água amoniacal a 1% para azular a hematoxilina e incubados com eosina alcoólica por 5 minutos, então, clareados em álcool e desidratados em graduações crescentes de álcool, diafanizados e montados em resina.

- *Verhoeff - Van Gienson* (VVG): para visualização das lâminas elásticas.

Os tecidos foram desparafinizados em *citrisolv*, rehidratados em graduações decrescentes de álcool e imersos numa solução de hematoxilina de *Verhoeff* por 20 minutos para marcar as laminas elásticas, enxaguados em água corrente e em seguida mergulhados rapidamente cloreto de férrico a 2% para clarear o tecido, incubados em hipossulfito de sódio a 5% por 2 minutos para fixar a marcação e contra-corados com *Van Gienson* por 5 minutos, então, é retirado o excesso de contra-coloração com papel filtro, desidratados em graduações crescentes de álcool, diafanizados e montados em resina.

- Tricrômio de Masson (TM): Para visualização de colágeno.

Os tecidos foram desparafinizados em *citrisolv*, hidratados em graduações decrescentes de álcool e corados com hematoxilina de *Weigert* por 5 minutos, enxaguados em água corrente, incubados com escarlata de *Briebrich* por 5 minutos, enxaguados por duas vezes em água deionizada, sendo que no segundo enxágüe mantêm-se os tecidos submersos por mais 5 minutos, em seguida incuba-se em diferenciador de *Masson* por 7 minutos, depois em azul de anilina a 2% por 5 minutos, então, clareados em água deionizada de 4 a 5 vezes, desidratados em graduações crescentes de álcool, diafanizados e montados em resina. A avaliação foi em microscópio de luz de modo qualitativo.

4.6. Morfometria:

Área e espessura do lúmen, fibrina, túnica íntima, túnica média mais adventícia foram avaliados em três cortes consecutivos por vaso. A espessura dos vasos foi determinada através de 16 medidas em cada corte como mostrado na Figura 6A. As áreas das camadas vasculares foram obtidas através da quantificação das áreas determinadas pelo lúmen, da lâmina elástica interna e externa. Essas medidas foram feitas por dois avaliadores igualmente treinados e cegos quanto ao conteúdo das lâminas. Ao final das análises os dados foram comparados e os casos indefinidos contraditórios foram vistos por um terceiro examinador. As quantificações foram realizadas através do programa *Leica Qwin* versão 2.2 Q500IW.

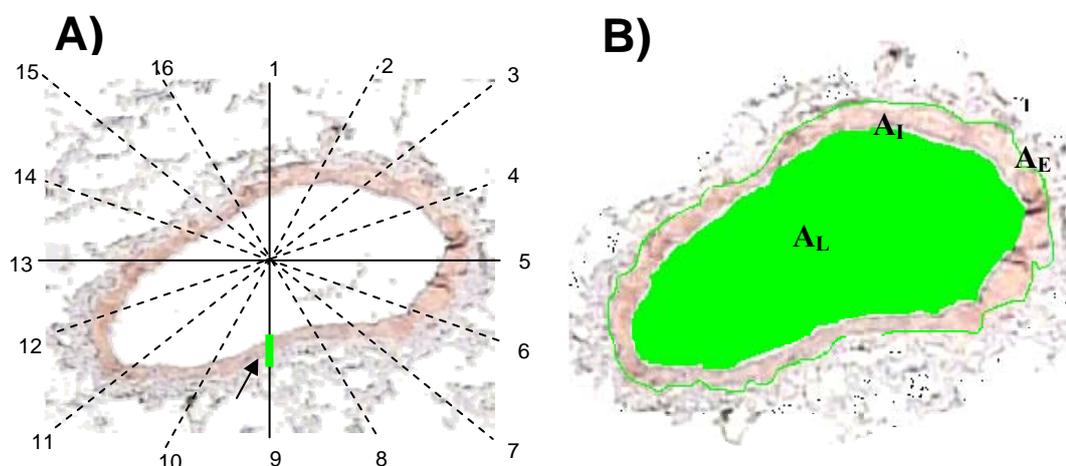


Figura 6. Esquema representativo da quantificação dos vasos. **A)** A espessura do vaso em cada corte foi avaliada em 16 regiões onde a seta indica a espessura da camada média. **B)** As áreas das camadas vasculares foram obtidas pela quantificação das áreas determinadas pelo lúmen (A_L), lâmina elástica interna (A_I) e lâmina elástica externa (A_E). Área da íntima = $A_I - A_L$, Área da média = $A_E - A_I$. Em verde está representada a área do lúmen.

4.7. Densidade Celular:

Segmentos vasculares foram fixados em formaldeído tamponado a 4%, parafinizados e cortados a $3\mu\text{m}$ de espessura. Os tecidos foram desparafinizados em *citrisolv*, hidratados em várias graduações de álcool e corados com *Hoechst 33258* conforme descrito por Liu & Fung (1998), que é específico para regiões ricas em adenina e timina (AT) marcando o núcleo celular. Para tal, os cortes foram permeabilizados por 15 minutos em temperatura ambiente com 0,5% de triton X-100 em solução tampão (NaCl 137mM, KCl 5mM, Na_2HPO_4 1,1mM, KH_2PO_4 0,4mM, NaHCO_3 4mM, glucose 5,5mM, MgCl_2 2mM, EGTA 2mM, PIPES 5mM, pH 6,1), e após lavagem três vezes com PBS por 5 minutos, foram incubadas em temperatura ambiente com *Hoechst 33258* ($20\mu\text{g/mL}$ em solução tampão) por 30 minutos. Após

lavagens as lâminas foram montadas em meio aquoso e analisadas quanto ao número total de células por área, sem separação entre as camadas vasculares, em 8 campos diferentes por vaso, seguindo o sentido horário contornando todo o vaso, no aumento de 40x em microscópio de fluorescência *Zeiss modelo Axiovert 200* com excitação em 450nm e emissão em 346nm.

4.8. Morte Celular:

O ensaio de TUNEL - *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*, utilizando o *In Situ Cell Death Detection Kit*, foi realizado conforme instruções do fabricante. Este método cora o núcleo de células com DNA fragmentado por meio da incorporação de nucleotídeos marcados com fluoresceína no OH livre da porção terminal 3' fragmentada. A visualização pode ser realizada diretamente no microscópio de fluorescência ou ainda após utilização de um anticorpo secundário anti-fluoresceína conjugado à fosfatase alcalina. Os tecidos parafinados, cortados a 3µm de espessura submetidos à reação de TUNEL depois de revelados para fosfatase alcalina com *fast red* por 20 minutos e contra-corados com hematoxilina de *harris* por 1 minuto, foram montados em meio aquoso e analisados em microscópio de luz. Para a quantificação foram escolhidos 8 diferentes campos no sentido horário do vaso, na objetiva de 40x, para a contagem do número de células positivas para apoptose, marcadas em vermelho e do número total de células.

4.9. Imunohistoquímicas:

Os tecidos foram desparafinados em xilol, hidratados em graduações decrescentes de álcool e água. Para bloqueio para peroxidase endógena, os cortes foram banhados em peróxido de hidrogênio 7 vezes, por 3 minutos, e a recuperação antigênica foi feita por panela a vapor em solução de citrato de sódio 10mM, pH6,0, por 3 minutos, a 125°C. Para bloquear as reações inespecíficas os tecidos foram banhados com leite desnatado a 2% por 20 minutos e, então, incubados com o anticorpo primário diluído em solução de BSA 5% em PBS (NaCl 137mM, KCl 2,5mM, Na₂HPO₄ 10mM e KH₂PO₄ 176mM, pH 7,4) na concentração titulada previamente (Tabela 3), que será mostrada a seguir. Após 18h de incubação a 4°C, os tecidos foram lavados 3 vezes por 5 minutos com PBS e incubados com solução 1 do kit LSAB HRP Universal por 20 minutos a 37°C, que possui anticorpos secundários anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra. Depois de lavados em PBS os tecidos foram incubados com solução 2 do kit LSAB HRP Universal que contém complexo estreptavidina conjugado com HRP, para amplificação do sinal do anticorpo primário e, então, foram revelados em solução de Diaminobenzidina Tetrahydroclorida por 7 minutos. Foi aplicada contra-coloração por hematoxilina de *Harris* por 1 minuto, para observar os núcleos das células marcadas. As lâminas foram então montadas em resina e avaliadas segundo sua marcação.

- α -Actina SMC:

Para visualização das SMC foi realizada imunohistoquímica para α -actina de SMC em que a coloração marrom identifica as células que contém a proteína identificada pelo anticorpo. Os tecidos também foram contra-corados com a coloração de Miller que cora em azul as lâminas elásticas para melhor visualização das túnicas vasculares. Após desparafinização os tecidos foram corados com Miller por 1 hora, clareados em graduações crescentes de álcoois e enxaguados em água deionizada para fixação da coloração. A contra-coloração é inicialmente realizada por se tratar de uma solução muito ácida e alcoólica, que retira a imunomarcação se realizada após a mesma. Em seguida, os cortes são incubados com anticorpo monoclonal contra α -actina de SMC (clone 1A4) diluído na concentração de 16,2 μ g/mL (1:500) em solução de BSA 5% em PBS. A quantificação de área de marcação e área total do vaso foi realizada em microscópio de luz utilizando o programa *Leica Qwin* versão 2.2 Q500IW.

- PCNA:

Para visualização das células em proliferação foi realizada imunohistoquímica para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). O anticorpo primário monoclonal contra PCNA (clone PC10), foi diluído na concentração de 0,132 μ g/mL (1:1000) em solução de BSA 5% em PBS. A quantificação do número de células positivas coradas em marrom e do número total de células foi realizada em microscópio de luz.

- IL-1 β :

Para a identificação da IL-1 β foi utilizado o anticorpo primário policlonal contra IL-1 β diluído na concentração de 1 μ g/mL (1:200) em solução de BSA 5% em PBS, revelado para fosfatase alcalina com *fast red* por 20 minutos. Anteriormente, nestes cortes foi realizado também marcação para α -actina de SMC conforme a concentração e coloração já especificada. A quantificação de área de marcação em vermelho para IL-1 β e em marrom para α -actina de SMC juntamente com a área total do vaso, foi realizada em microscópio de luz utilizando o programa *Leica Qwin* versão 2.2 Q500IW.

Tabela 3. Lista dos Anticorpos e Reagentes utilizados para caracterização da veia jugular de rato arterializada disposta quanto à concentração de uso e especificidade tecidual.

Anticorpo/Reagentes	Uso (ug/mL)	Diluição	Especificidade	Produzi do em:
Hoechst 33258	20ug/mL	1:50	nuclear	-
TUNEL	-	1:10	DNA fragmentado	-
α -Actina SMC	16,2ug/mL	1:500	H	C
IL-1 β	1ug/mL	1:200	H,R,C	R
PCNA	0,132ug/mL	1:1000	H	R

H: humano; R: rato; C: camundongo.

4.10. Expressão Gênica no Processo de Arterialização da Veia Jugular de

Rato:

4.10.1. Extração de RNA:

O RNA total foi extraído utilizando o Reagente de *Trizol* conforme instruções do fabricante. Este protocolo baseia-se no método de Czumczynski & Sacchi (1987) que utiliza solução de fenol e isotilcianato de guanidina. A integridade do RNA extraído foi verificada em gel de agarose através da visualização das bandas referentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S e ausência de degradação.

4.10.2. Síntese de cDNA:

Foram utilizados 1µg de RNA total para o síntese de cDNA. A reação de transcriptase reversa foi realizada utilizando 200U de enzima *Improm II*, em solução tampão (Tris-HCl 250mM, pH8,3, KCl 375mM, MgCl₂ 15mM), 0,1M de DTT, 10mM de dNTPs, 0,5µg/µL oligo dT e 40U/µL de RNAsin.

4.10.3. RT-PCR em Tempo Real:

Após a síntese de cDNA a partir de RNA total. A reação de RT-PCR em tempo real foi realizada no ABI PRISM 7700 *Sequence Detector* utilizando *primers* específicos para o gene de interesse e o gene GAPDH como normalizador com detecção por *SYBR Green*. IL-1β (sense: 5' tgaagcagctatggcaactg 3' e antisense: 5'

atcttttggggtctgtcagc 3') e GAPDH (sense: 5' ttadcaccctggccaagg 3' e antisense: 5' cttactccttggaggccatg 3').

4.11. Análise Estatística:

Todos os resultados estão representados como media \pm erro padrão da média e comparados por análise de variância (ANOVA) de um caminho. Obtendo-se diferenças significativas entre os grupos, foram feitas comparações complementares pelo teste de Tukey, utilizando o programa *GraphPad Prism versão 4.0* (2003). Os dados foram considerados significativamente diferentes para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

5. Resultados

Dados anteriores do laboratório, utilizando a tecnologia de *cDNA microarray*, mostram que a IL-1 β é um gene que apresenta sua expressão aumentada em veia safena humana cultivada em regime arterial. No presente trabalho a expressão da IL-1 β foi verificada em enxertos humanos de veia safena e o papel funcional da IL-1 β foi avaliado em cultura primária de células musculares lisas de veia safena humana. Além disto, foi desenvolvido e caracterizado um modelo animal de arterialização de segmento venoso para que a expressão da IL-1 β pudesse ser avaliada de maneira temporal.

5.1. Avaliação da Produção de IL-1 β em Enxertos de Veia Safena

Humana:

Para certificar se o aumento de IL-1 β observado na veia safena cultivada em regime hemodinâmico arterial ocorre *in vivo*, segmentos de enxerto venoso obtidos de material de necropsia foram analisados. É importante ressaltar que a causa morte dos indivíduos não foi por evento cardiovascular. Como controle foi utilizado segmentos de veia safena humana não utilizada em cirurgias de revascularização cardíaca. Imuno-histoquímica para IL-1 β mostrou que a proteína encontra-se aumentada após os primeiros dias de enxerto (1-5 dias) e parece retornar aos níveis basais em tempos mais tardios (1-4 anos) (Figura 7).

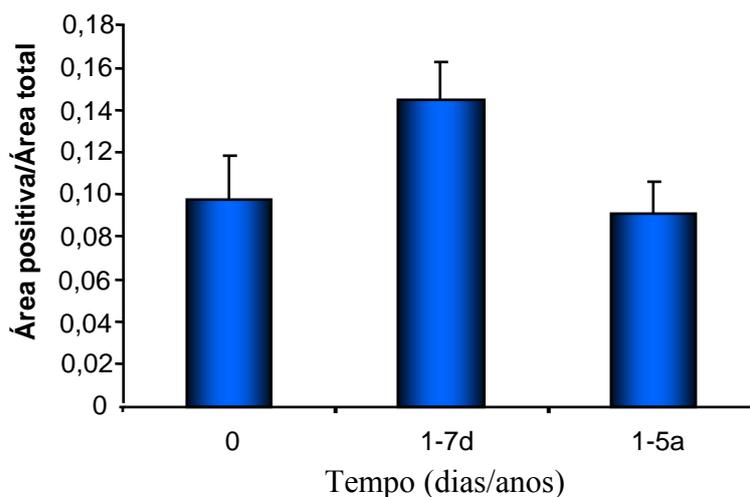


Figura 7. Imunohistoquímica para IL1 β em segmentos de enxerto venoso obtidos de material de necropsia nos tempos de 1-5 dias e 1-4 anos após cirurgia de revascularização do miocárdio.

5.2. Análise Funcional *in vitro* da IL-1 β :

Para avaliar possíveis efeitos relacionados ao aumento da IL-1 β no enxerto de veia safena, cultura primária de células de músculo liso de veia safena foi tratada com IL-1 β . Já é bem descrito que uns dos efeitos observados nos períodos iniciais do processo de arterialização é a presença de processo apoptótico (Rodriguez e cols., 2000). A IL-1 β parece estar relacionada com a diminuição da proliferação celular, porém sem induzir apoptose (Figuras 8 e 9). Além disto, o aumento de IL-1 β pode induzir aumento de produção de VEGF (Figura 10), que pode ser importante para re- endotelização do enxerto e sinergicamente com a IL-1 β pode atuar como quimiocinas para atrair células progênitoras circulantes e residentes que contribuem para o remodelamento observado no processo de arterialização observado nos enxertos venosos (Dulak e cols., 2000; Jung e cols., 2001; Mayr e cols., 2006).

