Thaiz Ferraz Borin

Aumento da IL-1β no processo de arterialização de enxertos venosos utilizando modelos e*x 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
Efeito do aumento da IL-1ß 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.Vasos coronários 3.*In vitro* 4.Revascularização miocárdica 5.Análise de seqüência com séries de oligonucleotídeos

USP/FM/SBD-392/07

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

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Financiadora Nacional de Estudos e Projetos (FINEP).

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

Referências: adaptado de *International Commitee 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

Índice ..... **ii**
Índice de Figuras e Tabelas ..... **iii**
Lista de Abreviaturas ..... **v**
Resumo ..... **ix**
Abstract ..... **xi**
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 **21**
4.1. Obtenção das Veias Safenas Humanas **21**
4.2. Obtenção de Enxerto Venoso Humano **21**
4.3. Caracterização Funcional da IL1β *In Vitro* **22**
4.3.1. Cultura Primária **22**
4.3.2. Incorporação de [^{3}H]timidina no DNA da Célula **22**
4.4. Modelo de Enxerto Venoso no Rato **23**
4.5. Análise Histológica **26**
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 **32**
4.10.1. Extração de RNA **32**
4.10.2. Síntese de cDNA **33**
4.10.3. RT-PCR em Tempo Real **33**
4.11. Análise Estatística **33**
5. Resultados **35**
5.1. Avaliação da Produção de IL-1β em Enxertos de Veia Safena Humana **35**
5.2. Análise Funcional *In Vitro* da IL-1β **36**
5.3. Modelo de Arterialização de Segmento Venoso em Ratos **38**
5.3.1. Análise Histológica e Morfométrica **39**

5.3.2. Análise de Apoptose, Proliferação e Densidade Celular **47**
5.4. Análise do Padrão de Expressão de IL-1β no Processo de Arterialização da Veia Jugular de Rato **52**
6. Discussão **56**
7. Conclusão **63**
8. Implicações Clínicas **65**
9. Anexo I **67**
- Modelos de Arterialização de Segmento Venoso em Ratos **67**
- Métodos **67**
  - Enxerto de Veia Jugular Externa em Aorta Abdominal **67**
  - Interligação entre Aorta Abdominal e Veia Cava Inferior **67**
  - Interposição de Veia Jugular Externa em Artéria Carótida Comum **67**
- Resultados **69**

10. Anexo II **74**
- Análise das Câmaras Cardíacas dos Ratos **74**
- Métodos **74**
- Resultados **74**

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 **81**
- Aprovação da Comissão de Ética do Protocolo de Pesquisa nº418/03 ..... **81**

13. Anexo V **83**
- Aprovação da Comissão de Ética do Protocolo de Pesquisa nº638/04 ..... **83**

14. Anexo VI **85**
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido **85**

15. Referências Bibliográficas **87**

Índice de Figuras

Figura 1. Sistema de Cultura *Ex Vivo* **06**
Figura 2. Gráfico *cDNA Microarray* validação por Real Time **08**
Figura 3. Expressão de IL1β *Ex Vivo* **09**
Figura 4. Conexão Artério-Venosa **20**
Figura 5. Sistema de Cultura *Ex Vivo* **06**
Figura 6. Gráfico *cDNA Microarray* validação por Real Time **08**
Figura 7. Expressão de IL1β *Ex Vivo* **09**
Figura 8. Conexão Artério-Venosa **20**
Figura 9. Sistema de Cultura *Ex Vivo* **06**
Figura 10. Gráfico *cDNA Microarray* validação por Real Time **08**
Figura 11. Expressão de IL1β *Ex Vivo* **09**
Figura 12. Conexão Artério-Venosa **20**
Figura 13. Sistema de Cultura *Ex Vivo* **06**
Figura 14. Gráfico *cDNA Microarray* validação por Real Time **08**
Figura 15. Expressão de IL1β *Ex Vivo* **09**
Figura 16. Conexão Artério-Venosa **20**
Figura 17. Sistema de Cultura *Ex Vivo* **06**
Figura 18. Gráfico *cDNA Microarray* validação por Real Time **08**
Figura 19. Expressão de IL1β *Ex Vivo* **09**
Figura 20. Conexão Artério-Venosa **20**
Figura 21. Gráfico *cDNA Microarray* validação por Real Time **08**
Figura 22. Expressão de IL1β *Ex Vivo* **09**
Figura 23. Conexão Artério-Venosa **20**
Figura 24. Sistema de Cultura *Ex Vivo* **06**
Figura 25. Gráfico *cDNA Microarray* validação por Real Time **08**
Figura 26. Expressão de IL1β *Ex Vivo* **09**

Índice de Tabelas

Tabela 1. Conexão Artério-Venosa **20**
Tabela 2. Conexão Artério-Venosa **20**
Tabela 3. Conexão Artério-Venosa **20**
Tabela 4. Conexão Artério-Venosa **20**

Lista de Abreviaturas

AVC – acidente vascular cerebral

BMP2 – proteína morfogênica óssea 2

BSA – albumina sérica bovina

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 1β

IL1RI – receptor tipo 1 da interleucina 1β

IL1β – interleucina 1β

IL-6 – interleucina 6

IL-8 – interleucina 8

JNK – quinase c-jun aminoterminal

LEI – lâmina elástica interna

MAP quinase – proteína quinase ativada por mitógeno

MMP – metaloproteinase matricial

NO – óxido nítrico

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

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

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 IL-1β tanto em veia safena humana como em modelo animal de arterialização venosa. A IL-1β 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-1β 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-1β, 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 neoíntima. A IL-1β, 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-1β 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-1β 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. Vasos Coronários. 3. *In Vitro* 4. Revascularização Miocárdica 5. Análise de Sequência com Séries de Oligonucleotídeos

Increased IL-1β during vein grafts arterialization: study of ex vivo, in vitro and in vivo models.

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 IL-1β gene in human saphenous vein and the time-course regulation in rat arterialization model. IL-1β 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-1β expression 12 times higher on day 1 compared to normal jugular vein. Later, the IL-1β 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 neointima 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-1β activity may be an interesting target to be explored I 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-1β 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. Coronarios Vessels. 3. *In Vitro* 4. Miocardium Revascularization 5. Analysis of Oligonucleotideos Sequence Series

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 lípides 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 a 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 trombomodulina (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 tenascin-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), cujos 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 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 inicias 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-1β),

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 tumorogenicidade 16 (Tabela 1).

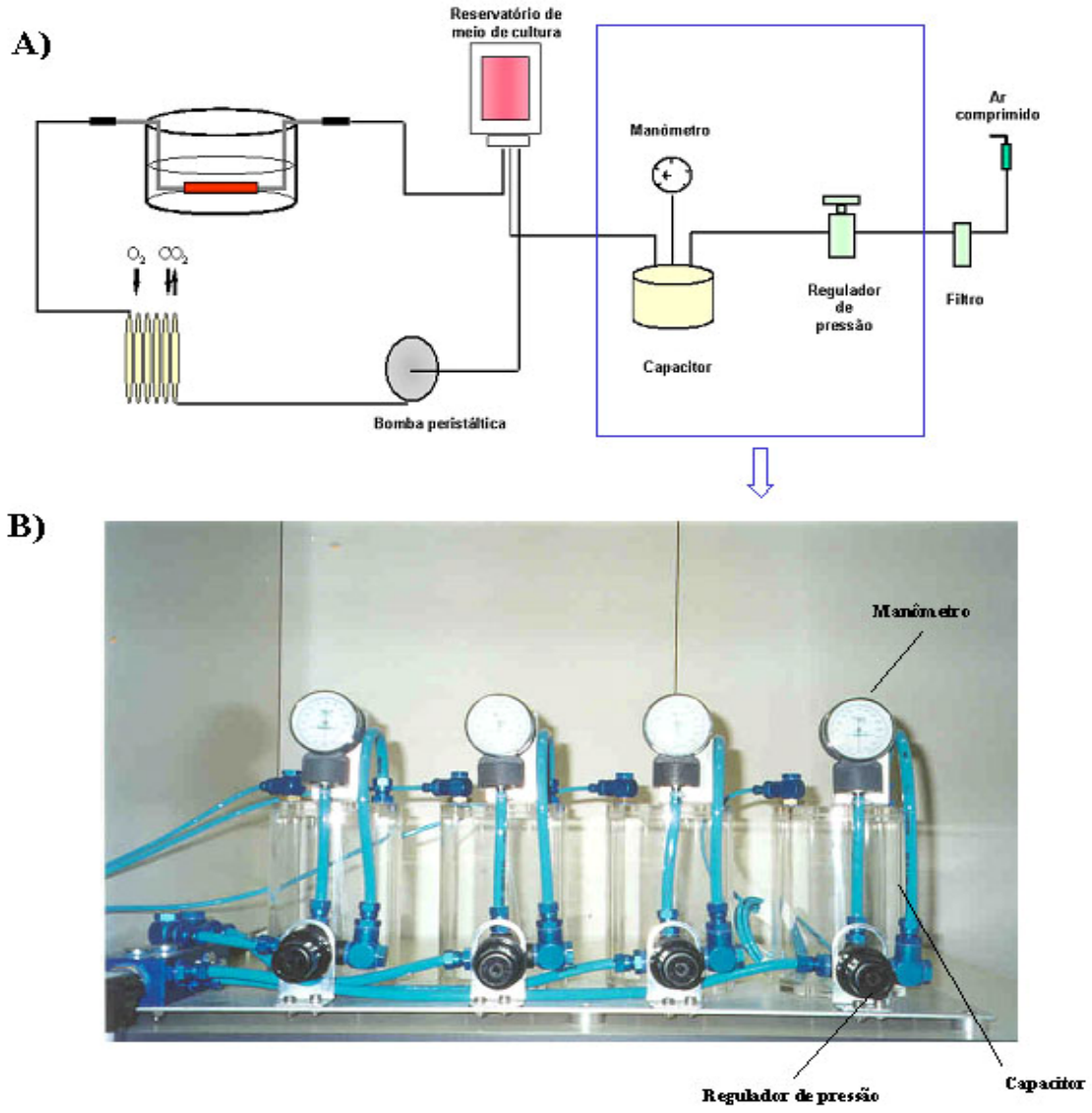

Figura 1. Sistema de cultura *ex vivo* de veia safena humana. **(A)** Adaptação do sistema de capilares artificiais com a substituição do cartucho contendo os capilares por uma cuba, onde será cultivado o vaso, e inclusão de um **(B)** aparato para a realização da pressurização do sistema.

Os genes IL-1β, 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-1β, GRO-3 e IL-6 mostraram aumento significante em relação à condição venosa (Figura 2). A IL-1β, 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 maiores que 1, da relação entre as condições experimentais em cada gene estão representadas nos *arrays* A e B.

Gene	**"Array" A (A/V)**	**"Array" B (A/V)**
Fator estimulatório de colônia 3 (CSF3)	1,9	2,1
Interleucina1, beta (IL 1β)	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 tumorogenicidade 16	3,9	2,5
Supressor de tumorogenicidade 16	1,9	3,1

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

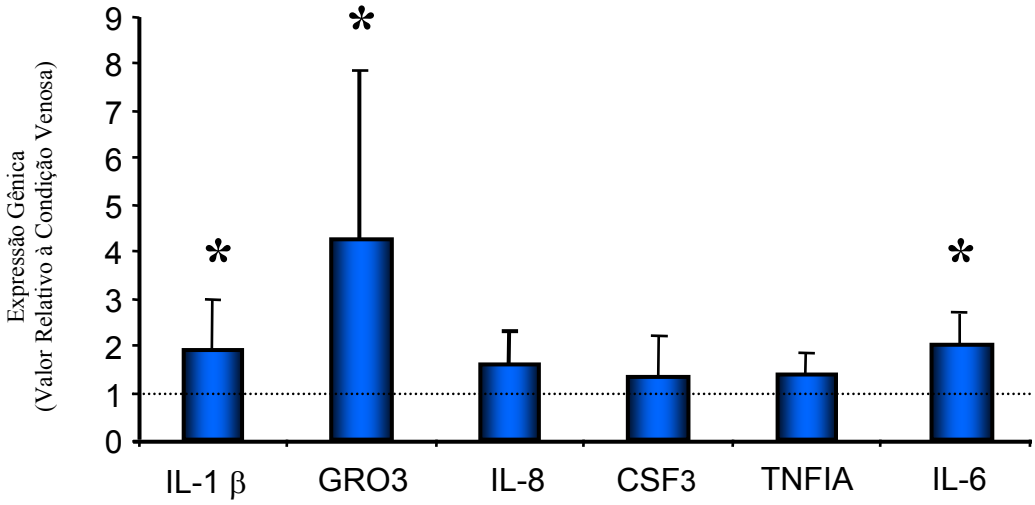

Figura 2. Quantificação por RT-PCR tempo real da expressão dos genes candidatos em 16 pacientes. Veias safenas de cada paciente foram cultivadas em regime venoso (5 mL/min) e arterial (50 mL/min - 80 mmHg) por 1 dia. * $p<0.05$ vs controle.

A IL-1β é uma citocina cuja produção é regulada por mecanismos transcricionais e pós-translacionais. A atividade da IL-1β ocorre através da interação com o receptor IL-1R1 cuja cascata de sinalização resulta em ativação de NF-κB 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-1β 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-1β, diminuição do IL-1RA,

enquanto que a expressão do receptor IL1R1 não é alterada (Figura 3). Assim, com o aumento da expressão de IL-1β e diminuição da expressão do seu antagonista IL-1RA, a IL-1β vai estar mais disponível para atuar no receptor IL1R1.

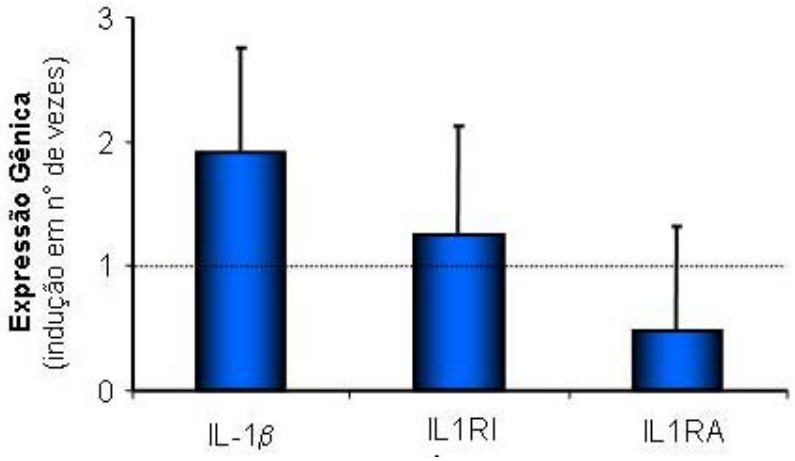

Figura 3. Quantificação por RT-PCR tempo real da expressão da IL-1β e seus componentes. Veias safenas de cada paciente foram cultivadas em regime venoso (5 mL/min) e arterial (50 mL/min - 80 mmHg) por 1 dia.

A aterosclerose é considerada uma doença inflamatória crônica e a IL-1β 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-1β que atua em diversos tipos celulares que compõem a lesão. Interessantemente, animais deficientes em IL-1β 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-1β no processo aterosclerótico arterial, o seu papel no enxerto venoso merece ser melhor investigado.

2. Objetivo

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

Objetivos específicos:

- Avaliar a produção de IL-1β 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-1β 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; Escarlate 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; Na_2HPO_4; KH_2PO_4; $NaHCO_3$; Glucose; $MgCl_2$; EGTA; PIPES; *Fast Red;* Ácido Pícrico; 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:

Tiossulfato 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); *[^{3}H]timidina* Radioativa e Líquido de Cintilação (Amersham Biosciences); Enzima Transcriptase Reversa *Improm II* (Promega); Xilol (Quimex); Lugol Forte (Dinâmica Reagentes Analíticos); Soro Fisiológico estéril; Ração (Nuvital); P*rimers*; Heparina (Hipolabor); Ketalar (União Química S/A); Rompum (Vetbrandes); Nitrogênio Líquido.

3.2 <u>Kits e Anticorpos:</u>

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-1β (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 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 (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; Tubos para Líquido de Cintilação; Ponteiras P1000, P200 e P2; Pipetas estéreis 2, 5, 10 e 25mL; Eppendorfs estéreis 1500 e 200uL;.

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 Scintallation 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 CO_2 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* (Zeizz)

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-1β *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 CO_2.

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

Células de músculo liso primárias de veia safena humana foram cultivadas em placas de 24 poços ($2x10^4$ 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 G_0. O estímulo para proliferação celular foi de 48 horas sendo que a *[^{3}H]timidina* (10uCi/mL) foi adicionada nas últimas 24 horas.

Para a determinação da quantidade de *[^{3}H]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:

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 sangüíneo foi restabelecido e os animais acompanhados por 1, 3, 7, 14, 28 e 90 dias.

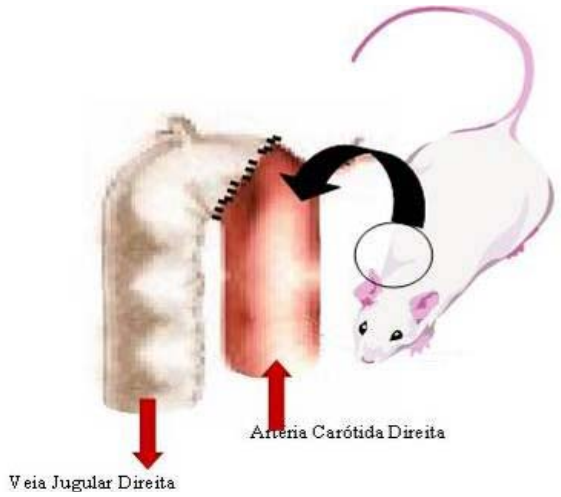

Figura 4. Representação esquemática da Conexão Artério-Venosa entre artéria carótida comum direita e veia jugular externa direita, realizada em ratos. As setas indicam a direção do fluxo sangüíneo.

Após esses períodos os animais foram sacrificados com superdoses de pentobarbital (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 utilizas como controle (n=5), uma vez que a veia jugular contra-lateral dos animais submetidos a cirurgia apresentaram alterações estruturais devido ao aumento do fluxo sanguíneo após a cirurgia de junção artério-venosa (Figura 5).

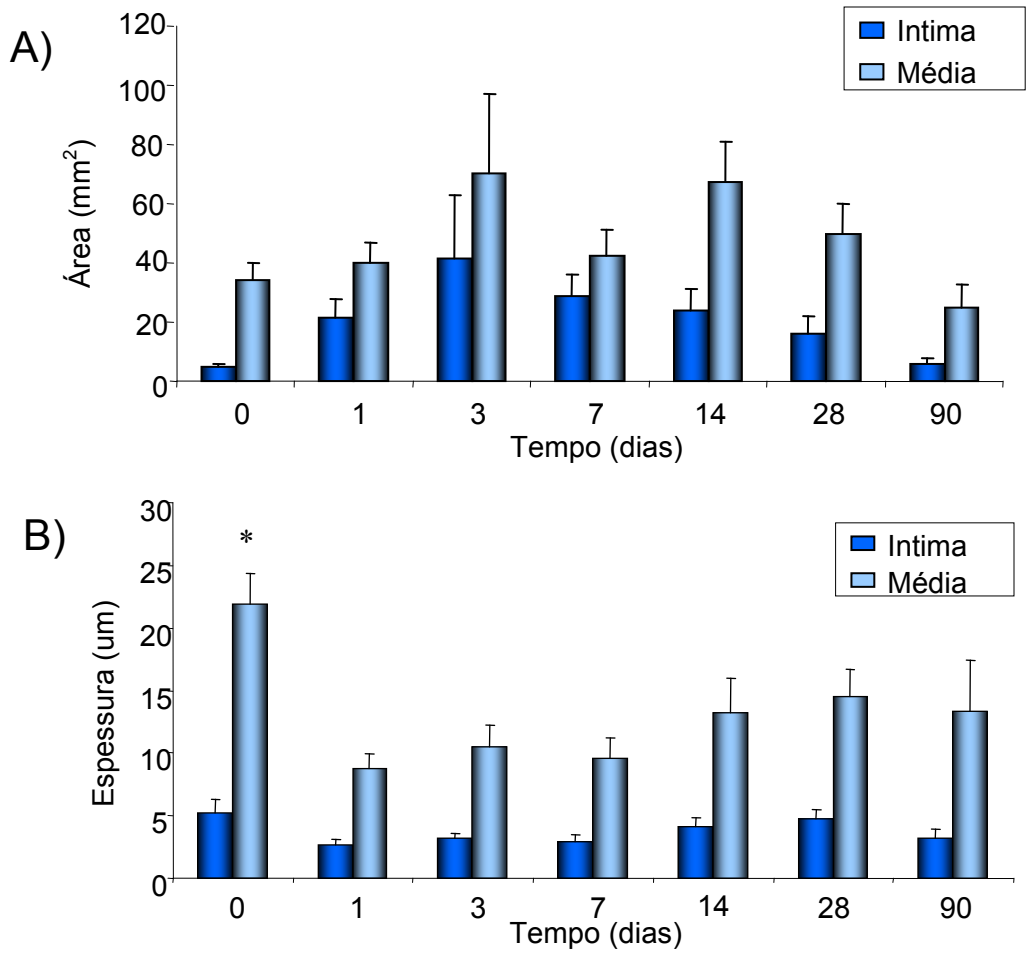

Figura 5. Quantificação da **A)** área e **B)** espessura da veia jugular normal (0) e contra-lateral de rato em relação ao tempo em vermelho a túnica íntima e em azul túnica média. $p<0.05$

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 parafina, em seguida cortado em micrótomo em espessura de 3 μm. Para padronizar o local de análise, os cortes foram iniciados a 400 μm 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*, rehidratados 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: água amoniacal a 1% para azular a hematoxilina, água corrente, ácido clorídrico à 0,01% para diferenciar a coloração e incubados com eosina alcoólica por 5 minutos, então, clareados e desidratados em graduações crescentes de álcoois, 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 ferro 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, depois, fixados e desidratados em graduações crescentes de álcoois, diafanizados e montados em resina.