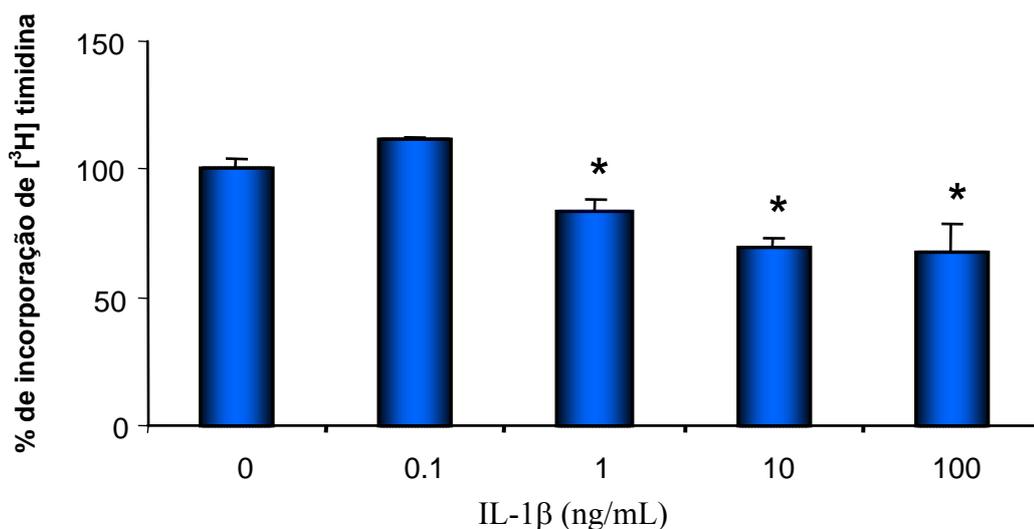


Figura 8. Curva dose-resposta da incorporação de [3 H]-Timidina no DNA de células primárias de músculo liso de safena humana tratadas com IL-1 β . Três dias de incubação em 0,5%BSA, seguido de 48 horas de estímulo na presença de 10% de FBS. [3 H]-Timidina (10uCi/mL) foi adicionada nas últimas 24 horas. Cada barra representa média \pm erro padrão de 5 experimentos em triplicata. Os dados foram normalizados em relação ao estímulo de 10% de FBS. * $p < 0.05$

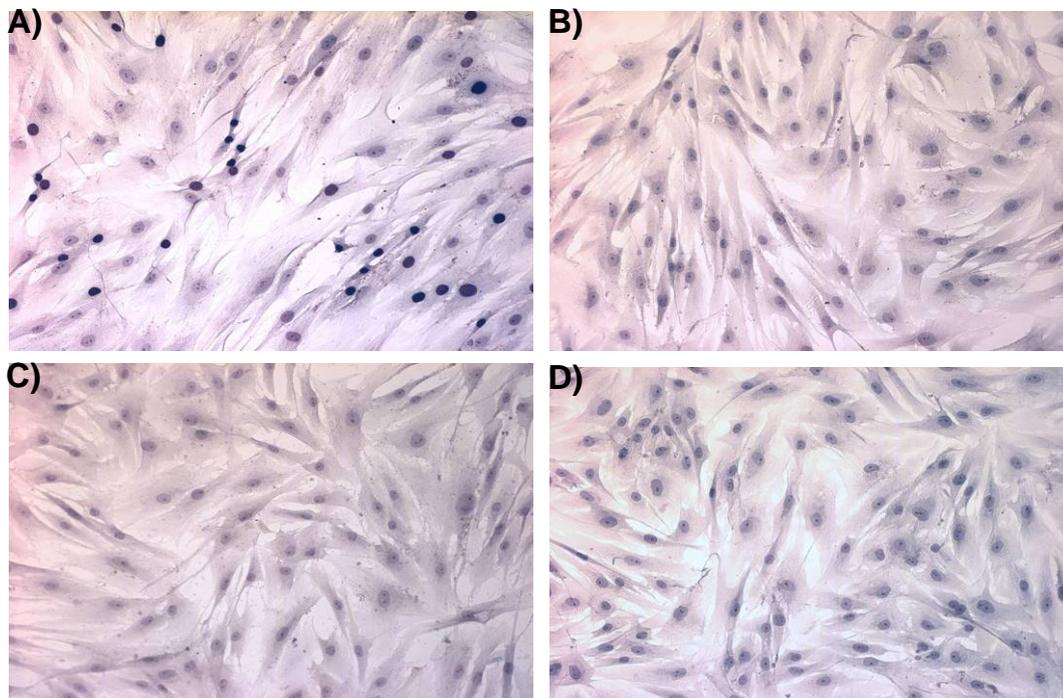


Figura 9. Ensaio de TUNEL em SMC primária de veia safena humana, tratadas com IL-1 β . **A)** Controle positivo, tratado com DNase; **B)** Controle negativo, sem tratamento; **C)** Células tratadas com 1ng/mL de IL-1 β e **D)** Células tratadas com 10ng/mL de IL-1 β .

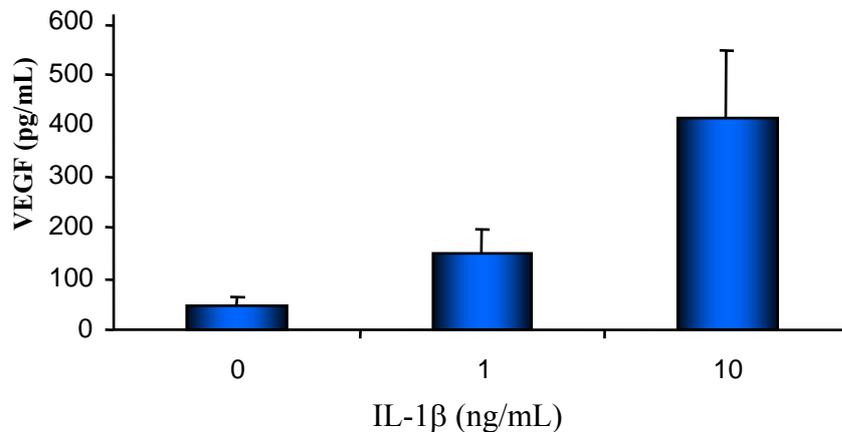


Figura 10. Produção de VEGF por células de músculo liso de veia safena humana estimuladas com IL-1 β . Cada barra representa média \pm erro padrão de 3 experimentos em triplicata. Os dados foram normalizados em relação ao estímulo de 0,5% de FBS.

5.3. Modelo de Arterialização de Segmento Venoso em Ratos:

Para o desenvolvimento do modelo de arterialização de segmento venoso foram testados 4 modelos: 1) Enxerto de veia jugular em aorta abdominal, 2) Interligação de aorta abdominal e veia cava, 3) Interposição de veia jugular em artéria carótida, e 4) Conexão artério-venosa da veia jugular em artéria carótida. Este último foi o modelo implementado com sucesso, cuja caracterização será mostrada a seguir. A descrição dos demais modelos pode ser encontrada no Anexo I.

A conexão artério-venosa é também utilizada como modelo indutor crônico de insuficiência cardíaca congestiva, e por este motivo foram avaliadas as câmaras cardíacas dos animais submetidos à arterialização. Foi observado aumento no peso dos átrios direito e esquerdo, e também do ventrículo direito. Entretanto, o ventrículo esquerdo não apresentou alteração significativa (Anexo II). Os dados encontrados sugerem alterações anatômicas, que podem vir a comprometer a função cardíaca a

longo prazo, mas nos períodos estudados para a arterialização da veia jugular parece não comprometer funcionalmente o coração do animal.

5.3.1. Análise Histológica e Morfométrica:

A veia jugular de rato possui uma túnica íntima formada pela monocamada endotelial que está separada da média por uma lâmina elástica interna (LEI), a qual é o componente mais externo da íntima. Esta lâmina, composta principalmente de elastina possui fenestras que permitem a difusão de substâncias para nutrir células situadas mais profundamente na parede do vaso (Junqueira & Carneiro, 2005). A túnica média é formada por uma fina camada de células musculares lisas entremeadas com fibras reticulares e elásticas. A adventícia é bem desenvolvida e rica em colágeno, sendo a mais espessa das túnicas (Figura 11). No entanto, após o 1º dia arterialização, esta camada frouxa de colágeno situado na adventícia, corada em azul pelo TM, torna-se progressivamente maior e mais compacta, confundindo-se com a camada média a partir do 7º dia de cirurgia (Figuras 11D). Quando a veia é arterializada, as alterações observadas são bastante complexas, tornando a delimitação da camada média bastante difícil. Assim, além das colorações de HE, VVG e TM, foi realizada também a reação de Imunohistoquímica para α -actina de SMC contra-corada com Miller, para que as SMC pudessem ser visualizadas juntamente com as lâminas elásticas e, desta forma, melhor caracterizar as alterações encontradas no processo de arterialização. Foram avaliados segmentos de veia jugular arterializada de 1 dia (n=5), 3 dias (n=9), 7 dias (n=8), 14 dias (n=9), 28 dias (n=8) e 90 dias (n=5) após a cirurgia.

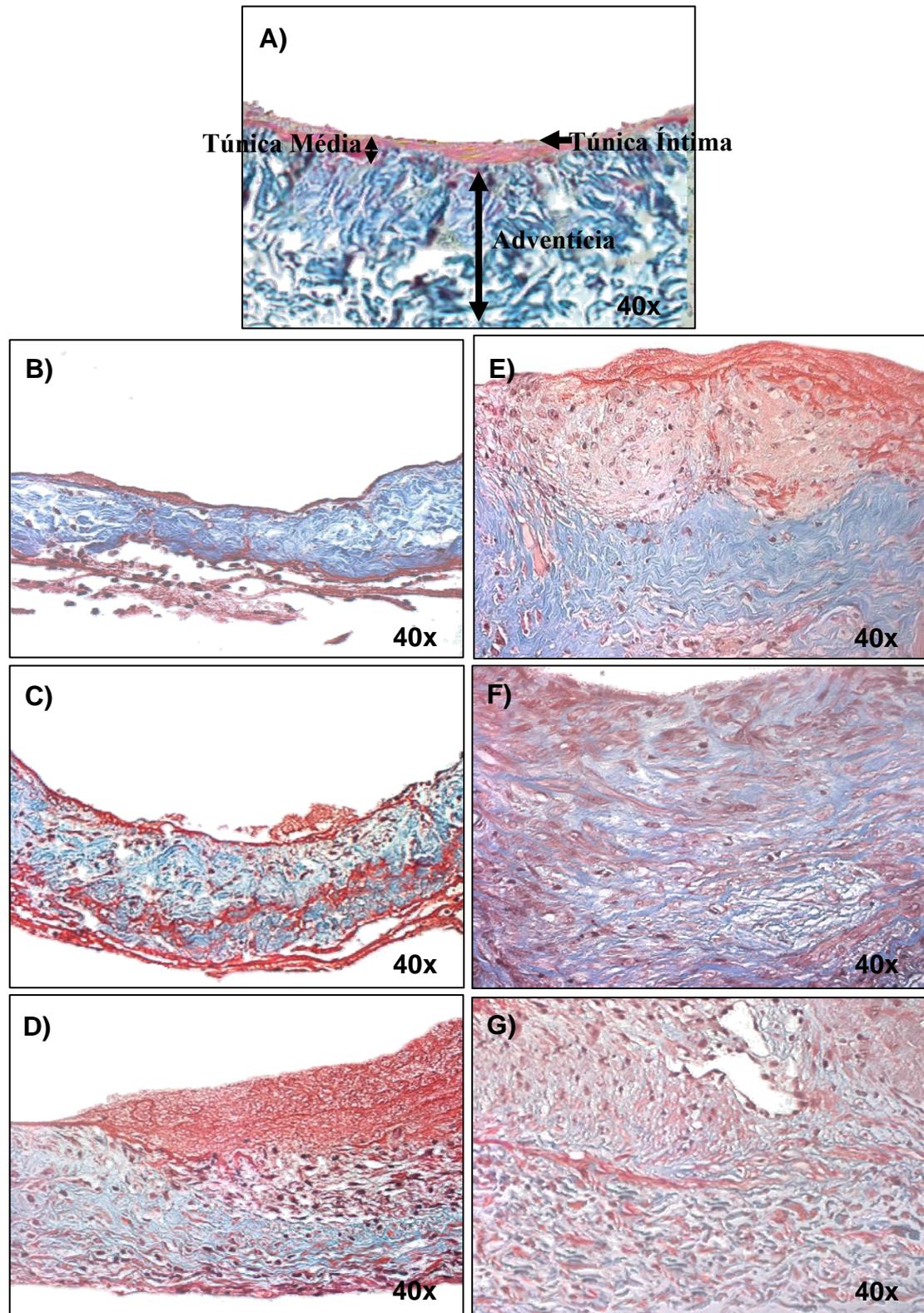


Figura 11. Cortes histológicos de veia jugular de rato corados com Tricrômio de Masson. (A) Veia Jugular Normal, (B) 1 dia, (C) 3 dias, (D) 7 dias, (E) 14 dias, (F) 28 dias e (G) 90 dias após arterialização. Aumento de 40x.

Em grande parte dos segmentos arterializados foi observada a formação de fibrina, sendo bastante presente após 1-3 dias de cirurgia (Figuras 12). Além da fibrina, foram quantificadas a área e a espessura das camadas íntima/neoíntima e camada média juntamente com a adventícia (Figura 13). Enquanto a túnica íntima é bem delimitada, os limites entre a média e a adventícia não são de fácil identificação, por isso ficou determinado a medida da média juntamente com a adventícia. Durante o processo de arterialização, observou-se formação progressiva da camada neoíntima, com aumento significativo tanto de área como de espessura (Figuras 14, 16 e 17). Da mesma maneira, pôde-se verificar um espessamento da camada média com cerca de 3 vezes de aumento após 7-14 dias de cirurgia e mantido até 90 dias (Figuras 14, 16 e 17). A formação da neoíntima parece ser mais pronunciada do que o espessamento da camada média/adventícia, o que fica mais evidente quando avaliado a relação íntima/média tanto da área como da espessura (Figura 13C).

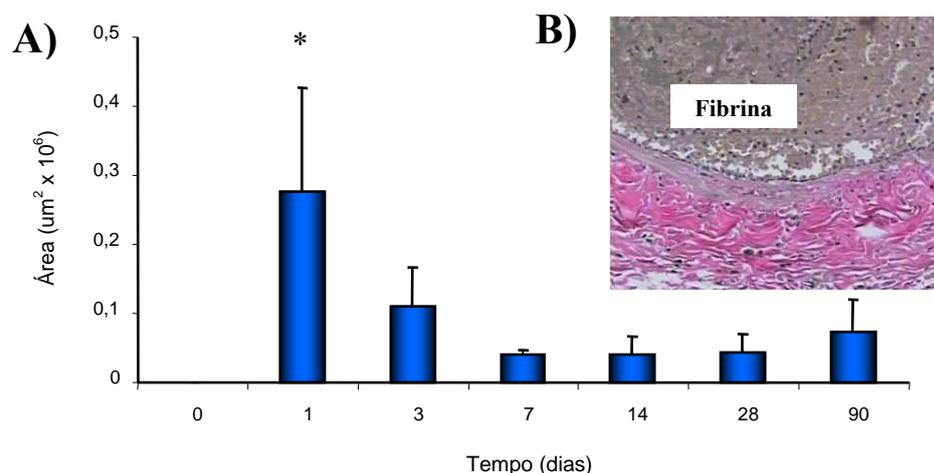


Figura 12. A) Quantificação da área de fibrina na veia jugular de rato arterializada comparado com a veia jugular normal (0) B) Foto representativa de 1dia. Aumento de 40x. * $p < 0.05$ vs veia jugular normal.

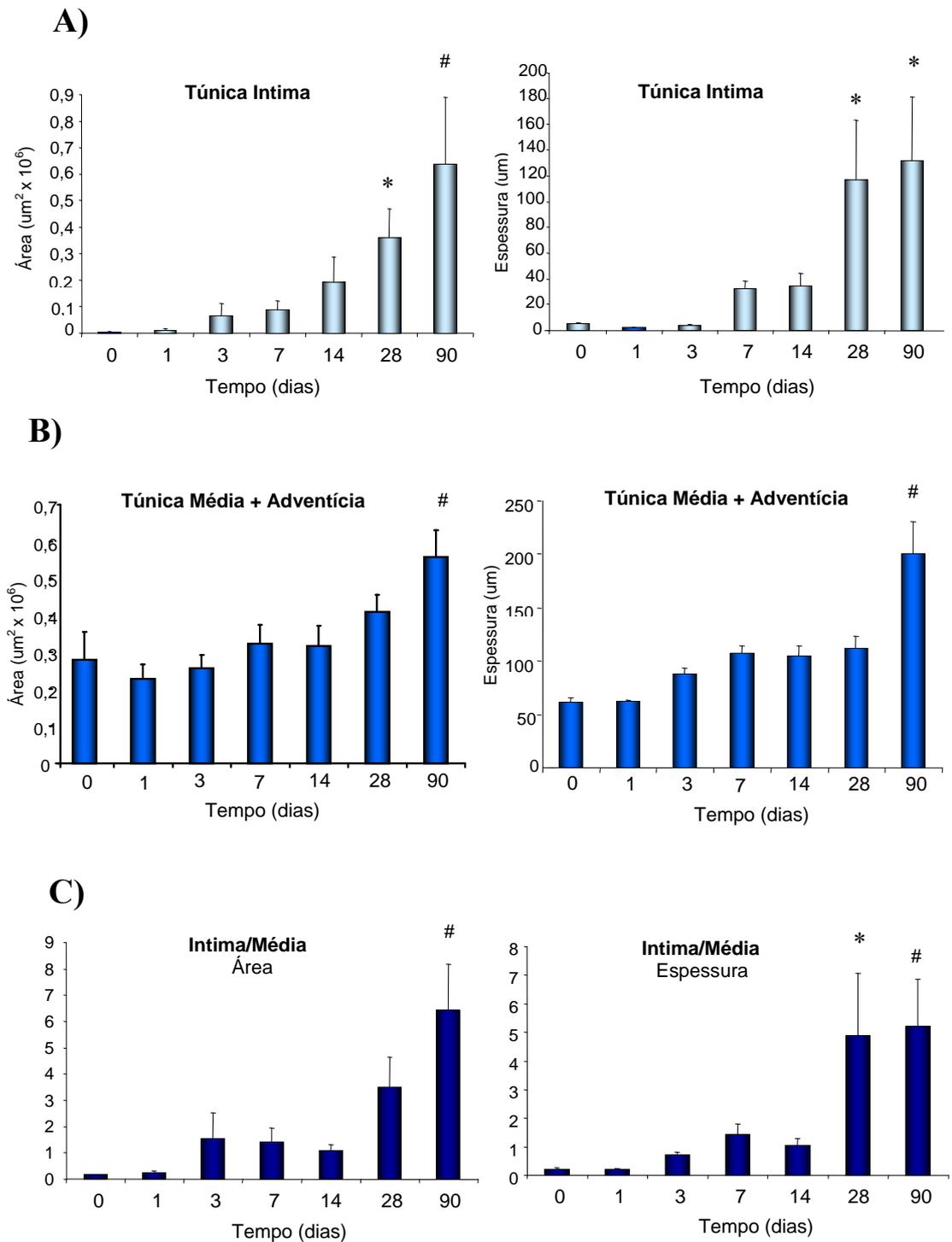


Figura 13. Quantificação da área e espessura da **A)** túnica íntima, **B)** túnica média e adventícia e em **C)** relação íntima/média em relação ao tempo. * $p < 0.05$ vs veia jugular normal, # $p < 0.001$ vs veia jugular normal.

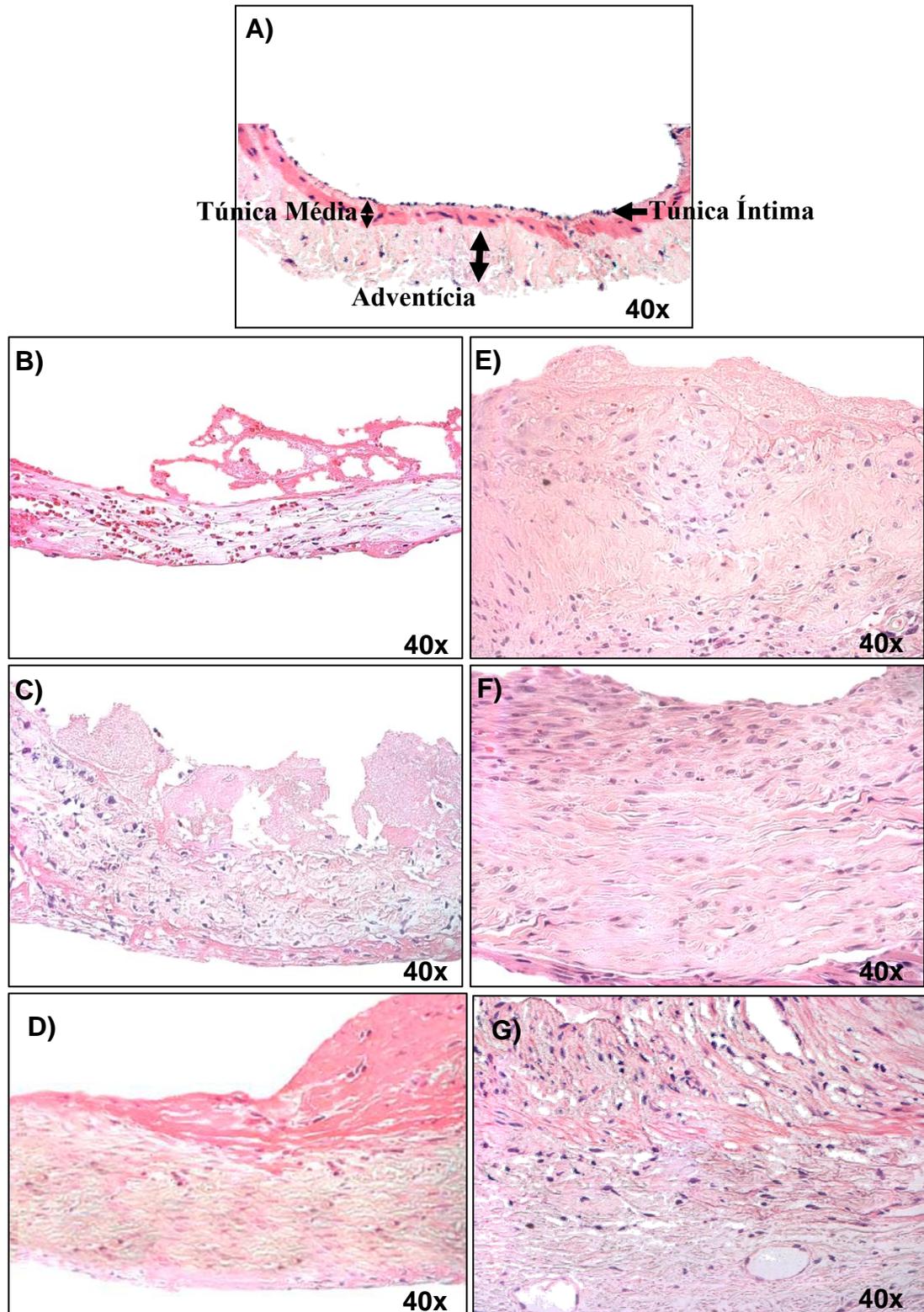


Figura 14. Cortes histológicos de veia jugular de rato corados com Hematoxilina e Eosina. (A) Veia Jugular Normal, (B) 1 dia, (C) 3 dias, (D) 7 dias, (E) 14 dias, (F) 28 dias e (G) 90 dias após arterialização. Aumento de 40x.

Um fato que chamou a atenção neste modelo foi à perda de SMC nos primeiros dias de arterialização. A marcação para α -actina diminui após o primeiro dia de arterialização e praticamente desaparece após o terceiro dia. Após 7 e 14 dias de cirurgia as SMC começam a aparecer de forma ainda desorganizada (Figuras 15-17), sendo que após 28 dias pode-se verificar aumento ainda maior de SMC e de maneira um pouco mais organizada (Figuras 17F). A figura 15 representa a quantificação da área positiva de marcação para α -actina de SMC em relação à área total do vaso e, corrobora com a avaliação qualitativa. Noventa dias após a cirurgia, a neointima está repleta de SMC fortemente marcadas para α -actina de SMC e bem delimitada pela LEI, há microvasos neoformados no lúmen e a espessura da neointima torna-se fator preponderante na diminuição da luz do vaso. (Figura 14G).

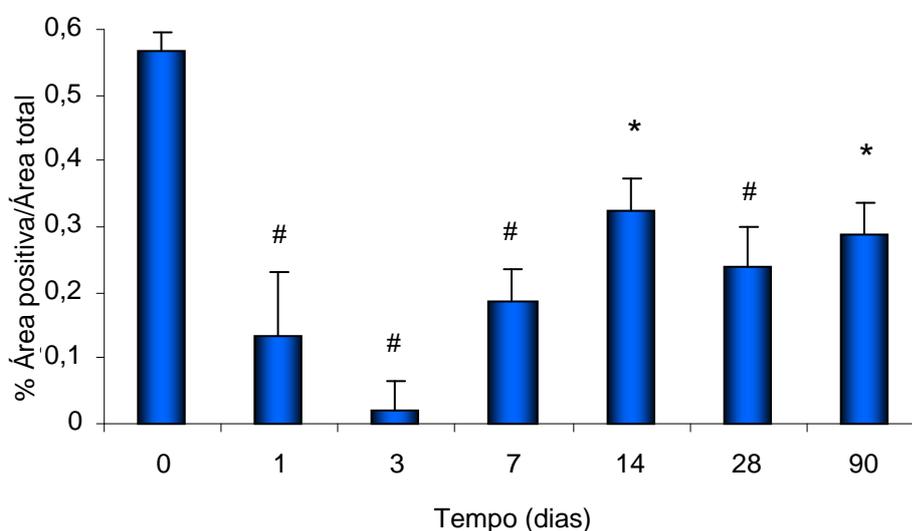


Figura 15. Quantificação da Imunohistoquímica para α -actina de SMC em segmentos venosos arterializados de rato ao longo do tempo, representada pela porcentagem de área de marcação positiva em relação à área total do vaso. # $p < 0,001$ e * $p < 0,05$.

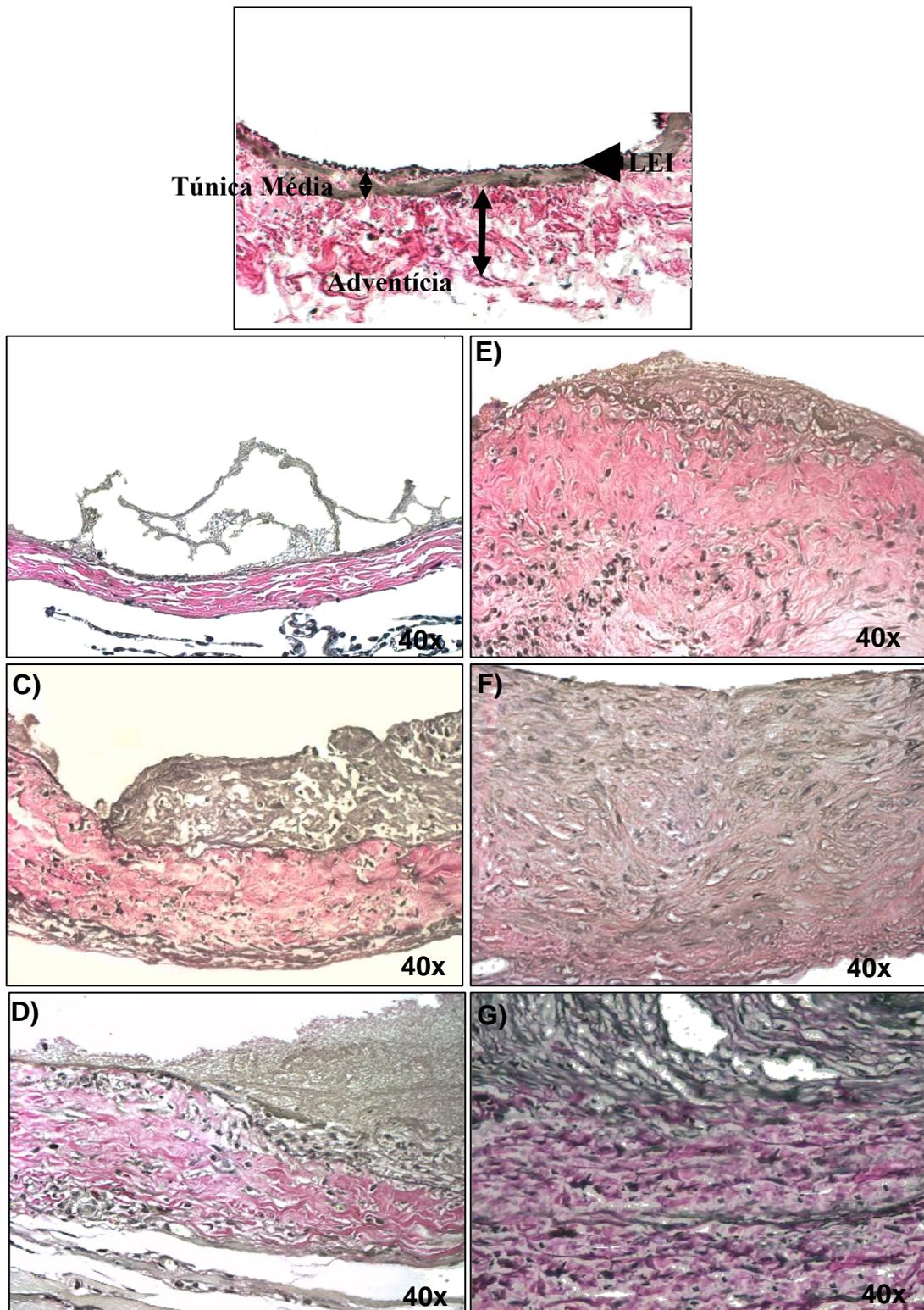


Figura 16. Cortes histológicos de veia jugular de rato corados com Verhoeff e Van Gienson. (A) Veia Jugular Normal, (B) 1 dia, (C) 3 dias, (D) 7 dias, (E) 14 dias, (F) 28 dias e (G) 90 dias após arterialização. Aumento de 40x.