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

Os tecidos foram desparafinizados em *citrisolv*, rehidratados em graduações decrescentes de álcool e corados com hematoxilina de *Weigert* por 5 minutos, enxaguados em água corrente, incubados com escarlate de *Briebriech* 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 álcoois, diafanizados e montados em resina.

4.6. Morfometria:

Área e espessura do lúmen, fibrina, túnica íntima, túnica média mais adventícia foram avaliados em três cortes consecutivos. 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.

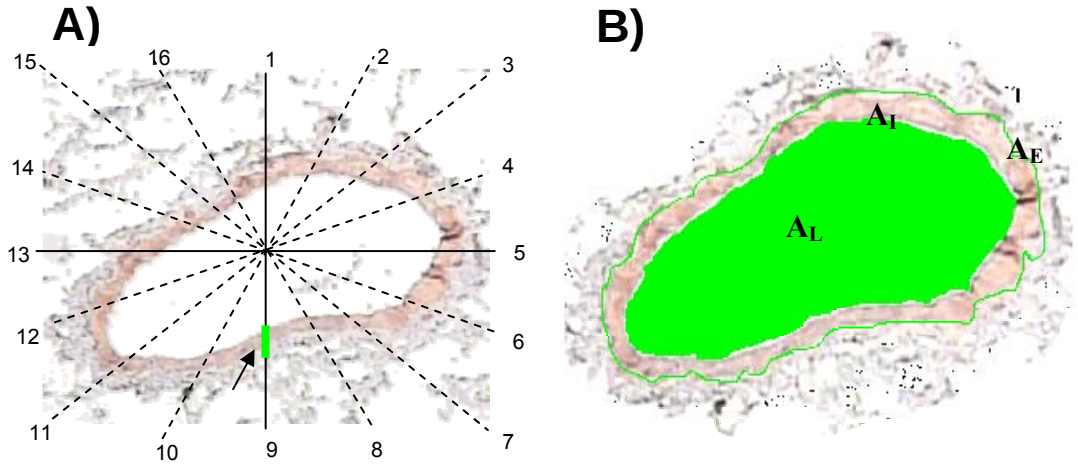

Figura 6. Esquema representativo da quantificação dos vasos. **A)** A espessura do vaso em cada corte foi avaliada em 16 regiões onde a seta indica a espessura da camada média. **B)** As áreas das camadas vasculares foram obtidas pela quantificação das áreas determinadas pelo lúmen (A_L), lâmina elástica 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. <u>Densidade Celular:</u>

Segmentos vasculares foram fixados em formaldeído tamponado a 4%, parafinizados e cortados a 3um de espessura. Os tecidos foram desparafinizados em *citrisolv*, rehidratados em várias graduações de álcool e corados com *Hoechst* 33258 conforme descrito por Liu & Fung (1998). 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 (20ug/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, em 8 campos diferentes seguindo o sentido horário contornando todo o vaso, no aumento de 40x em microscópio de fluorescência *Zeizz 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 3um 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 BSA 5% na concentração titulada previamente (Tabela 2), que será mostrada a seguir. Após 18h de incubação a 4°C, os tecidos foram lavados 3 vezes por 5 minutos com PBS (NaCl 137mM, KCl 2,5mM, Na_2HPO_4 10mM e KH_2PO_4 176mM, pH 7,4) e incubados com solução 1 do kit LSAB HRP Universal por 20 minutos a 37°C, que possui anticorpos secundários *anti-mouse, anti-rabbit e anti-goat*. Depois de lavados em PBS os tecidos foram incubados com solução 2 do kit LSAB HRP Universal que contém complexo biotina-estreptavidina para amplificação do sinal do anticorpo primário e, então, foram revelados em solução de Diaminobenzidina Tetrahidroclorida 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 16,2μg/mL (1:500) em BSA 5%. 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 0,132μg/mL (1:1000) em BSA 5%. A quantificação do número de células positivas coradas em marrom e do número total de células foi realizada em microscópio de luz.

- IL-1β:

Para a identificação da IL-1β foi utilizado o anticorpo primário policlonal contra IL-1β diluído na concentração de 1μg/mL (1:200) em BSA 5%, 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-1β 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 2. 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	Produzido em:
Hoechst 33258	20ug/mL	1:50	nuclear	-
TUNEL	-	1:10	DNA fragmentado	-
α-Actina SMC	16,2ug/mL	1:500	H	C
IL-1β	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 Czomczynski & 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 1ug 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, $MgCl_2$ 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 (¿).

4.11. Análise Estatística:

Todos os resultados estão representados como media ± 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 $p<0,05$.

5. Resultados

Dados anteriores do laboratório, utilizando a tecnologia de *cDNA microarray*, mostram que a IL-1β é um gene que apresenta sua expressão aumentada em veia safena humana cultivada em regime arterial. No presente trabalho a expressão da IL-1β foi verificada em enxertos humanos de veia safena e o papel funcional da IL-1β 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-1β pudesse ser avaliada de maneira temporal.

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

Para certificar se o aumento de IL-1β 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-1β 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).

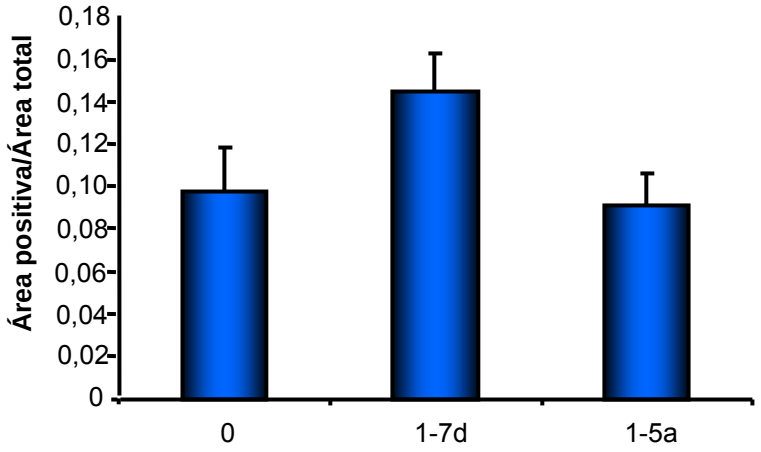

Figura 7. Imunohistoquímica para IL1β em segmentos de enxerto venoso obtidos de material de necropsia nos tempos de 1-5 dias e 1-4 anos após cirurgia de revascularização do miocárdio.

5.2. <u>Análise Funcional *in vitro* da IL-1β:</u>

Para avaliar possíveis efeitos relacionados ao aumento da IL-1β no enxerto de veia safena, cultura primária de células de músculo liso de veia safena foi tratada com IL-1β. 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-1β parece estar relacionada com a diminuição da proliferação celular, porém sem induzir apoptose (Figuras 8 e 9). Além disto, o aumento de IL-1β pode induzir aumento de produção de VEGF (Figura 10), que pode ser importante para re-endotelização do enxerto e sinergicamente com a IL-1β 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).

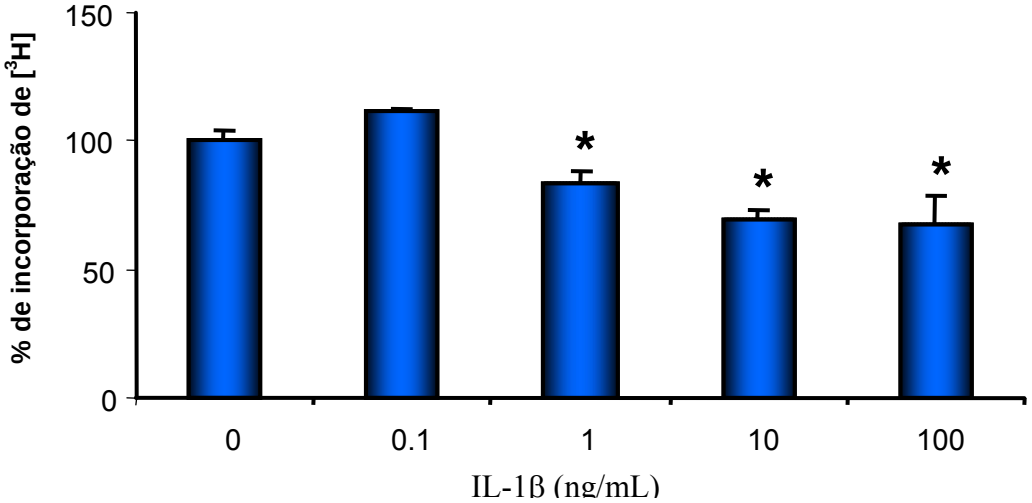

Figura 8. Curva dose-resposta da incorporação de [^{3}H]-Timidina no DNA de células primárias de músculo liso de safena humana tratadas com IL-1β. Três dias de incubação em 0,5%BSA, seguido de 48 horas de estímulo na presença de 10% de FBS. [^{3}H]-Timidina (10uCi/mL) foi adicionada nas últimas 24 horas.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