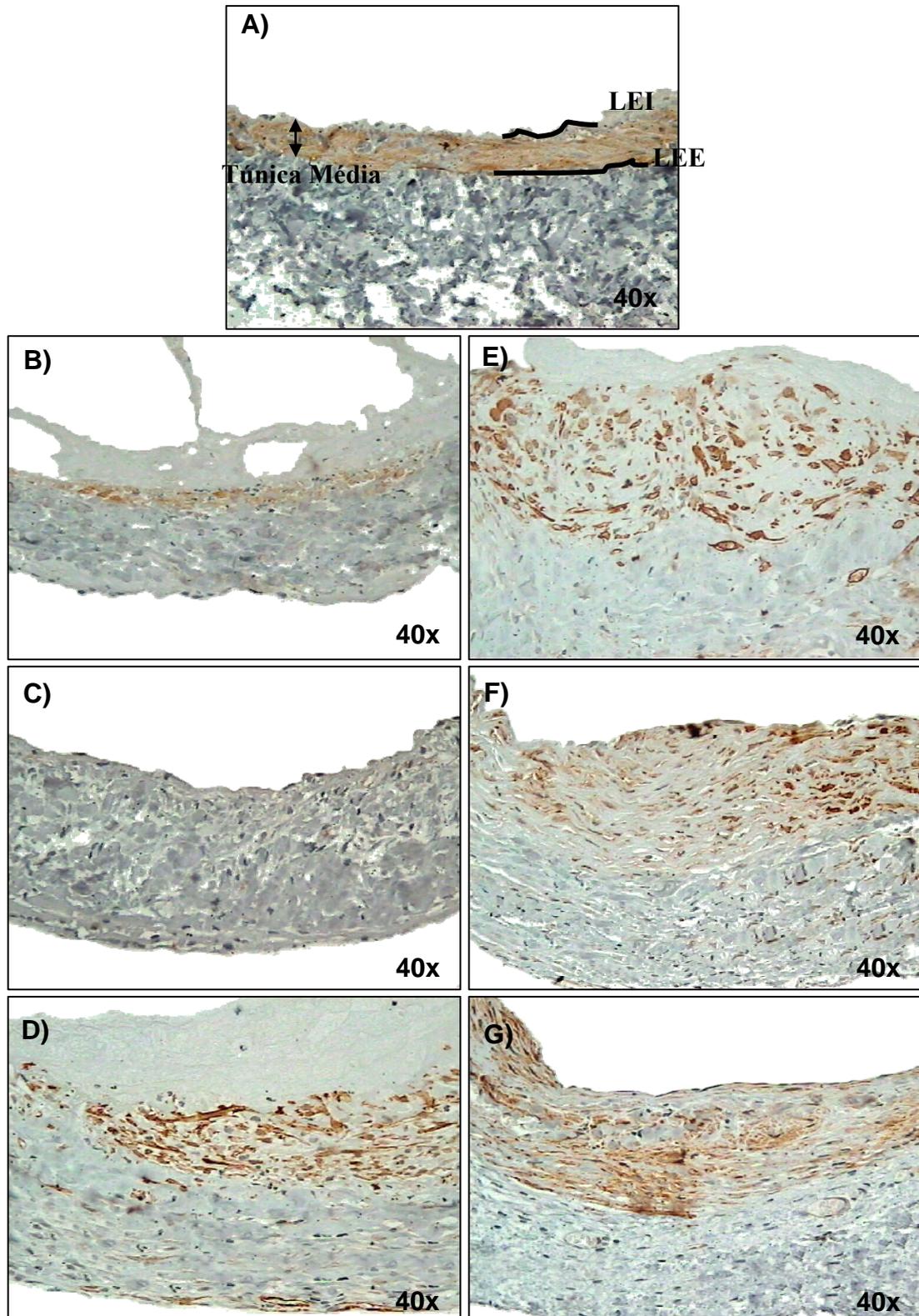


Figura 17. Fotos representativas de imunohistoquímica para α -actina de SMC corado em marrom. **A)** Veia Jugular Normal, **B)** 1 dia, **C)** 3 dias, **D)** 7 dias, **E)** 14 dias, **F)** 28 dias e **G)** 90 dias após arterialização. Aumento de 40x.

5.3.2. Análise da Apoptose, Proliferação e Densidade Celular:

As análises de apoptose e proliferação celular foram realizadas através da reação de TUNEL e imuno-histoquímica para PCNA, respectivamente. Foi observado a presença de um grande número de células apoptóticas no primeiro dia de arterialização que regride gradativamente nos tempos subseqüentes (Figuras 18A e 19). Já o pico de proliferação celular é observado nos dias 7 e 14 pós-cirurgia e tende a diminuir nos dias 28 e 90 (Figuras 18B e 20). Neste estágio mais tardio não se observa presença de células apoptóticas, sendo predominantemente um perfil proliferativo. Estes dados são condizentes com a análise de densidade celular corada por *hoechst 33258*, que mostra uma diminuição do número de células nos primeiros dias de arterialização (1 e 3 dias) e progressivo aumento nos dias posteriores (Figuras 18C e 21).

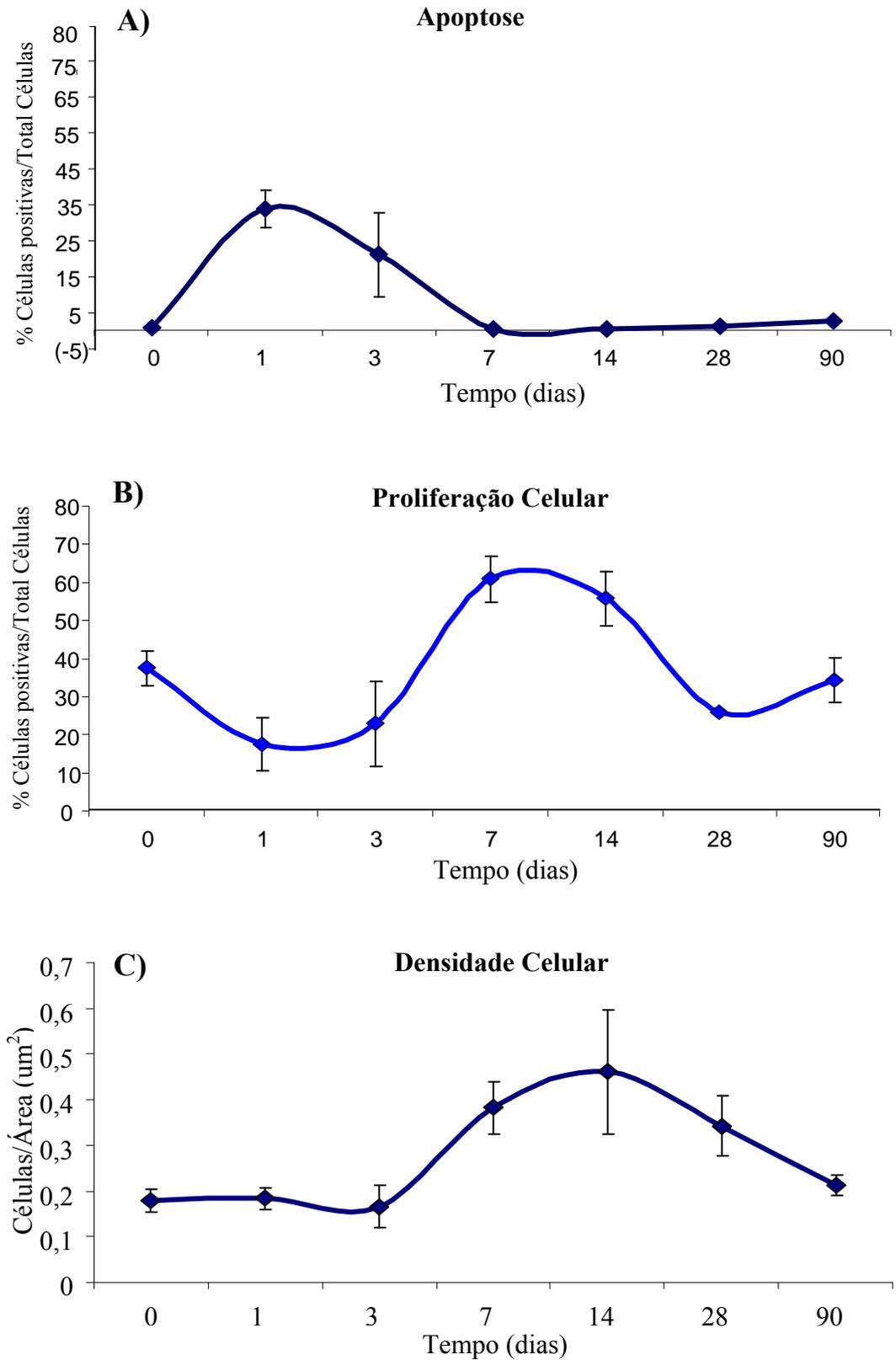


Figura 18. Análise de apoptose, proliferação e densidade celular dos segmentos de veia jugular arterializada detectada por (A) TUNEL, (B) imunohistoquímica para PCNA e (C) *Hoechst* 33258, respectivamente.

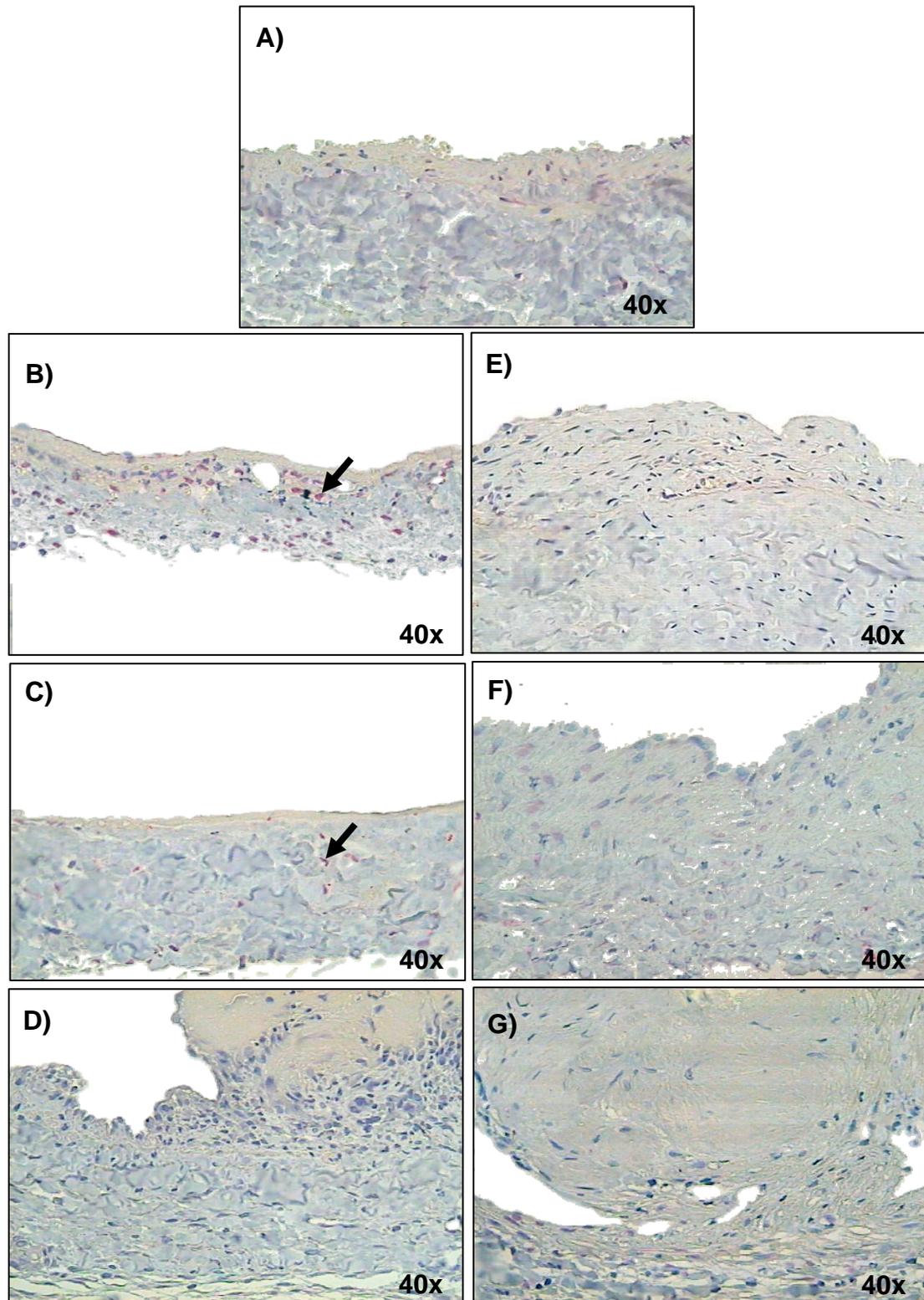


Figura 19. Fotos representativas da reação de TUNEL nos segmentos arterializados de veia jugular de rato para análise de apoptose. (A) Veia Jugular Normal, (B) 1 dia, (C) 3 dias, (D) 7 dias, (E) 14 dias, (F) 28 dias e (G) 90 dias após arterialização. As setas indicam células com marcação positiva em vermelho. Aumento de 40x.

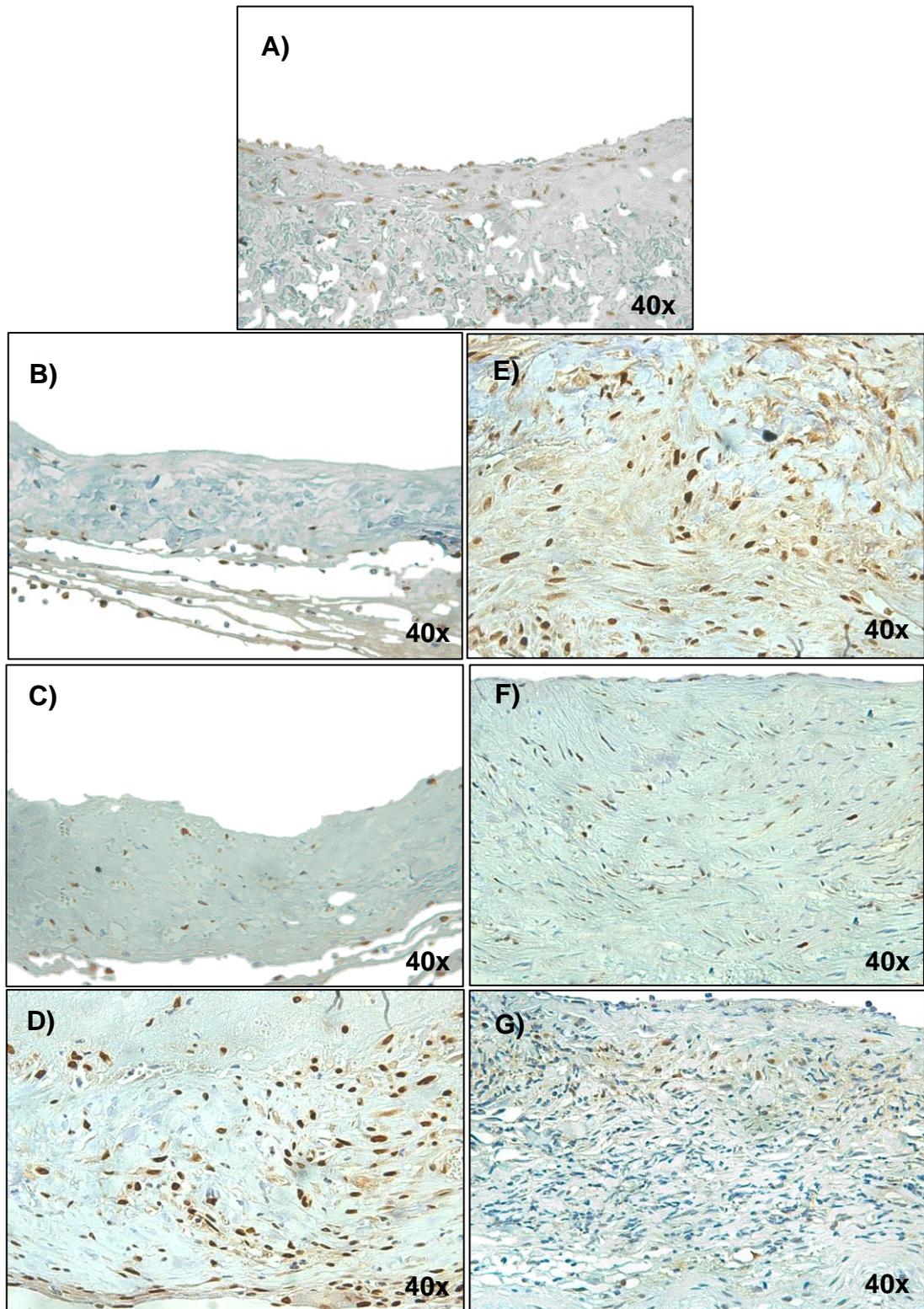


Figura 20. Fotos representativas da imunohistoquímica para PCNA nos segmentos arterializados de veia jugular de rato para análise de proliferação celular, marcados em marrom. (A) Veia Jugular Normal, (B) 1 dia, (C) 3 dias, (D) 7 dias, (E) 14 dias, (F) 28 dias e (G) 90 dias após arterialização. Aumento de 40x.

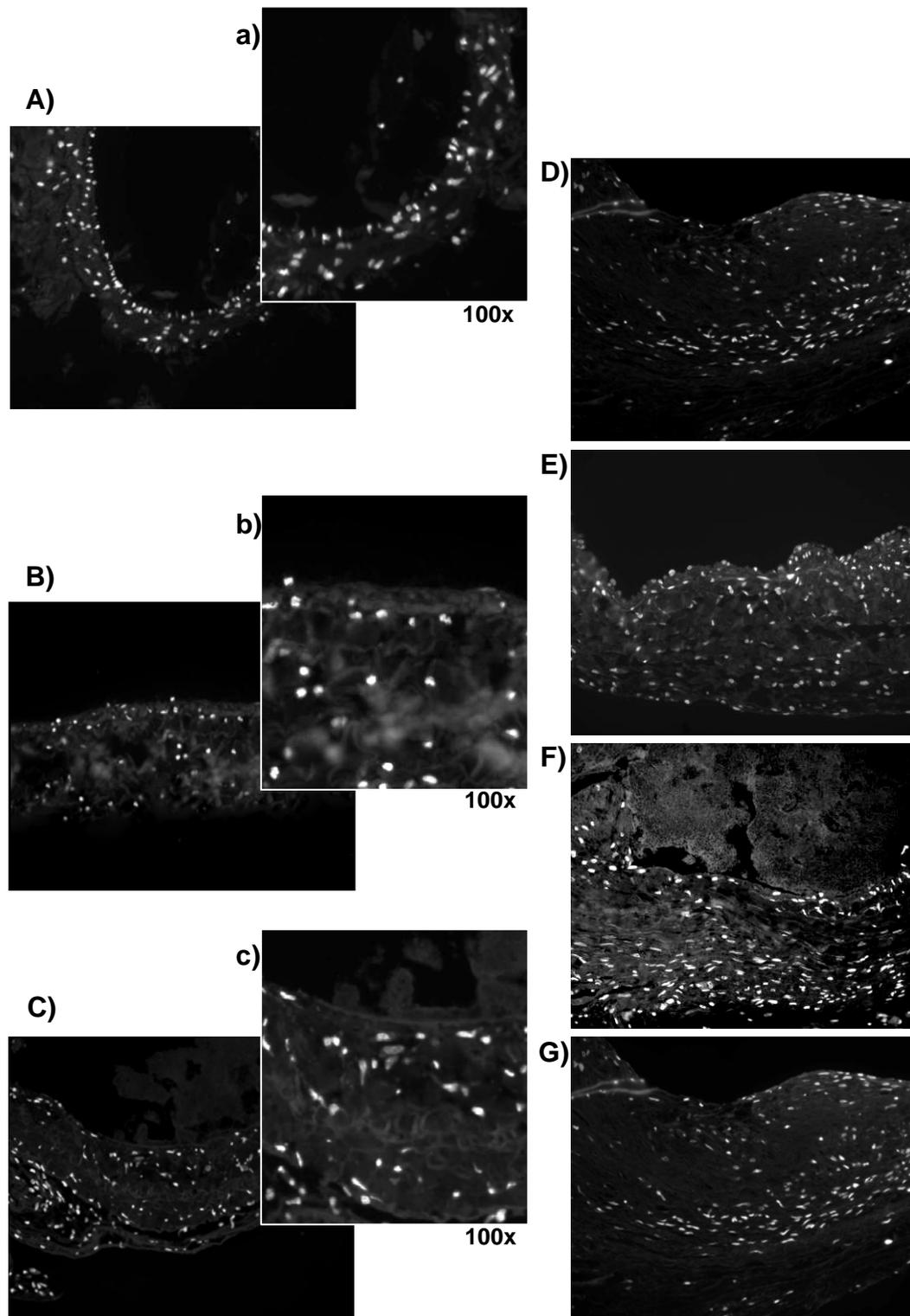


Figura 21. Fotos representativas da coloração por *Hoechst* 33258 nos segmentos arterializados de veia jugular de rato para análise de densidade celular. (A) Veia Jugular Normal, (B) 1 dia, (C) 3 dias, (D) 7 dias, (E) 14 dias, (F) 28 dias e (G) 90 dias após arterialização. Aumento de 40x. Em a), b) e c) aumento de 100x.

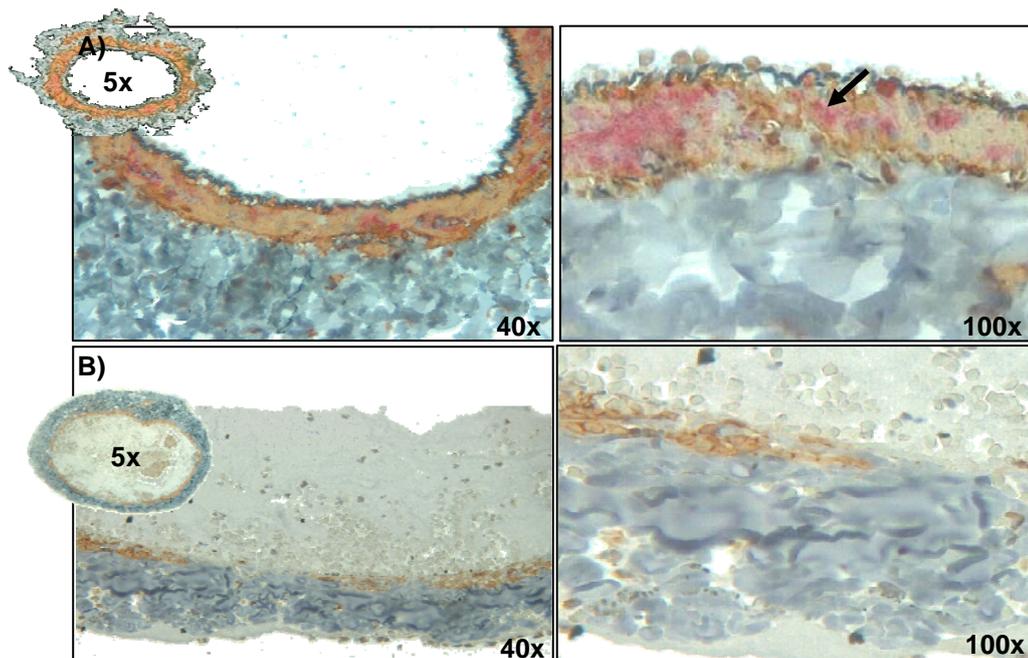
5.4. Análise do Padrão de Expressão de IL-1 β no Processo de Arterialização da Veia Jugular de Rato:

A expressão da IL-1 β aumenta em torno de 12 vezes na veia jugular arterializada por 1 dia quando comparada com a veia jugular normal (Tabela 4). Após 3 dias, o nível de expressão diminui, porém, ainda é o dobro de expressão encontrada no controle. Aos 14 dias em diante, os valores de expressão da IL-1 β mantêm-se variando entre valores de 3-6 vezes o valor da veia jugular normal.

Tabela 4. Expressão Gênica de IL-1 β no Processo de Arterialização da Veia Jugular de Rato

Amostras	Expressão Gênica (Indução n° de vezes)	
Veia Jugular Normal (n=5)	1,0	(0,6 – 1,7)
Enxerto 1 dia (n=6)	12,7	(4,5 – 35,6)
Enxerto 3 dias (n=11)	2,3	(1,3 – 4,0)
Enxerto 7 dias (n=8)	2,9	(1,0 – 8,0)
Enxerto 14 dias (n=5)	5,9	(2,4 – 14,8)
Enxerto 28 dias (n=4)	5,0	(2,9 – 8,6)
Enxerto 90 dias (n=3)	3,1	(0,9 – 10,6)
Carótida (n=5)		N/D

A análise temporal por imuno-histoquímica da IL-1 β mostrou um padrão bastante interessante da produção da proteína. Na veia jugular normal, a IL-1 β é produzida em toda a circunferência do vaso, porém de forma não uniforme. Observam-se núcleos de alta produção de IL-1 β e outros com produção em menor intensidade (Figura 22). Com 1 dia de arterialização, a produção da IL-1 β passa a ser localizada, somente em alguns pontos do vaso, sendo que é observado, regiões com ausência total de IL-1 β . No dia 3, a IL-1 β parece diminuir em relação ao dia 1 apresentando-se com baixa distribuição ao longo do vaso. A partir do dia 7 e nos tempos posteriores, a produção de IL-1 β parece aumentar, porém se levarmos em conta a densidade celular e a espessura do vaso, esta produção deve ser menor que a observada no primeiro dia de arterialização, conforme mostrado pela quantificação da expressão gênica (Tabela 3). A IL-1 β continua com distribuição bastante regionalizada no vaso e começa-se a observar a produção da proteína em camada adventícia, além da média e neoíntima (Figura 22E).



(Figura 22. Continua na próxima página)

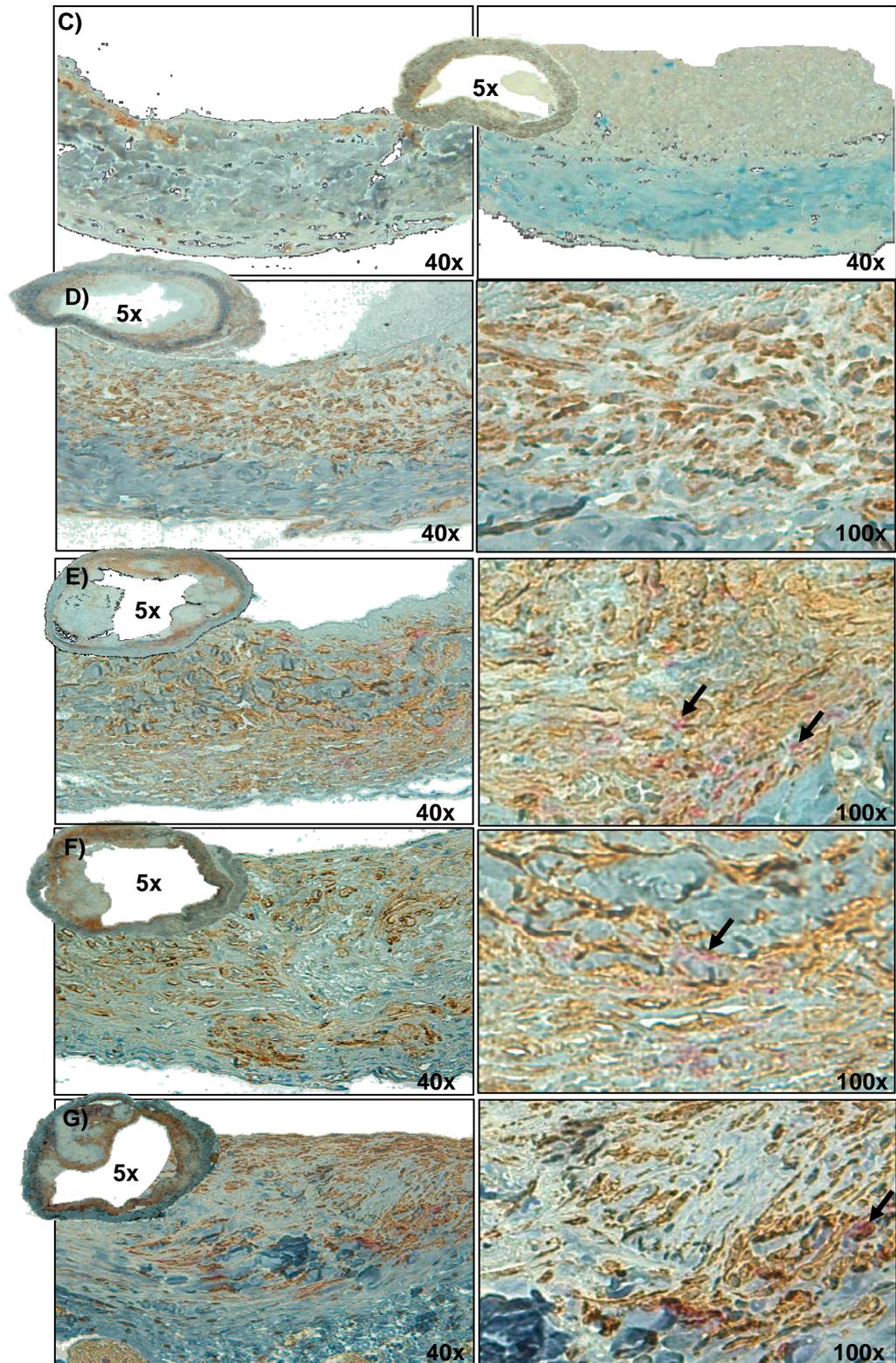


Figura 22. Fotos representativas de imunohistoquímica para IL1 β corada em vermelho e para α -actina de SMC corada em marrom, em veia jugular de rato arterializada. (A) Veia Jugular Normal, (B) 1 dia, (C) 3 dias, (D) 7 dias, (E) 14 dias, (F) 28 dias e (G) 90 dias após arterialização.

DISCUSSÃO

6. Discussão

No presente trabalho foi demonstrado que a IL-1 β é regulada em enxerto humano de veia safena *in vivo* e *ex vivo*. Esta resposta foi também observada em modelo animal (conexão artério-venosa em rato) que permitiu uma caracterização temporal de regulação da IL-1 β no processo de arterialização de um segmento venoso.

Para a realização deste estudo, foi de fundamental importância o desenvolvimento de um modelo experimental. Foi desenvolvido o modelo de conexão artério-venosa em rato, onde a veia jugular é conectada à artéria carótida por até 90 dias. Este modelo reproduz as mudanças encontradas em modelos de enxerto venoso já descritos na literatura, evidenciado por hiperplasia intimal (HI) progressiva, migração e proliferação de SMC e deposição de matriz extracelular (Faries e cols, 1996; Stark e cols., 1997; Sterpetti e cols., 1997; Zou e cols., 1998; Zhang e cols., rante 1999; Westerland e cols., 2001; Jiang e cols., 2004; Diao e cols., 2005). Nos períodos estudados o coração do animal parece não estar comprometido funcionalmente, ainda que este modelo de conexão artério-venosa possa ser utilizado como indutor crônico de insuficiência cardíaca congestiva.

No sistema vascular as células são expostas não somente a fatores químicos e biológicos, mas também a fatores mecânicos, incluindo “*shear stress*” na superfície endotelial, distensão e deformação radial da parede do vaso sanguíneo (Moore e cols., 2001). Estes fatores mecânicos influenciam diretamente no remodelamento do enxerto venoso, que passa de um regime de baixo fluxo e pressão, para um regime arterial (Liu e cols., 2000). Em resposta a este estresse mecânico, observa-se um pico

de apoptose após o primeiro dia de arterialização da veia jugular com uma significativa degeneração e morte das SMC na túnica média (Figuras 16, 17A e 18). Foi possível observar também o aumento de quantidade de fibrina e debris celulares no lúmen do segmento arterializado (Figura 12). Estas observações estão de acordo com os diversos modelos de arterialização já descritos em humano, porco, rato e camundongo (Kockx e cols., 1996; Mayr e cols., 2000; Moore e cols., 2001; O'Brien e cols., 1998). (Hoch e cols., 1999; Tomas e cols., 2003). Em resposta a esta perda celular e a necessidade de se adequar à nova condição hemodinâmica, o evento subsequente observado é o repovoamento da camada média e formação de camada neoíntima (Figura 16). A importância do fator hemodinâmica no remodelamento vascular fica evidente no estudo que mostra a regressão quase que completa da HI, quando o enxerto venoso de 4 semanas em leito arterial, é reimplantado em leito venoso (Sterpetti e cols., 1996; Sterpetti e cols., 1998).