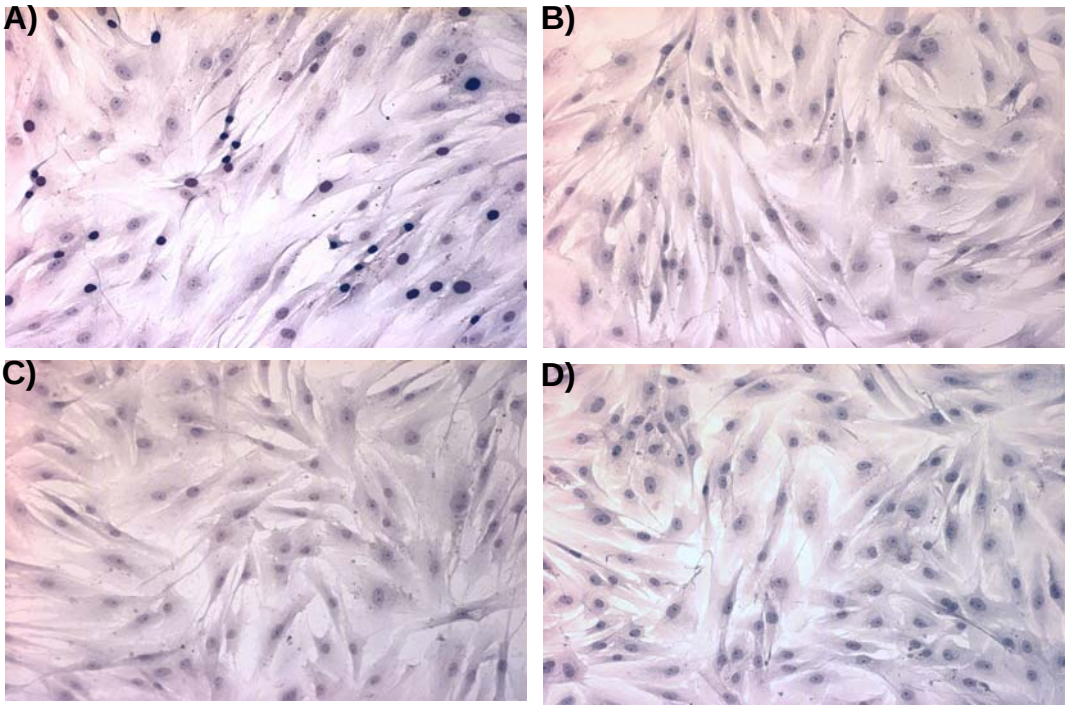

Figura 9. Ensaio de TUNEL em SMC primária de veia safena humana, tratadas com IL-1β. **A)** Controle positivo, tratado com DNAse; **B)** Controle negativo, sem tratamento; **C)** Células tratadas com 1ng/mL de IL-1β e **D)** Células tratadas com 10ng/mL de IL-1β.

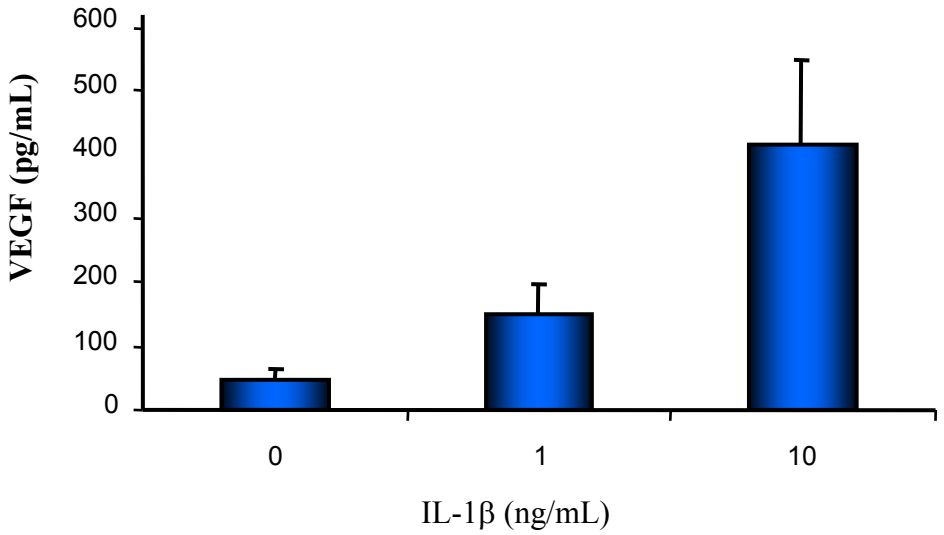

Figura 10. Produção de VEGF por células de músculo liso de veia safena humana estimuladas com IL-1β. Cada barra representa média ± erro padrão de 3 experimentos em triplicata. Os dados foram normalizados em relação ao estímulo de 0,5% de FBS.

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 significante (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 1° 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 7° 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), 28dias (n=8) e 90 dias (n=5) após a cirurgia.

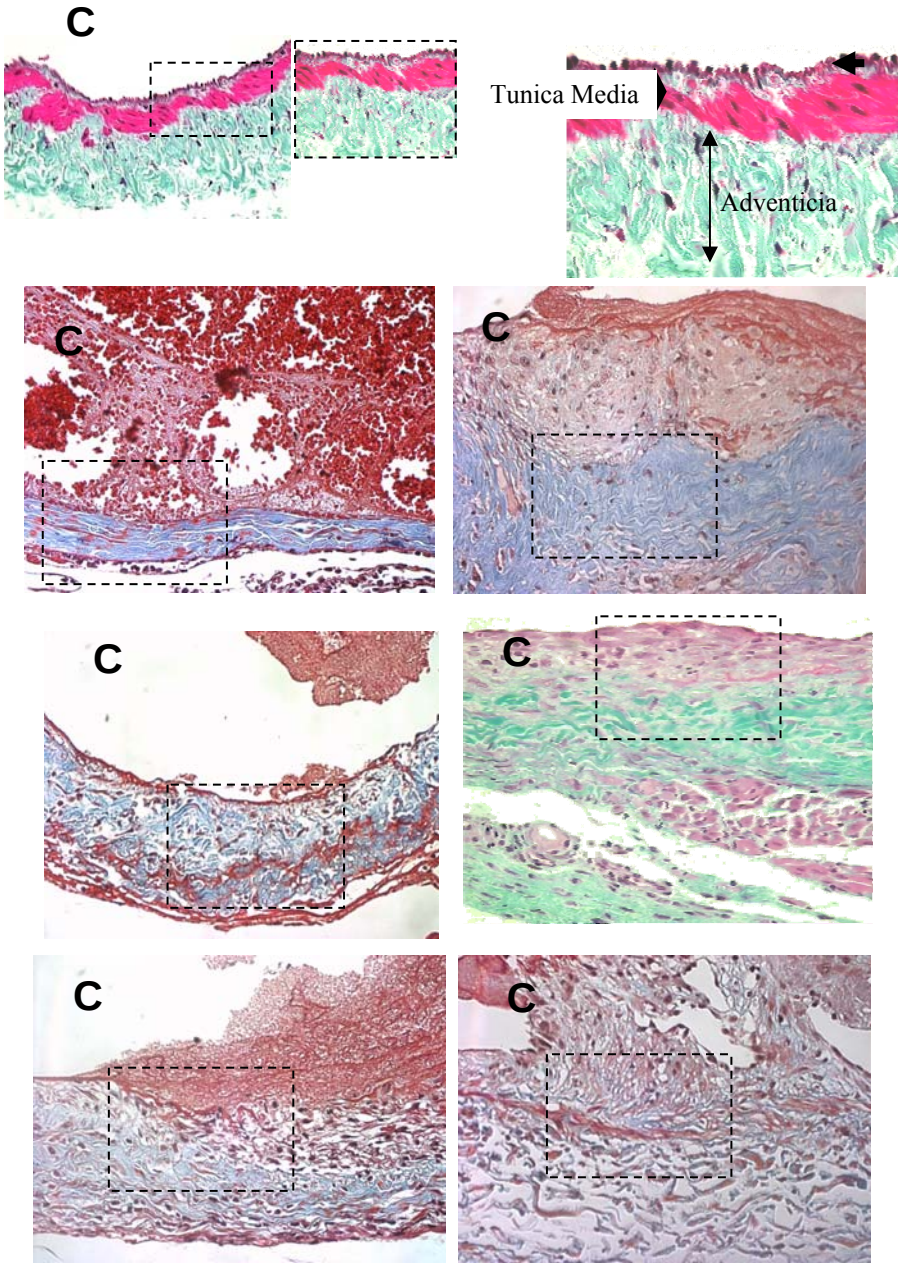

Figura 11. Cortes histológicos de veia jugular direita de rato, 7 dias após a cirurgia, corados com **A)** Hematoxilina-Eosina, **B)** Verhoeff-Van Gienson, **C)** Tricômio de Masson e **D)** imunohistoquímica anti-α actina de SMC contra corada com Miller. **i:** camada íntima, **m:** camada média e **a:** camada adventícia. Foto representativa de 8 casos. Aumento 40X e 100X.

Em grande parte dos segmentos arterializados foi observado à 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). 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). 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).

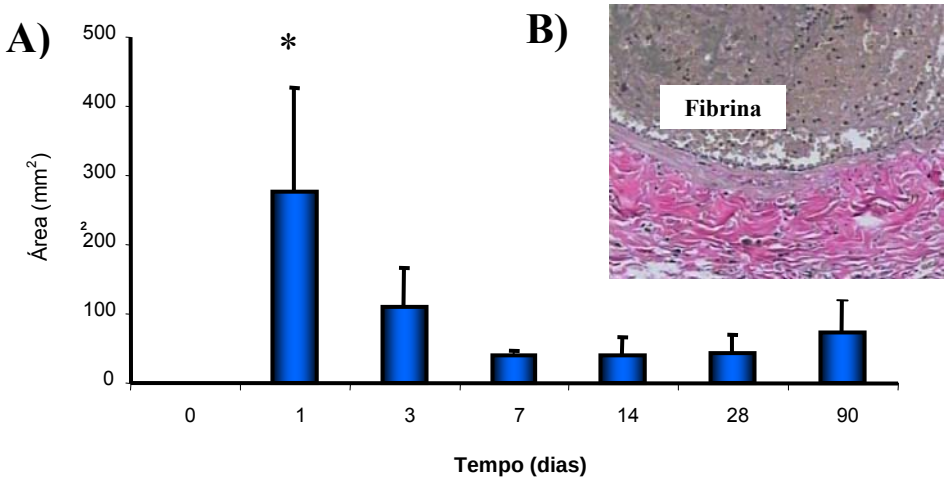

Figura 12. A) Quantificação da área de fibrina na veia jugular de rato arterializada comparado com a veia jugular normal (0) **B)** Foto representativa de 1dia. * $p<0.05$ vs veia jugular normal

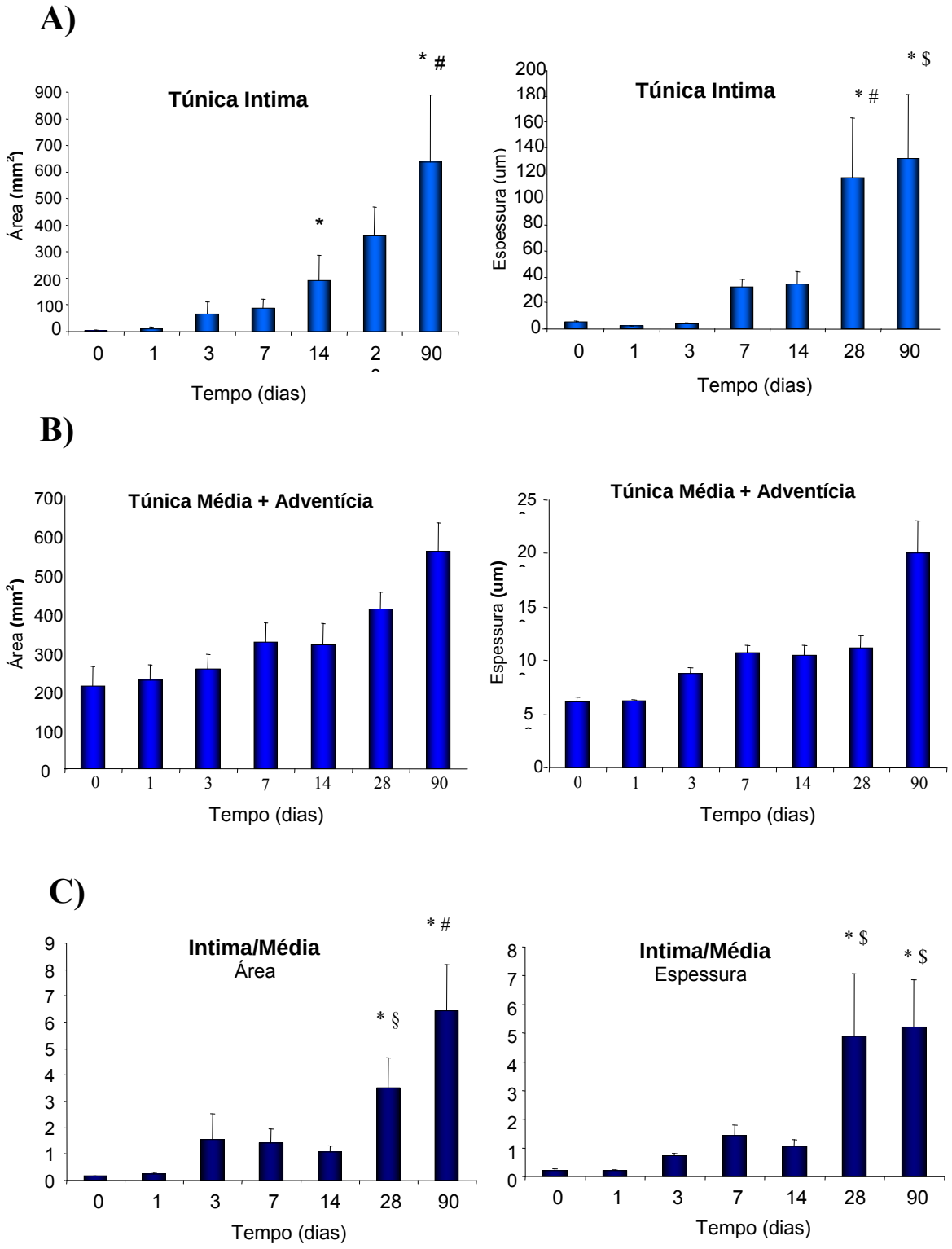

Figura 13. Quantificação da área e espessura da **A)** túnica íntima, **B)** túnica média e adventícia e em **C)** relação íntima/média em relação ao tempo, em vermelho veia jugular de rato arterializada comparado com a veia jugular normal (0). * $p<0.05$ vs veia jugular normal, § $p<0.05$ vs 1 e 3 dias, # $p<0.05$ vs 1,3 e 7 dias, $ $p<0.001$ vs 1,3,7 e 14 dias.

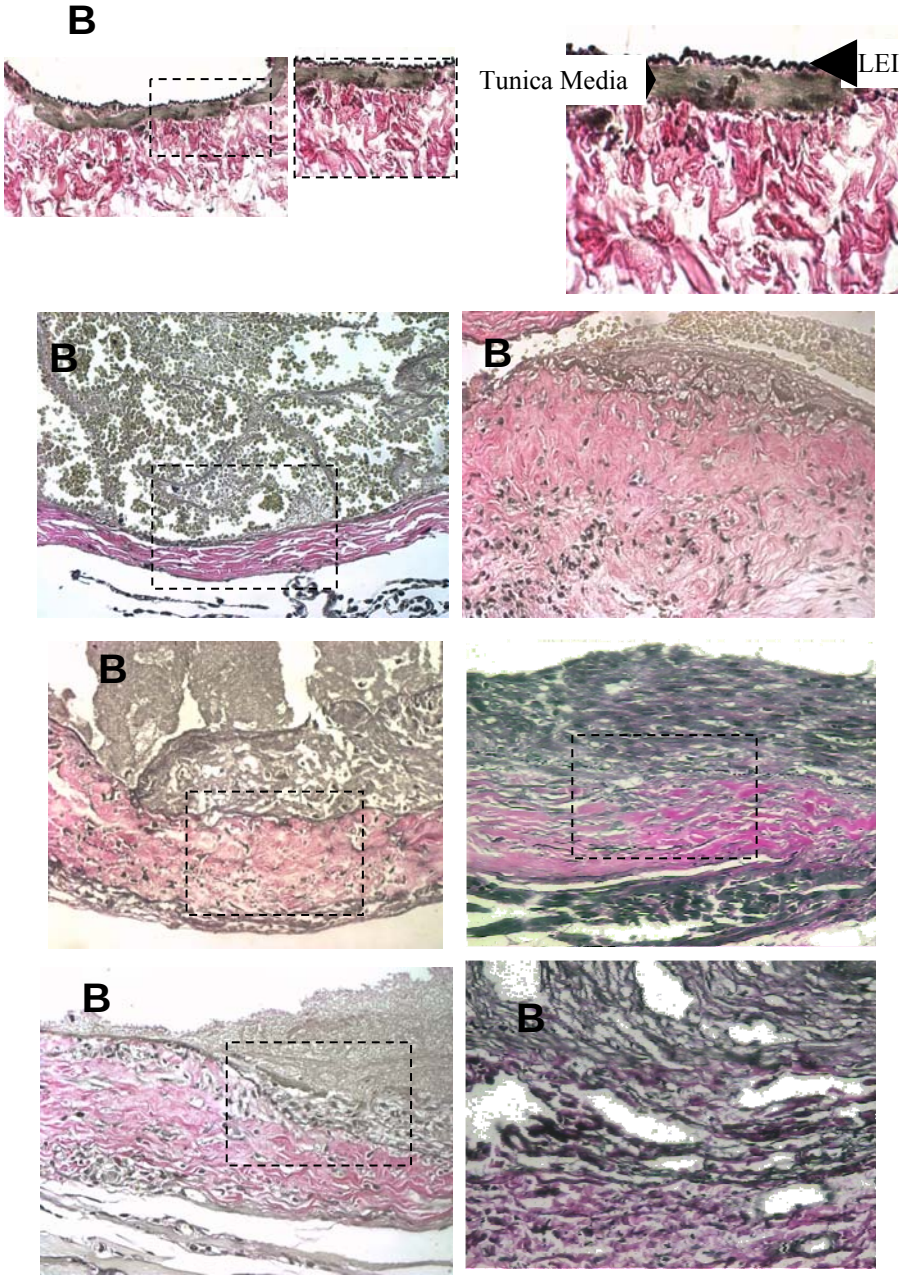

Figura 15. Cortes histológicos de veia jugular direita de rato, 14 dias após a cirurgia, corados com **A)** Hematoxilina-Eosina, **B)** Verhoeff-Van Gienson, **C)** Tricômio de Masson e **D)** imunohistoquímica anti-α actina de SMC contra corada com Miller. **i:** camada íntima, **m:** camada média e **a:** camada adventícia. Foto representativa de 9 casos. Aumento 40X e 100X.

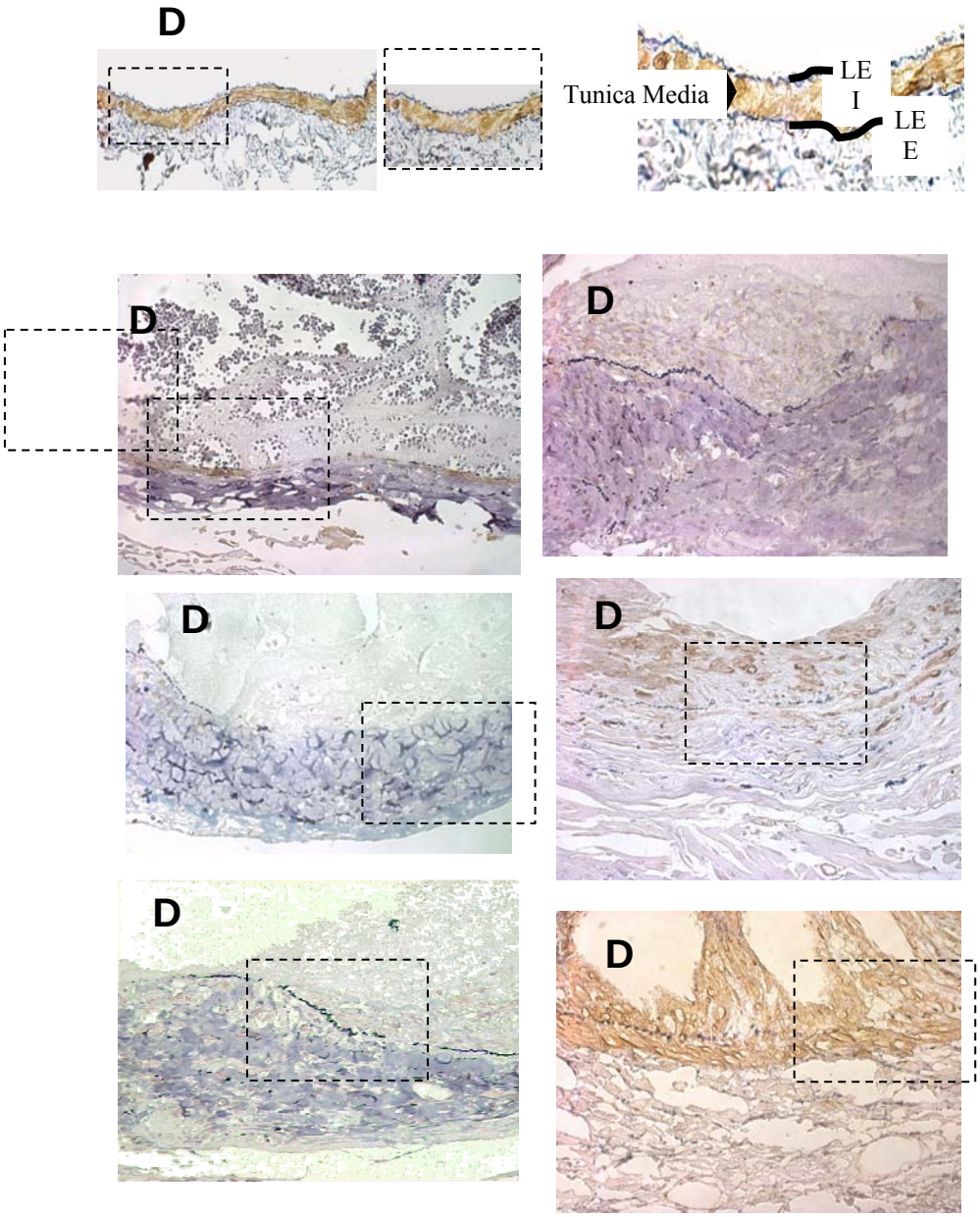

Figura 16. Cortes histológicos de veia jugular direita de rato, 1 dia após a cirurgia, corados com **A)** Hematoxilina-Eosina, **B)** Verhoeff-Van Gienson, **C)** Tricômio de Masson e **D)** imunohistoquímica anti-α actina de SMC contra corada com Miller. **f:** fibrina, **i:** camada íntima, **m:** camada média e **a:** camada adventícia. Foto representativa de 5 casos. Aumento 40X e 100X.