A formação de trombo atraído pelos danos endoteliais é mais um ponto que contribui para o desenvolvimento da neoíntima (Torsney e cols., 2004). Tal exposição das proteínas subendoteliais da matriz ao sangue podem ser um risco para a formação do trombo que ocorre quando as plaquetas aderem ao colágeno exposto após o dano endotelial (Konishi e cols., 2002). Neste processo, as plaquetas dentro do microtrombo podem liberar fatores, tais como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), que promovem o recrutamento de células de músculo liso, sendo que, a fibrina age como uma matriz para a migração celular, para os miofibroblastos e SMC durante processo de reparação tecidual (Nomura e cols., 1999; Naito e cols., 2000). Assim, a denudação endotelial, seguida pela formação maciça de microtrombos em enxertos venosos pode explicar porque 10% dos enxertos de veia

safena em pacientes com IAM ocluem nas primeiras semanas por trombose (Mehta e cols., 1997; Motwani & Topol, 1998; Sasaki e cols., 2000).

No laboratório foi demonstrado que a IL-1 β está aumentada quando a veia safena é cultivada em regime arterial por 1 dia (Figura 3). Interessantemente, análise em enxertos de veia safena obtidos de material de necropsia mostrou aumento da IL-1 β nos primeiros dias pós revascularização miocárdica por ponte de safena (Figura 7). Ainda que o aumento não tenha sido significativo neste ensaio semi-quantitativo, este dado é bastante informativo e sugestivo de que há regulação da IL-1 β em enxerto de veia safena *in vivo*. Deve-se considerar que nestes ensaios com amostras humanas, existem diversos fatores que podem estar interferindo na análise, tais como: idade, histórico clínico, co-morbidades e uso de diversos agentes terapêuticos, hábitos alimentares, sedentarismo, fumo, entre outros. Pelo pequeno número de amostra, não foi possível nenhum tipo de seleção prévia dos indivíduos para inclusão no estudo.

No modelo de arterialização de veia jugular de rato foi observado, utilizando-se uma técnica sensível e quantitativa, aumento da expressão de IL-1 β de 12 vezes quando comparada com a veia jugular normal. Este aumento cai gradativamente ao longo tempo, e mantém-se em níveis pouco mais elevados que a veia jugular normal (Tabela 3). Análise por imunohistoquímica mostrou um padrão de produção da IL-1 β bastante interessante. Nota-se que na condição basal a IL-1 β encontra-se distribuída em forma de núcleos de produção da proteína em todo o vaso (Figura 21). Quando a veia é arterializada, a produção da IL-1 β passa ser localizada em regiões específicas do vaso, sendo também observado regiões com ausência completa da proteína. Frequentemente a proteína é encontrada em locais de formação da neoíntima e

também em camada adventícia do vaso, o que sugere implicações relevantes no processo de arterialização. Na literatura este aumento de produção de IL-1 β também tem sido demonstrado, porém não se tem evidências diretas do seu papel funcional no enxerto venoso. Um dado interessante que obtivemos foi a indução da produção de VEGF pela IL-1 β em células musculares lisas de veia safena humana (Figura 10). Pode-se sugerir que durante o processo de arterialização, a IL-1 β aumentada leva ao aumento da produção de VEGF, e estes dois fatores quimiotáticos podem estar contribuindo para a formação da neointima e repovoamento/espessamento do enxerto.

Sabe-se que no processo de arterialização ocorre um aumento da presença de células musculares lisas tanto na camada média como na neointima. Não se pode dizer ao certo se isto se dá por aumento da proliferação das células musculares lisas ou por migração de células indiferenciadas para o local. Trabalhos recentes vêm demonstrando que células indiferenciadas de tecidos adjacentes são importantes fontes de células musculares lisas responsáveis pelo remodelamento do enxerto (Zhang e cols., 1999; Matsumura e cols., 2003; Tomas e cols., 2003; Wu e cols., 2004). Dentro deste contexto, pode-se imaginar que a IL-1 β aumentada nos primeiros dias de arterialização pode estar contribuindo para atrair as células mesenquimais residentes de maneira direta ou mesmo através da produção de VEGF. Estes são mecanismos que necessitam ser investigados para que o real papel da IL-1 β no processo de arterialização de enxerto venoso possa ser elucidado.

Recentemente, entramos em contato com a indústria farmacêutica Amgen que nos forneceu o medicamento Anakira (Kineret®). Trata-se de uma molécula recombinante, não glicosilada, do antagonista de receptor de IL-1 β humano (IL-

IRA), utilizado no tratamento de artrite reumatóide. Esta droga, por bloquear a ação da IL-1 β , é bastante interessante para testarmos o efeito da IL-1 β no processo de arterialização. Desta forma, ratos foram tratados com doses diárias de IL1RA 25 mg/Kg (SC) por 15 dias, sendo 1 dia pré-cirurgia e 14 dias pós-arterialização. Como controle foi utilizado ratos tratados com solução placebo. Dados preliminares mostram que os animais tratados com IL-1RA não apresentam diferença de área de íntima e media + adventícia, e nem mesmo de proliferação celular na veia jugular arterializada por 14 dias (Anexo III). A princípio, este seria um indicativo de que a IL-1 β , apesar regulada no processo de arterialização, não implicação no processo de remodelamento do enxerto. Porém alguns pontos devem ser considerados neste experimento: 1) o tratamento foi realizado em doses diárias únicas, 2) o tratamento foi sistêmico, e 3) não existe um controle de efetividade do tratamento dos animais. Para abordar estas questões, alternativas de tratamento estão sendo contempladas para a realização de um novo experimento. A primeira delas seria a utilização de uma bomba osmótica de liberação contínua de droga, implantados subcutaneamente, que liberariam o IL-1RA em pequenas doses durante todo o dia. Isto poderia garantir a manutenção da dose desejada durante todo o tempo de tratamento do animal. Para isto, entretanto, a empresa terá que disponibilizar o peptídeo em formulação mais concentrada e não sabemos se será possível. A segunda alternativa seria a utilização metodologias disponíveis no laboratório que permitem a intervenção desejada localmente no segmento arterializado.

O laboratório dispõe de metodologias de interferências que permitem intervenções gênicas e protéicas em sistemas biológicos. Pode-se citar a utilização de vetores virais para aumentar a expressão de genes de interesse, proteínas de fusão

para aumentar o conteúdo protéico, e ainda, a tecnologia de interferência por RNA (RNAi) para diminuir a expressão do gene alvo. Assim, pode-se contemplar a utilização de vetores virais para aumentar a expressão do IL-1RA, ou ainda, a produção de RNAi contra a IL-1 β para bloquear o aumento observado inicialmente no enxerto.

CONCLUSÃO

7. Conclusão

Em conjunto, pode-se concluir que:

- A IL-1 β está aumentada em veia safena humana arterializada *in vivo* e *ex vivo*,
- O modelo de conexão artério-venosa reproduz as alterações morfológicas observadas no processo de arterialização de enxertos venosos, e pode ser utilizado para validar os genes candidatos identificados por metodologias exploratórias aplicados no sistema de cultivo de veia safena humana.
- A IL-1 β , cuja expressão está aumentada na veia safena, está aumentada na veia jugular de rato arterializada.

==== **IMPLICAÇÕES CLÍNICAS**

8. Implicações Clínicas

Neste trabalho demonstramos aumento agudo da IL-1 β em veia safena humana arterializada *in vivo* e *ex vivo*, e ainda caracterizamos o padrão de regulação da IL-1 β no modelo animal. A caracterização funcional desta proteína no enxerto através de intervenções na produção, liberação ou atividade da IL-1 β poderá fornecer subsídios para teste de estratégias considerando esta molécula como potencial alvo terapêutico da veia safena para aumentar a sua durabilidade como conduto ao fluxo sanguíneo cardíaco.

5. Anexo I

Modelos de Arterialização de Segmento Venoso em Ratos:

Para o estabelecimento do modelo animal de arterialização foram testados alguns modelos já descritos anteriormente na literatura. A seguir serão discutidas as dificuldades encontradas em cada um deles e as alternativas desenvolvidas até o estabelecimento do modelo de conexão artério-venosa que foi utilizado neste estudo (Item 4.4.).

Métodos

Foram usados ratos Wistar machos de 12 a 14 semanas de idade, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os ratos foram mantidos, por todo o período com livre acesso a água e comida, temperatura controlada entre 22 e 24°C, com ciclo claro-escuro de 12 horas e, em número de no máximo 5 animais por gaiola. O protocolo de pesquisa nº418/03, abaixo, foi aprovado pela CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da FMUSP (Anexo IV).

- Enxerto da Veia Jugular Externa em Aorta Abdominal:

Ratos Wistar pesando 250g a 300g foram anestesiados por injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (40mg/Kg). A veia jugular externa direita foi isolada e removida com aproximadamente 1,5cm, sendo mantida em solução

fisiológica 0,9% e heparina (100UI/mL). A aorta abdominal foi dissecada e clampeada na região abaixo das artérias renais e acima da bifurcação das artérias ilíacas comuns para interposição da veia jugular.

- Comunicação Artério-Venosa entre Aorta Abdominal e Veia Cava Inferior:

Ratos pesando 300g a 400g foram anestesiados por injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (40mg/Kg). A veia cava inferior foi isolada juntamente com a aorta abdominal na região abaixo das artérias renais. O fluxo de ambos os vasos foi interrompido e duas junções foram abertas na junção entre veia cava e aorta pela introdução de um cateter (18G) na artéria aorta. A veia cava inferior teve seu fluxo completamente interrompido por duas ligaduras, uma abaixo da artéria renal e outra acima da bifurcação das veias ilíacas. Na aorta abdominal foi feita uma ligadura na região média entre as duas junções para forçar a passagem de fluxo arterial pela veia cava (Figura 23). Após a cirurgia, o fluxo arterial foi liberado e os animais foram acompanhados por duas semanas.

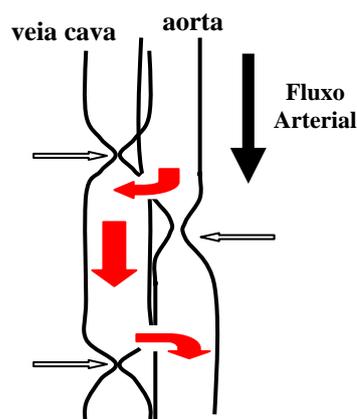


Figura 23. Modelo de fistula entre a aorta abdominal e a veia cava inferior de rato. Foram realizadas duas comunicações entre a aorta e a veia cava e ligaduras nos locais indicados pelas setas brancas. As setas vermelhas indicam o caminho percorrido pelo sangue proveniente da aorta, passando pela veia cava e retornando novamente pela aorta.

- Interposição de Veia Jugular Externa em Artéria Carótida:

Ratos pesando 250g a 300g foram heparinizados com 70UI/Kg via intraperitoneal, para impedir a oclusão dos vasos clampeados por trombose. Após trinta minutos foram anestesiados com ketalar (50mg/Kg) e rompum (10mg/Kg). A veia jugular externa direita foi isolada e removida com aproximadamente 1 cm, sendo mantida em solução fisiológica 0,9% e heparina (100UI/mL). A artéria carótida comum, após dissecada, foi clampeada e cortada. A veia jugular foi enxertada através da técnica de anastomose término-terminal, utilizando o fio de sutura 10.0 (Figura 24). Após o enxerto cirúrgico, o fluxo sanguíneo foi restabelecido, uma dose profilática de penicilina foi administrada, e os animais acompanhados por 1, 3, 7, 14 e 30 dias.

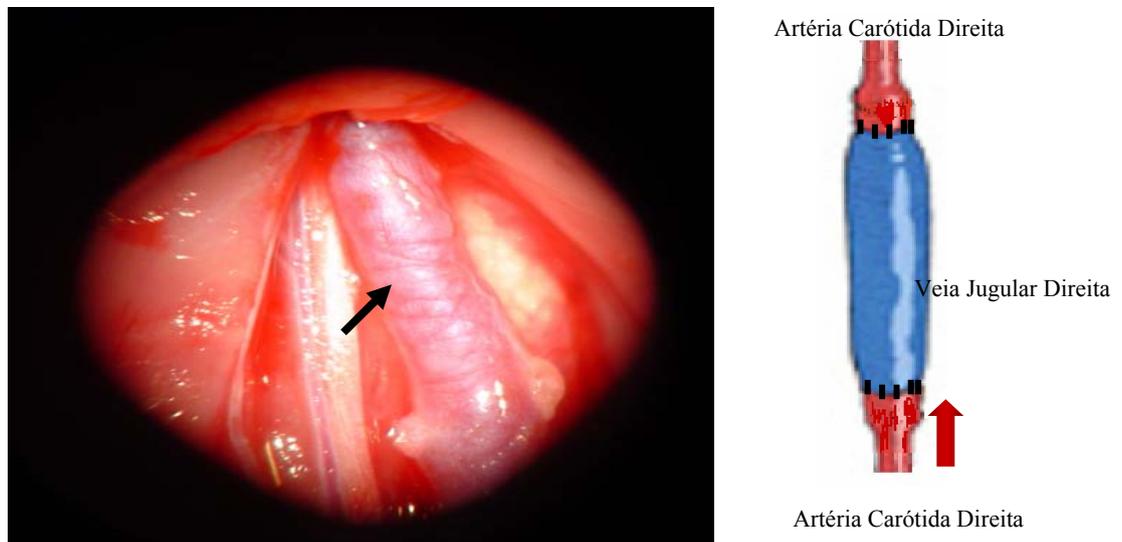


Figura 24. Enxerto de veia jugular externa direita em artéria carótida comum direita de rato, alguns minutos após anastomose. A seta em preto indica a veia jugular externa de rato enxertada. A seta em vermelho indica a direção do fluxo. Aumento de 40x por Lupa D. F. Vasconcellos M900.

Resultados

Inicialmente, o modelo proposto para ser desenvolvido foi o descrito por Liu e cols. (2000), onde a veia jugular é interposta na aorta abdominal. Ainda que este modelo já esteja descrito na literatura, ele mostrou-se bastante complicado cirurgicamente, principalmente pela desproporção do calibre dos vasos. Desta maneira passamos a testar o modelo de interligação da aorta abdominal e veia cava, por meio de junções intervasos onde o fluxo arterial é forçado a passar pela veia cava (Figura 23).

Antes da implementação deste modelo, foi testada a viabilidade da interrupção do fluxo da veia cava abdominal e, os animais testados sobreviveram sem qualquer alteração aparente. No entanto, este modelo não se mostrou adequado, pois um grande número de animais (67% = 12/18) apresentou isquemia nos membros inferiores e morreram nas primeiras 48 horas após a cirurgia, sugerindo o fechamento das junções. Nos animais que sobreviveram por duas semanas (33% = 6/18) não foi possível realizar a morfometria devido à grande formação de rede vascular colateral, o qual geraria um viés nas análises.