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 e 16), sendo que após 28 dias pode-se verificar aumento ainda maior de SMC e de maneira um pouco mais organizada (Figuras 16F). Noventa dias após a cirurgia, a neoíntima está repleta de SMC fortemente marcadas para α-actina de SMC e bem delimitada pela LEI, há microvasos neoformados no lúmem e a espessura da neoíntima torna-se fator preponderante na diminuição da luz do vaso. (Figura 14G).

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 17A e 18). 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 17B e 19). 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 que mostra uma diminuição do número de células nos primeiros dias de arterialização (1 e 3 dias) e progressivo aumento nos dias posteriores (Figuras 17C e 20).

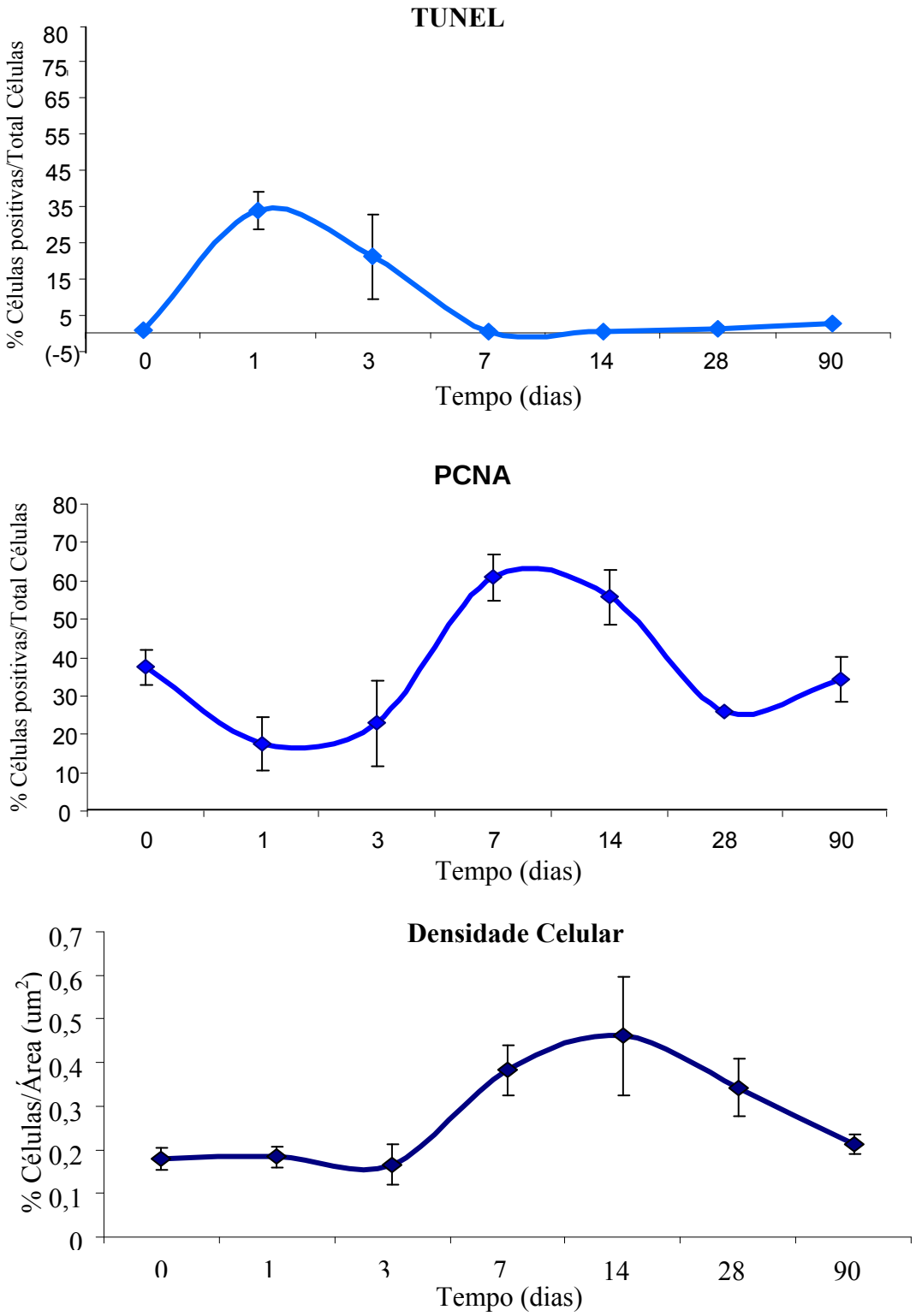

Figura 17. Densidade e morte celular dos segmentos de veia jugular arterializada detectada por *Hoechst* 33258 e TUNEL, respectivamente. **A)** Fotos representativas das colorações. Apoptose marcada em vermelho, contra-corada por hematoxilina. 40X. **B)** Gráfico das quantificações de densidade e morte celular.