O terceiro modelo testado foi à interposição de veia jugular em artéria carótida. Neste modelo foi observada a presença de trombose em grande quantidade dos enxertos sendo que em sua maioria o fluxo estava completamente interrompido. Isto obrigou o uso de heparina, o que levou à morte de grande número dos animais por hemorragia. Após diversos ajustes ficou estabelecida a dose de heparina de 70UI/kg, trinta minutos antes da anestesia. Para caracterizar o modelo foram realizadas 135 cirurgias, no entanto, pela complexidade da sutura, tempo de isquemia

(\pm 45 minutos) e tamanho do fragmento de veia jugular enxertada (\pm 8mm), obtivemos 89 perdas de animais, sendo durante ou logo após a cirurgia (74) por hemorragia ou excesso de anestésico e os demais por trombose (15). Os enxertos foram caracterizados morfológicamente e as análises realizadas nos enxertos de 1 (n=3), 3 (n=4), 7 (n=6), 14 (n=26) e 30 (n=7) dias após a cirurgia. Pode-se observar que a veia enxertada na artéria carótida sofre grandes alterações morfológicas com progressivo espessamento da parede vascular da veia enxertada, porém, de difícil delimitação das camadas vasculares (íntima, média e adventícia). Em um grande número de casos foi verificado intensa formação de fibrina associada com infiltrado de células inflamatórias polimorfonucleadas dificultando a análise de formação da neoíntima. Acreditamos que estas alterações estão relacionadas à manipulação cirúrgica uma vez que neste modelo, há a necessidade de sutura nas duas extremidades do enxerto de pequena extensão (\pm 8mm). Isto poderia levar a um viés na análise dos dados, onde as alterações observadas seriam decorrentes da manipulação cirúrgica e não do processo de arterialização do enxerto.

Desta maneira, implementamos o modelo de enxerto venoso em ratos por meio de uma junção artério-venosa da veia jugular externa direita em artéria carótida comum (Sageshima e cols., 1990), conforme descrita nos métodos (Figura 4). Neste modelo, o tempo de isquemia é menor (\pm 20 minutos), com melhor rendimento das cirurgias realizadas (107 mortes em 351 cirurgias), e menor gasto com material de consumo, já que há necessidade de apenas uma anastomose. Além disto, neste modelo foi possível realizar as quantificações morfométricas conforme mostrado no item 4.6.

A Tabela abaixo mostra de forma resumida a taxa de sobrevivência dos animais após cada tipo de intervenção cirúrgica e as características/dificuldades em cada um dos procedimentos.

Tabela 5. Resumo geral dos modelos *in vivo* de arterialização venosa testados, com apresentação do número de animais utilizados para testar cada método e as observações encontradas.

Modelo testado	óbitos	vivos	total	Observação
1. Veia Jugular Externa Direita interposta em Aorta Abdominal	2	0	2	Desproporção do calibre dos vasos
2. Interligação entre Aorta Abdominal e Veia Cava Inferior	12 (67%)	6 (33%)	18	Isquemia de membros inferiores, oclusão das fistulas e formação de rede vascular contra lateral
3. Veia Jugular Externa Direita interposta em Artéria Carótida Comum Direita	89 (66%)	46 (34%)	135	Viés por manipulação cirúrgica e tamanho Pequeno (\pm 8mm) do enxerto
4. Junção Artério-Venosa da Veia Jugular Externa Direita conectada em Artéria Carótida Comum Direita	107 (30%)	244 (70%)	351	Modelo utilizado e validado

6. Anexo II

Análise das Câmaras Cardíacas dos Ratos:

Devido ao fato do modelo de junção artério-venosa ser utilizado como indutor crônico de insuficiência cardíaca congestiva, avaliamos as câmaras cardíacas dos ratos *Wistar* submetidos à cirurgia de conexão da veia jugular em artéria carótida após 3(n=4), 7(n=5), 14(n=4), 28(n=5) e 90(n=5) dias de cirurgia e, comparamos com animal controle (n=5) não submetido à cirurgia.

Métodos

Após o sacrifício dos animais para retirada do segmento venoso arterializado, o coração foi dissecado, e as câmaras cardíacas foram separadas (átrio direito, átrio esquerdo, ventrículo direito e ventrículo esquerdo). Cada segmento foi pesado e normalizado em relação ao peso corpóreo de cada animal. A avaliação constituiu-se da medição do peso corporal total e da medição das câmaras cardíacas.

Resultados

Foi observado aumento no peso dos átrios direito e esquerdo e ventrículo direito, no entanto, o ventrículo esquerdo não apresentou alteração significativa (Figura 25). Os dados encontrados sugerem alterações anatômicas, que podem vir a

comprometer a função cardíaca a longo prazo, mas nos períodos estudados para a arterialização da veia jugular parece não comprometer funcionalmente o coração do animal.

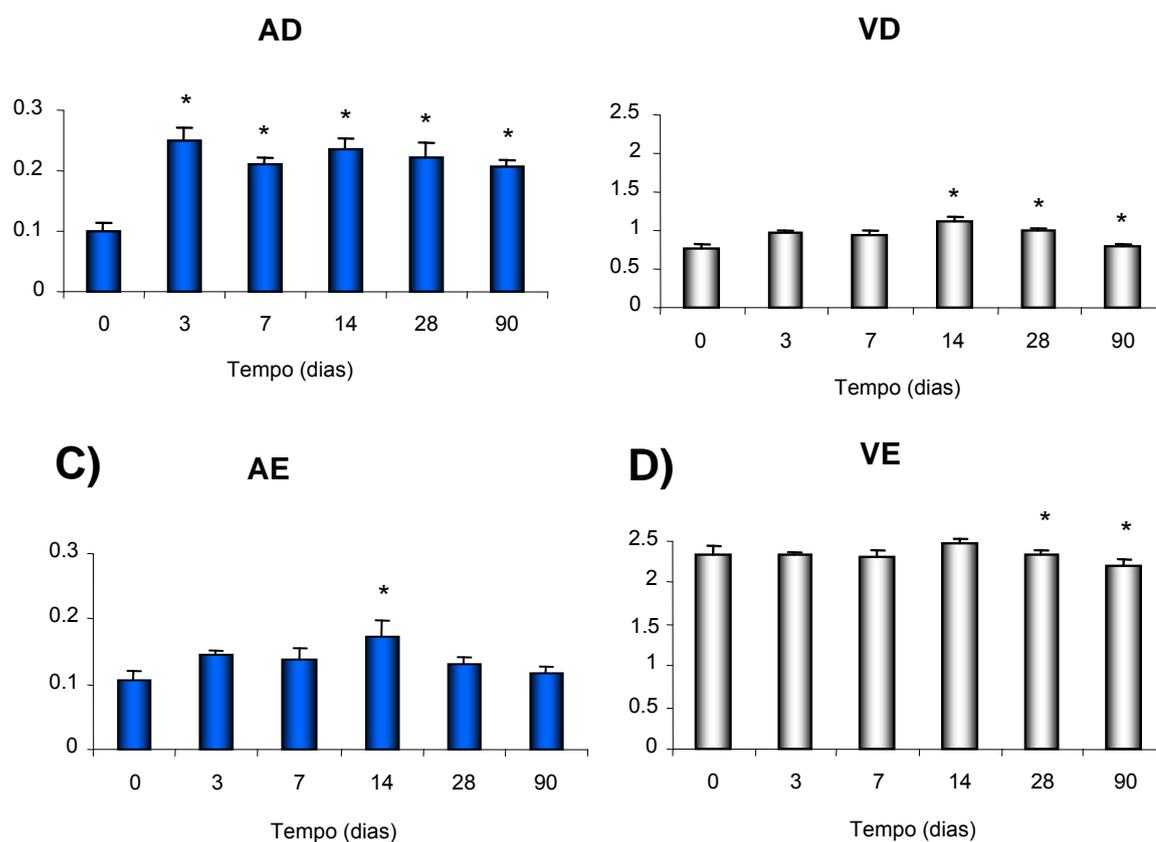


Figura 25. Quantificação das câmaras cardíacas divididas em **A)** átrio direito, **B)** átrio direito, **C)** ventrículo direito e **D)** ventrículo esquerdo em relação ao tempo, normalizados pelo peso corporal de cada animal.

7. Anexo III

Análise da influência do tratamento com IL1RA no processo de arterialização de veia jugular de rato:

Neste trabalho demonstramos de que a IL1 β está aumentada em veia safena humana arterializada *in vivo* e *ex vivo* (Figuras 3 e 7), e ainda o padrão de regulação temporal da proteína durante a arterialização da veia jugular de rato (Figura 21). Para avaliar a contribuição funcional da IL1 β no processo de arterialização, foi realizado o tratamento dos ratos com o antagonista de receptor IL-1 (IL-1RA) e a análise morfológica dos segmentos venosos arterializados.

Métodos

Ratos Wistar de idade entre 12-14 semanas, pesando entre 250g e 350g foram tratados com IL-1RA por 15 dias, sendo 1 dia pré-cirurgia e 14 dias pós- cirurgia de conexão artério-venosa. Foi utilizado o medicamento Anakira (Kineret®) gentilmente cedido pela indústria farmacêutica Amgen. Trata-se de uma molécula recombinante, não glicosilada, do IL-1RA, já bastante utilizado no tratamento de artrite reumatóide.

O tratamento foi realizado através de administrações subcutâneas de 25mg/kg/dia, conforme descrito em protocolos anteriores (Chamberlain, e cols., 2006). Os animais controles foram submetidos a iguais condições, sendo tratados com solução placebo (citrato de sódio 10mM, NaCl 140mM, EDTA 0,5mM, *tween*

80 0,1%). Após 15 dias de tratamento (1 dia pré e 14 dias pós-cirurgia) os animais foram sacrificados com superdosagem de pentobarbital intraperitoneal e perfundidos com soro fisiológico 0,9% acrescido de 14mM de KCl, seguidos de formaldeído tamponado 4%.

Após 24h ou 48h de fixação, os tecidos foram processados e impermeabilizados com parafina, cortados a 3 μ m de espessura a partir de 400 μ m depois da sutura e então, corados e imunomarcados para as colorações de HE, VVG, Miller e α -actina de SMC e PCNA, descritas anteriormente. Os tecidos foram avaliados quanto à área da íntima, área da média mais adventícia, densidade celular e número de células em proliferação, utilizando microscópio de luz e o programa Leica Qwin.

Resultados

Os animais tratados com IL-1RA não apresentam diferença de área de íntima e media + adventícia, e nem mesmo de proliferação celular na veia jugular arterializada por 14 dias (Figuras 26 e 27). A princípio, este seria um indicativo de que a IL-1 β , apesar regulada no processo de arterialização, não possui implicação no processo de remodelamento do enxerto. Porém alguns pontos devem ser considerados neste experimento: 1) o tratamento foi realizado em doses diárias únicas, 2) o tratamento foi sistêmico, e 3) não existe um controle de efetividade do tratamento dos animais. Para abordar estas questões, alternativas de tratamento estão sendo contempladas para a realização de um novo experimento. A primeira delas seria a utilização de uma bomba osmótica de liberação contínua de droga,

implantados subcutaneamente, que liberariam o IL-1RA em pequenas doses durante todo o dia. Isto poderia garantir a manutenção da dose desejada durante todo o tempo de tratamento do animal. A segunda alternativa seria a utilização metodologias disponíveis no laboratório que permitem a intervenção desejada localmente no segmento arterializado.

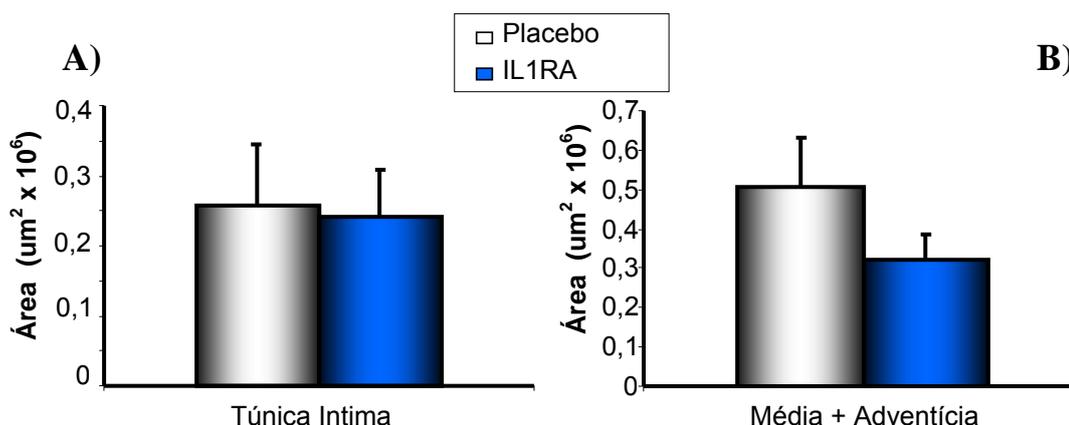


Figura 26. Quantificação das **A)** túnica íntima e **B)** túnica media+adventícia da veia jugular de rato arterializada por 14 dias. As barras em branco representam os ratos tratados com solução placebo e as barras em azul os animais tratados com IL-1RA. Cada barra representa média±erro padrão de 9-15 animais.

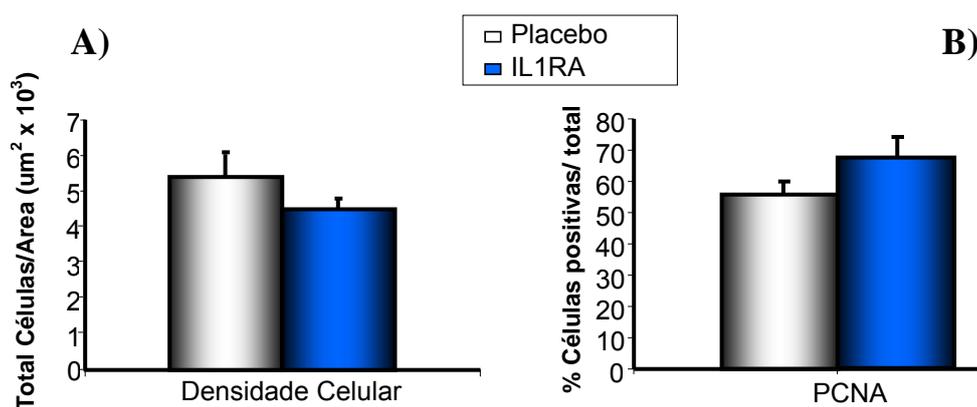


Figura 27. Análise de **A)** densidade e **B)** proliferação celular nos segmentos de veia jugular de rato arterializada por 14 dias. As barras em branco representam os ratos tratados com solução placebo e as barras em azul os animais tratados com IL-1RA. Cada barra representa média±erro padrão de 9-11 animais.

8. Anexo IV



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 3471 – SÃO PAULO - BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 26.06.03, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **418/03**, intitulado: "Genes diferentemente expressos em modelo de arterialização de enxerto venoso no rato. Identificação e caracterização de novos alvos terapêuticos" apresentado pela COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA DO INSTITUTO DO CORAÇÃO.

Pesquisador(a) Responsável: **PROF. DR. JOSÉ EDUARDO KRIEGER**

Pesquisador(a) Executante: **SRA. THAIZ FERRAZ BORIN**

CAPPesq, 26 de Junho de 2003.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

9. Anexo V



DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23.09.04, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **638/04**, intitulado: "Identificação e caracterização de proteínas modificadas em veias safena arterializadas" apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA DO INSTITUTO DO CORAÇÃO**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

Pesquisador(a) Executante: Dra. Luciene Cristina Gastalho Campos

CAPPesq, 23 de Setembro de 2004.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996 inciso IX.2 letra "c")

10. Anexo VI

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

.....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

Identificação e Caracterização de Proteínas Modificadas em Veias Safena Arterializadas.PESQUISADOR: **José Eduardo Krieger**CARGO/FUNÇÃO: **Diretor** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **61539**UNIDADE DO HCFMUSP: **Incor - Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular.**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : **4 anos**

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

- 1. justificativa e os objetivos da pesquisa:** o objetivo deste estudo é compreender porque a “ponte de safena” entope após um certo período. quando a mesma é colocada para substituir uma artéria coronária que estava “entupida” e que por isso provocou um infarto no indivíduo. Este estudo pode ser justificado pelo motivo que muitos dos indivíduos que passam pela cirurgia de revascularização cardíaca, precisam retornar após algum tempo ao hospital para trocar suas “pontes de safena”, pois estas estão “entupidas”.
2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: **você participará deste estudo após ser submetido a cirurgia de revascularização cardíaca.**
3. desconfortos e riscos esperados: **não haverá nenhum risco e desconforto devido a pesquisa, pois não será realizado nada além do que a cirurgia necessite. Apenas os segmentos de veias safenas que não serão utilizados para construir a “ponte de safena” será utilizada para a pesquisa, ou seja, utilizaremos a veia que sobrar e que seria descartada.**
- 4. benefícios que poderão ser obtidos:** este estudo contribuirá para a descoberta de novas terapias para implantação da veia safena no coração, beneficiando o paciente a não ter que passar pelo desconforto de uma nova cirurgia após de algum tempo.
5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

- 1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas:** você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessária antes de participar do estudo
 - 2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência:** a sua participação no estudo é voluntária, mas você tem plena liberdade para não aceitar participar da pesquisa, sem incorrer em nenhuma penalidade. O seu atendimento médico não será prejudicado caso você decida não participar.
 3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade:
 4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
 5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.
-

==== REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. Referências Bibliográficas

Bulkley, B. H. & Hutchins, G. M. Accelerated “Atherosclerosis”: A morphologic study of 97 saphenous vein coronary artery bypass grafts. *Circulation*. 1977; 55:163-69.

Campeau, L., Enjalbert, M., Lespérance, J., Bourassa, M. G., Kwiterovich, P., Wacholder, S., Sniderman, A. The relation of risk factors to the development of atherosclerosis in saphenous vein bypass grafts and the progression of disease in the native circulation. *N. Engl. J. Med.* 1984; 311:1329-32.

Campeau, L., Enjalbert, M., Lespérance, J., Vaislic, C., Grondin, C. M., Bourassa, M. G. Atherosclerosis and late closure of aortocoronary saphenous vein grafts: sequential angiographic studies at 2 weeks, 1 year, 5 to 7 years, and 10 to 12 years after surgery. *Circulation*. 1983; 68(suppl II):II1-7.

Chamberlain, J., Evans, D., King, A., Dewberry, R., Dower, S., Crossman, D., Francis, S. Interleukin-1 β and Signaling of Interleukin-1 β in Vascular Wall and Circulating Cells Modulates the Extent of Neointima Formation in Mice. *Am. J. Pathol.* 2006, 168:1396–1403.

Czomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987;162:156-9.

Diao, Y., Xue, J., Segal, M. S. A novel mouse modelo of autologous venous graft intimal hyperplasia. *J. Surg. Res.* 2005; 126:106-13.

Dulak, J., Józkwicz, A., Dembinska-kiec, A., Guevara, I., Zdzienicka, A., Zmudzinska-Grochot, D., Florek, I., Wójtowicz, A., Szuba, A., Cooke, J. P. Nitric Oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20:659-66.

Faries, P. L., Marin, M. L., Veith, F. J., Ramirez, J. A., Suggs, W. D., Parsons, R. E., Sanchez, L. A., Lyon, R. T. Immunolocalization and temporal distribution of cytokine expression during the development of vein graft intimal hyperplasia in an experimental model. *J. Vas. Surg.* 1996; 24(3):463-71.

Favoloro, R.G. Saphenous vein graft in the surgical treatment of coronary artery disease: operative technique. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1969; 58:178-185.

Fischer JW, Kinsella MG, Clowes MM, Lara S, Clowes AW, Wight TN. Local expression of bovine decorin by cell-mediated gene transfer reduces neointimal formation after balloon injury in rats. *Circ. Res.* 2000;86:676-83.

Garret, H.E., Dennis, E.W., DeBakey, M.E. Aortocoronary bypass with saphenous vein graft: seven-year follow-up. *JAMA.* 1973; 223:792-794.

Golledge, J., Turner, R.J., Harley, S.L., Springall, D.R., Powell, J.T. Circuferencial deformation and shear stress induce differential responses in saphenous vein endothelium exposed to arterial flow. *J. Clin. Invest.* 1997; 99:2719-2726.

Gosling, M., Golledge, J., Turner, R.J., Powell, J.T. Arterial flow conditions downregulate thrombomodulin on saphenous vein endothelium. *Circulation.* 1999; 99:1047-1053.

Grondin, C. M., Campeau, L., Lespérance, J., Enjalbert, M., Bourassa, M. G. Comparison of late changes in internal mammary artery and saphenous vein grafts in two consecutive series of patients 10 years after operation. *Circulation.* 1984; 70 (suppl I):I-208-12.

Hoch, J. R., Stark, V. K., Rooijen, N. V., Kim, J. L., Nutt, M. P., Warner, T. F. Macrophage depletion alters vein graft intimal hyperplasia. *Surgery.* 1999; 126:428-37.

Hoch, J.R., Stark, V.K., Turnipseed, W.D. The temporal relationship between the development of vein graft intimal hyperplasia and growth factor gene expression. *J. Vasc. Surg.* 1995; 22:51-58.

Isoda, K., Sawada, S., Ishigami, N., Matsuki, T., Miyazaki, K., Kusuhara, M., Iwakura, Y., Ohsuzu, F. Lack of Interleukin-1 Receptor Antagonist Modulates

Plaque Composition in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004;24:1068-1073.

Jiang, Z., Wu, L., Miller, B. L., Goldman, D. R., Fernandez, C.M., Abouhamze, Z., Ozaki C. K., Berceci, S. A. A novel vein graft model: adaptation to differential flow environments. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004; 286:H240-H245.

Jung, Y.D., Liu, W., Reinmuth, N., Ahmad, S. A., Fan, F., Gallick, G. E., Ellis, L.M. Vascular endothelial growth factor is upregulated by interleukin-1 β in human vascular smooth muscle cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Angiogenesis.* 2001; 4:155-62.

Junqueira, L. C. & Carneiro, J. Sistema circulatório. In: *Histologia básica.* Guanabara Koogan, 10. ed. 2004;206-11.

Kirii, H., Niwa, T., Yamada, Y., Wada, H., Saito, K., Iwakura, Y., Asano, M., Moriwaki H.M., Seishima, M. Lack of Interleukin-1 β Decreases the Severity of Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23:656-660.

Kockx, M. M., Cambier, B. A., Bortier, H. E., De Meyer, G. R., Declercq, S. C., Van Cauwelaert, P. A., Bultinck, J. Foam cell replication and smooth muscle cell apoptosis in human saphenous vein grafts. *Histopathology.* 1994; 25:365-71.

- Konishi, H., Katoh, Y., Takaya, N., Kashiwakura, Y., Itoh, S., Ra, C., Daida, H. Platelets activated by collagen through immunoreceptor tyrosine-based activation motif play pivotal role in initiation and generation of neointimal hyperplasia after vascular injury. *Circulation*. 2002; 105(8):912-6.
- Leville, C. D., Dasson, M. S., Seabrook, G. R., Jean-Claude, J. M., Towne, J. B., Cambria, R. A. All-trans-retinoic acid decreases vein graft intimal hyperplasia and matrix metalloproteinase activity *in vivo*. *J. Surg. Res.* 2000; 90:183-190.
- Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420:868-74.
- Liu, S. Q. & Fung, Y. C. Changes in the organization of the smooth muscle cells in rat vein grafts. *Ann. Biomed. Eng.* 1998; 26:86-95.
- Liu, S. Q., Moore, M. M., Yap, C. Prevention of mechanical stretch-induced endothelial and smooth muscle cell injury in experimental vein grafts. *J. Biomech. Engineer.* 2000; 122:31-8.
- Liu, S. Q., Moore, M. M., Yap, C. Prevention of mechanical stretch-induced endothelial and smooth muscle cell injury in experimental vein graft. *J. Biomech. Eng.* 2000; 122:31-38.
- Lotufo, P. A. Doenças cardiovasculares no Brasil. In: *Tratado de Cardiologia – SOCESP*. Ed. Manole Ltda. São Paulo. 2005. c.1. 8-41.

Lytle, B. W., Loop, F. D., Cosgrove, D. M., Ratliff, N. B., Easley, K., Taylor, P. C. Long-term (5 to 12 years) serial studies of internal mammary artery and saphenous vein coronary bypass grafts. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1985; 89:248-58.

Lytle, B. W. The clinical impact of atherosclerosis saphenous vein to coronary artery bypass grafts. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1994; 6:81-86.

Mann, M. J., Whittemore, A. D., Donaldson, M. C., Belkin, M., Conte, M. S., Polak, J. F., Orav, E. J., Ehsan, A., Dell'Acqua, G., Dzau, V. J. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet.* 1999; 354:1493-1498.

Matsumura, G., Miyagawa-Tomita, S., Shin'oka, T., Ikada, Y., Kurosawa, H. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts in vivo. *Circulation.* 2003; 108:1729-34.

Mayr, M., Li, C., Zou, Y., Huemer, U., Hu, Y., Xu, Q. Biomechanical stress-induced apoptosis in vein grafts involves p38 mitogen-activated protein kinases. *FASEB J.* 2000; 15:261-270.

Mayr, U., Zou, Y., Zhang, Z., Dietrich, H., Hu, Y., Xu, Q. Accelerated arteriosclerosis of vein grafts in inducible NO synthase -/- mice is related to decreased endothelial progenitor cell repair. *Circ. Res.* 2006; 98:412-20.

Mehta, D., Izzat, M. B., Bryan, A. J., Angelini, G. D. Towards the prevention of vein graft failure. *Int. J. Cardiol.* 1997; 62:S55-63.

Mitra, A. K., Gangahar, D. M., Agrawal, D. K. Cellular, molecular and immunological mechanisms in the pathophysiology of vein graft intimal hyperplasia. *Immunol. Cell. Biol.* 2006; 84:115-24.

Moore, M. M., Goldman, J., Patel, A. R., Chien, S., Liu, S. Q. Role of tensile stress and strain in the induction of cell death in experimental vein grafts. *J. Biomech.* 2001; 34:289-297.

Motwani, J. G. & Topol, E. J. Aortocoronary saphenous vein graft disease: Pathogenesis, predisposition and prevention. *Circulation.* 1998; 97:916-31.

Naito, M., Stirk, C. M., Smith, E. B., Thompson, W. D. Smooth Muscle Cell Outgrowth Stimulated by Fibrin Degradation Products: The Potential Role of Fibrin Fragment E in Restenosis and Atherogenesis. *Thromb. Res.* 2000; 98:165-174.

Nakaoka, T., Gonda, K., Ogita, T., Otawara-Hamamoto, Y., Okabe, F., Kira, Y., Harii, K., Miyazono, K., Takuwa, Y., Fujita, T. Inhibition of rat vascular smooth muscle proliferation in vitro and in vivo by bone morphogenetic protein-2. *J. Clin. Invest.* 1997;100:2824-32.

Nomura, H., Naito, M., Iguchi, A., Thompson, W. D., Smith, E. B. Fibrin gel induces the migration of smooth muscle cells from rabbit aortic explants. *Thromb. Haemost.* 1999 Oct;82(4):1347-52.

O'Brien, J. E., Ormont, M. L., Shi, Y., Wang, D., Zalewski, A., Mannion, J. D. Early injury to the media after saphenous vein grafting. *Ann. Thorac. Surg.* 1998; 65:1273-8.

Oliveira, S. A., Dallan, L. A. O., Lisboa, L. A. F. Intervenções cirúrgicas na doença arterial coronária crônica. In: *Tratado de Cardiologia – SOCESP*. Guanabara Koogan, 10. ed. c.7. 2005;615-23.

Rodriguez, E., Lambert, E. H., Magno, M. G., Mannion, J. D. Contractile smooth muscle cell apoptosis early after saphenous vein grafting. *Ann. Thorac. Surg.* 2000; 70:1145-1153.

Sageshima, M., Kawamura, K., Toda, K., Masuda, H., Shozawa, T. An ultrastructural study of pulmonary capillary vessels in blood volume-overloaded rat. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1990; 277:673-680.

Sasaki, Y., Suehiro, S., Becker, A. E., Kinoshita, H., Ueda, M. Role of endothelial cell denudation and smooth muscle cell dedifferentiation in neointimal formation of

human vein grafts after coronary artery bypass grafting: therapeutic implications. *Heart*. 2000; 83:69-75.

Stark, V. K., Hoch, J. R., Warner, T. F., Hullett, D. A. Monocyte chemotactic protein-1 expression is associated with the development of vein graft intimal hyperplasia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17:1614-21.

Stark, V. K., Warner, T. F., Hoch, J. R. An ultrastructural study of progressive intimal hyperplasia in rat vein grafts. *J. Vasc. Surg. Biol.* 1997; 26:94-103.

Sterpetti, A. V., Cucina, A., Lepidi, S., Randone, B., Corvino, V., D'Angelo, S. I., Cavallaro, A. Formation of myointimal hyperplasia and cytokine production in experimental vein grafts. *Surgery*. 1998; 123: 461-9.

Sterpetti, A. V., Cucina, A., Lepidi, S., Randone, B., Stipa, F., Aromatario, C., Travi, D., D'Angelo, S. L., Cavallaro, A., Stipa, S. Progression and regression of myointimal hyperplasia in experimental vein grafts depends on platelet-derived growth factor and basic fibroblastic growth factor production. *J. Vasc. Surg.* 1996; 23:568-75.

Tomas, J. J., Stark, V. E., Kim, J. L., Wolff, R. A., Hullett, D. A., Warner, T. F., Hoch, J. R. Beta-galactosidase-tagged adventitial myofibroblasts tracked to the neointima in healing rat vein grafts. *J. Vasc Res.* 2003; 40(3):266-75.

Torsney, E., Mayr, U., Zou, Y., Thompson, W. D., Hu, Y., Xu, Q. Thrombosis and neoíntima formation in vein grafts are inhibited by locally applied aspirin through endothelial protection. *Circ. Res.* 2004; 94:1466-73.

Wallner, K., Li, C., Fishbein, M. C., Shah, P. K., Sharifi, B. G. Arterialization of human grafts is associated with tenascin-c expression. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1999; 34:871-875.

Westerband, A., Crouse, D., Richter, L. C., Aguirre, M. L., Wixon, C. C., James, D. C., Mills, J. L., Hunter, G. C., Heimark, R. L. Vein adaptation to arterialization in an experimental model. *J. Vasc. Surg.* 2001; 33:561-9.

Wu, X., Huang, L., Zhou, Q., Song, Y., Li, A., Jin, J., Cui, B. Mesenchymal stem cells participating in ex vivo endothelium repair and its effect on vascular smooth muscle cells growth. *Int. J. Cardiol.* 2005; 105:274-82.

Yamamura, S., Okadome, K., Onohara, T., Komori, K., Gugimachi, K. Blood flow and kinetics of smooth muscle cell proliferation in canine autogenous vein grafts: in vivo BrdU incorporation. *J. Surg. Res.* 1994; 56:155-161.

Zeff, R. H., Kongtahworn, C., Iannone, L. A., Gordon, D. F., Brown, T. M., Phillips, S. J., Skinner, J. R., Spector, M. Internal mammary artery versus saphenous vein graft to the left anterior descending coronary artery: prospective randomized study with 10-year follow-up. *Ann. Thorac. Surg.* 1988; 45:533-36.

Zhan Y, Kim S, Izumi Y, Izumiya Y, Nakao T, Miyazaki H, Iwao H. Role of JNK, p38, and ERK in Platelet-Derived Growth Factor-Induced Vascular Proliferation, Migration, and Gene Expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23(5):795-801.

Zhang, W., Bai, H. Z., Sawa, Y., Yamakawa, T., Kadoba, K., Taniguchi, K., Masuda, J., Ogata, J., Shirakura, R., Matsuda, H. Association of smooth muscle cell phenotypic modulation with extracellular matrix alterations during neointima formation in rabbit vein grafts. *J. Vasc. Surg.* 1999; 30:169-83.

Zou, Y., Dietrich, H., Hu, Y., Metzler, B., Wick, G., Xu, Q. Mouse model of venous bypass graft arteriosclerosis. *Am. J. Pathol.* 1998; 153:1301-10.