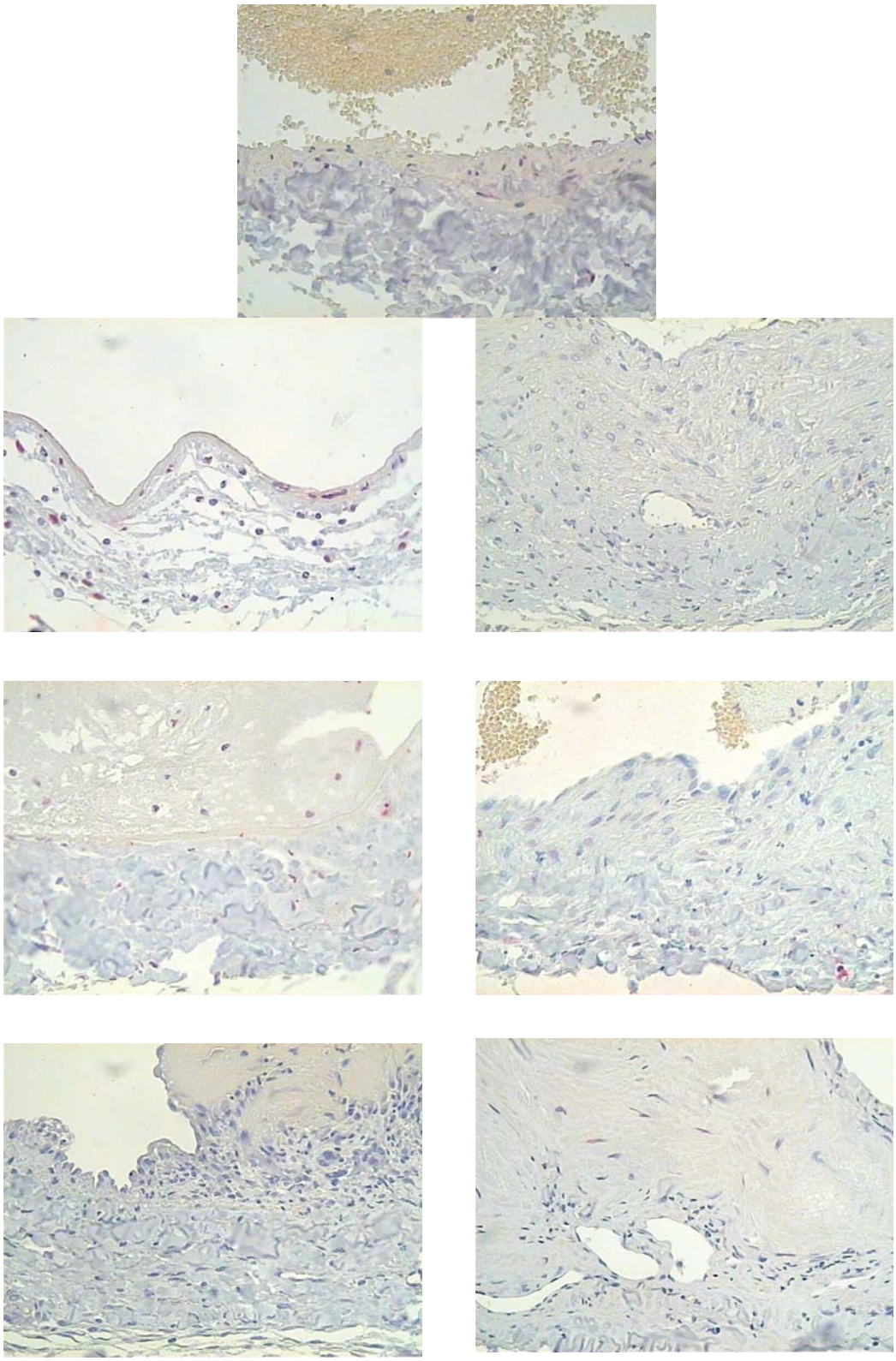

Figura 18. TUNEL no processo de arterialização do enxerto venoso em rato

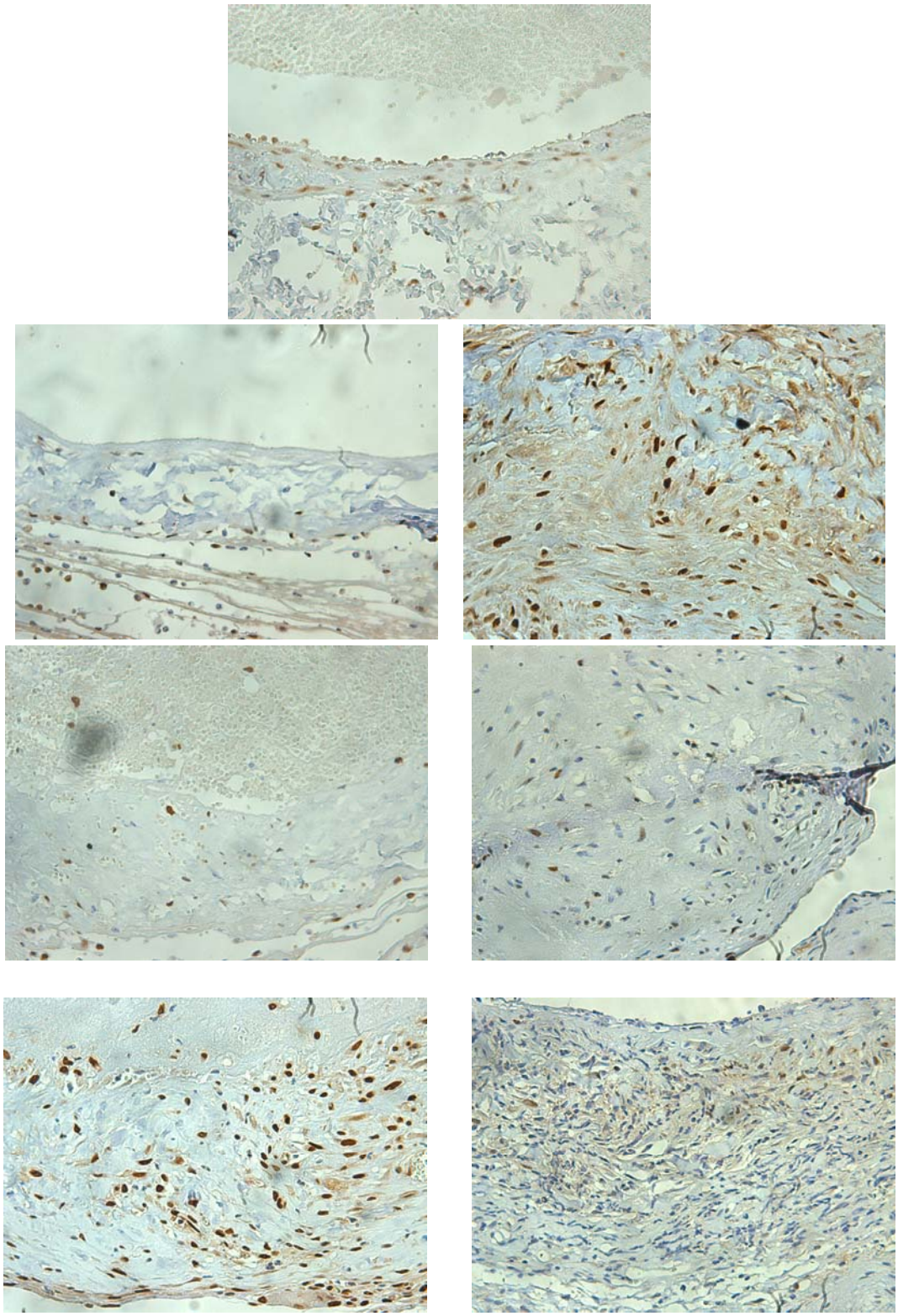

Figura 19. PCNA no processo de arterialização do enxerto venoso em rato

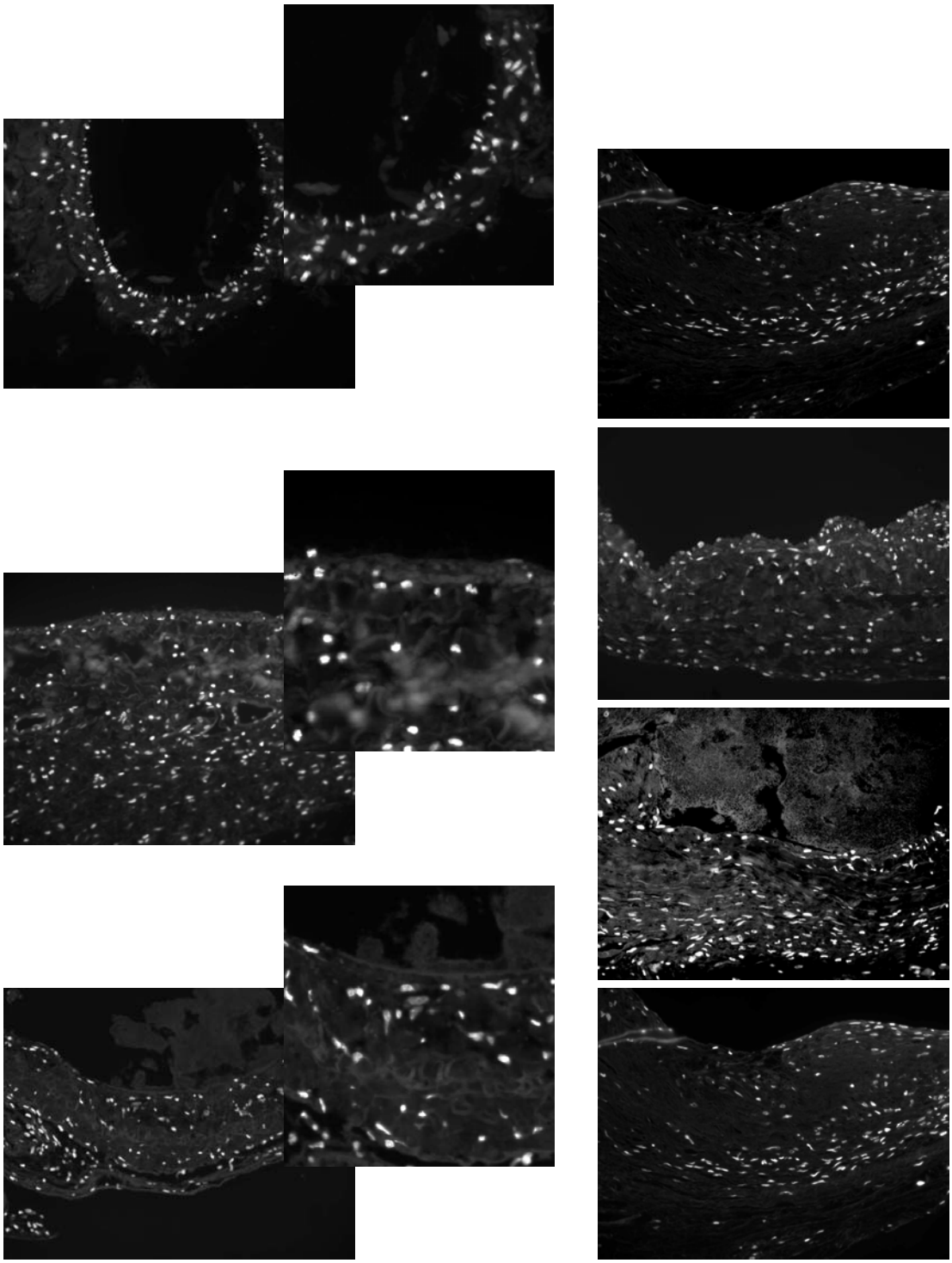

Figura 20. Densidade Celular no processo de arterialização do enxerto venoso em rato

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

A expressão da IL-1β aumenta em torno de 12 vezes na veia jugular arterializada por 1 dia quando comparada com a veia jugular normal (Tabela 3). 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-1β mantém-se variando entre valores de 3-6 vezes o valor da veia jugular normal.

Tabela 3. Expressão Gênica de IL-1β 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-1β mostrou um padrão bastante interessante da produção da proteína. Na veia jugular normal, a IL-1β é produzida em toda a circunferência do vaso, porém de forma não uniforme. Observam-se núcleos de alta produção de IL-1β e outros com produção em menor intensidade (Figura 21). Com 1 dia de arterialização, a produção da IL-1β passa a ser localizada,

somente em alguns pontos do vaso, sendo que é observado regiões com ausência total de IL-1β. No dia 3, a IL-1β 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-1β 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-1β 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 21E).

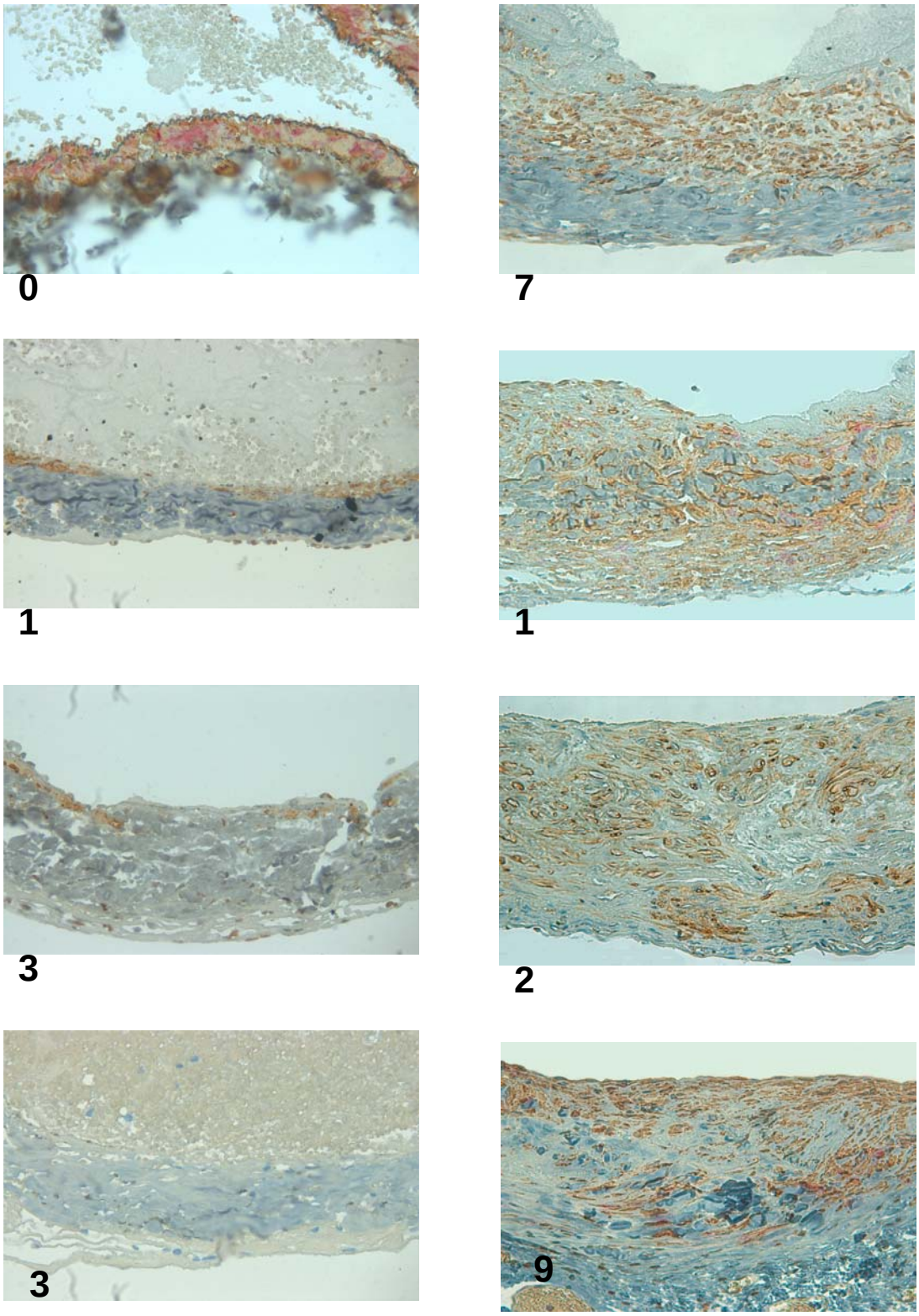

Figura 21. imunohistoquimica para IL1B no processo de arterialização

6. Discussão

No presente trabalho foi demonstrado que a IL-1β 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-1β 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; Westerband 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 significante 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 lúmem 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 subseqüente 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-1β 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-1β 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-1β 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-1β 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-1β bastante interessante. Nota-se que na condição basal a IL-1β 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-1β 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-1β 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-1β em células musculares lisas de veia safena humana (Figura 10). Pode-se sugerir que durante o processo de arterialização, a IL-1β aumentada leva ao aumento da produção de VEGF, e estes dois fatores quimiotáxicos podem estar contribuindo para a formação da neoíntima 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 neoíntima. 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-1β 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-1β no processo de arterialização de enxerto venoso possa ser elucidado.

Recentemente, entramos em contato com a industria farmacêutica Amgen que nos forneceu o medicamento Anakira (Kineret®). Trata-se de uma molécula recombinante, não glicosilada, do antagonista de receptor de IL-1β humano (IL-1RA), utilizado no tratamento de artrite reumatóide. Esta droga, por bloquear a ação da IL-1β, é bastante interessante para testarmos o efeito da IL-1β 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-1β, 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-1β para bloquear o aumento observado inicialmente no enxerto.

7. Conclusão

Em conjunto, pode-se concluir que:

- A IL-1β 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-1β, cuja expressão está aumentada na veia safena, está aumetada na veia jugular de rato arterializada.

8. Implicações Clínicas

Neste trabalho demonstramos aumento agudo da IL-1β em veia safena humana arterializada *in vivo* e *ex vivo*, e ainda caracterizamos o padrão de regulação da IL-1β no modelo animal. A caracterização funcional desta proteína no enxerto através de intervenções na produção, liberação ou atividade da IL-1β 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

- Enxerto de Veia Jugular Externa em Aorta Abdominal:

Ratos pesando 250g a 300g foram anestesiados por injeção peritoneal de pentobarbital sódica (40mg/Kg). A veia jugular externa direita foi isolada e removida com aproximadamente 1,5 cm, 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 veias ilíacas para interposição da veia jugular.

- Interligação entre Aorta Abdominal e Veia Cava Inferior:

Ratos pesando 300g a 400g foram anestesiados por injeção peritoneal de pentobarbital sódica (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 22). Após a cirurgia, o fluxo arterial foi liberado e os animais foram acompanhados por duas semanas.

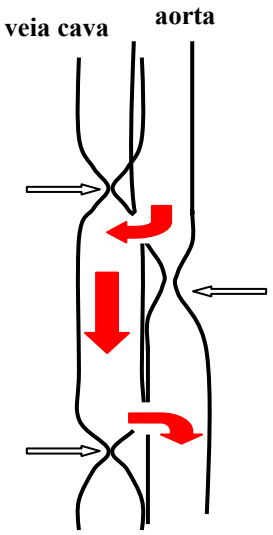

Figura 22. Modelo de fístula entre a aorta abdominal e a veia cava inferior de rato. Foram realizadas duas comunicações entre a aorta e a veia cava e ligaduras nos locais indicados pelas setas brancas. As setas vermelhas indicam o caminho percorrido pelo sangue proveniente da aorta, passando pela veia 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. 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 23). Após o enxerto cirúrgico, o fluxo sangüíneo foi restabelecido, uma dose profilática de penicilina foi administrada e os animais acompanhados por 1, 3, 7, 14 e 30 dias.

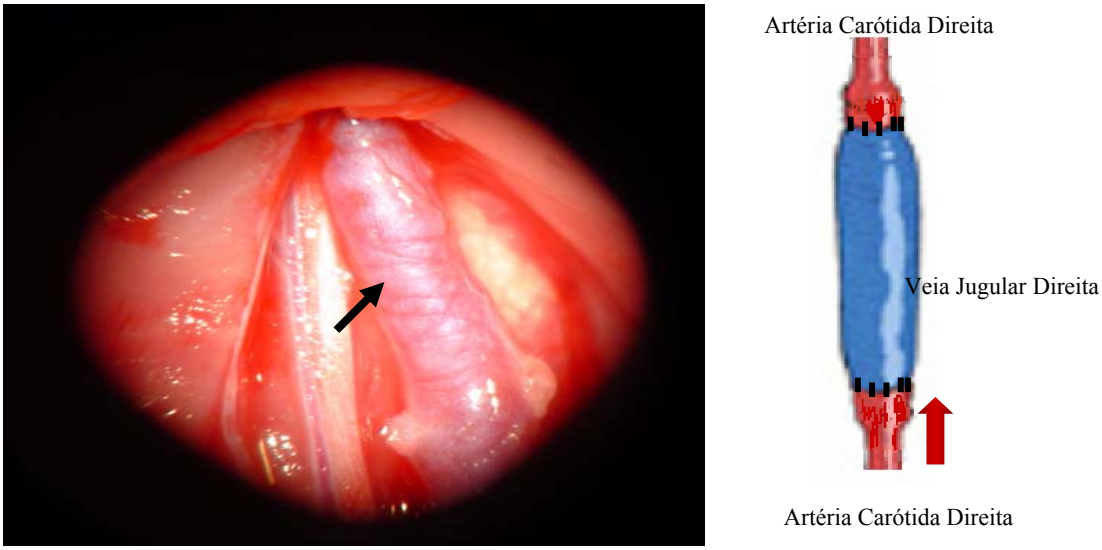

Figura 23. Enxerto de veia jugular externa direita em artéria carótida comum direita de rato, alguns minutos após anastomose. A seta em preto indica a veia jugular externa de rato enxertada. A seta em vermelho indica a direção do fluxo. Aumento de 40x por Lupa D. F. Vasconcellos M900.

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 22).

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 (± 45 minutos) e tamanho do

fragmento de veia jugular enxertada (± 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 morfologicamente 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 (± 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 (±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 sobrevida dos animais após cada tipo de intervenção cirúrgica e as características/dificuldades em cada um dos procedimentos.

Tabela 4. 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 (± 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 significante (Figura 24). 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.

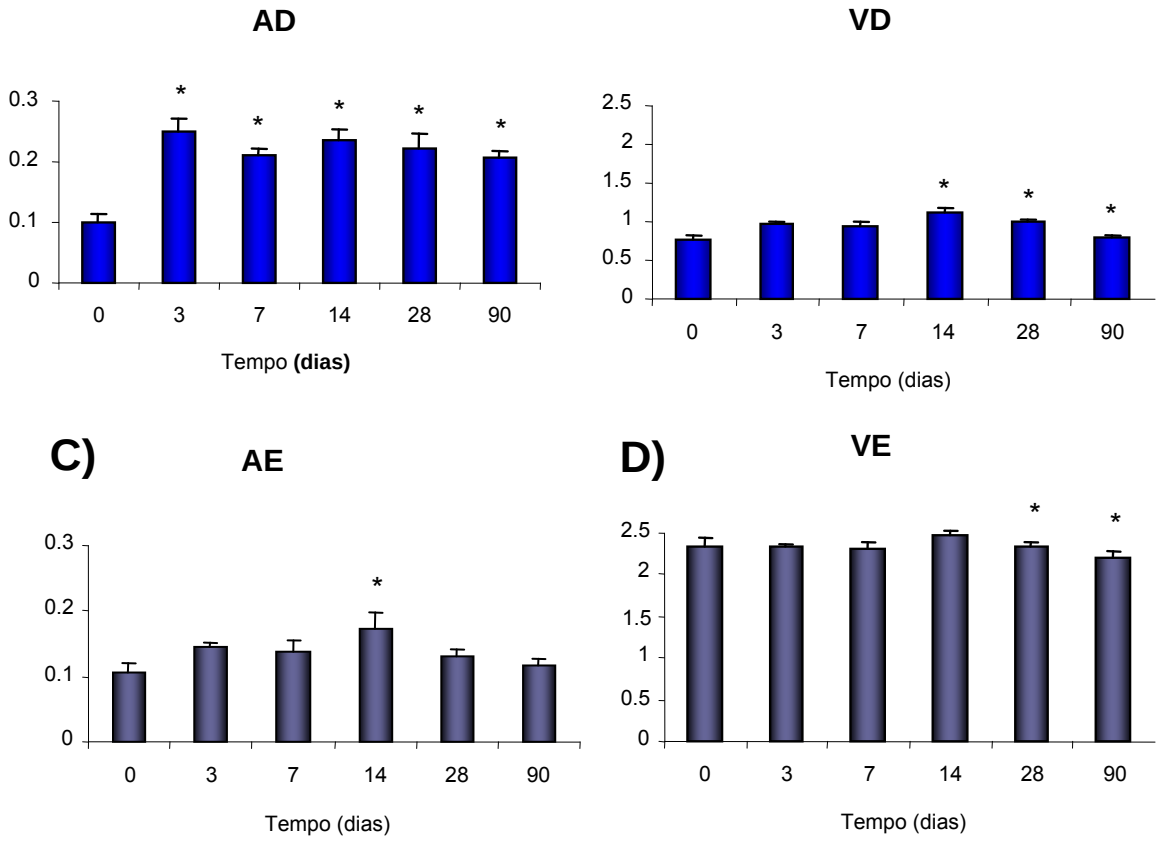

Figura 24. Quantificação das câmaras cardíacas divididas em **A)** átrio direito, **B)** átrio direito, **C)** ventrículo direito e **D)** ventrículo esquerdo em relação ao tempo, normalizados pelo peso corporal de cada animal.

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 IL1β 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 IL1β 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 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 3um de espessura a partir de 400um 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 25 e 26). A principio, este seria um indicativo de que a IL-1β, 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.

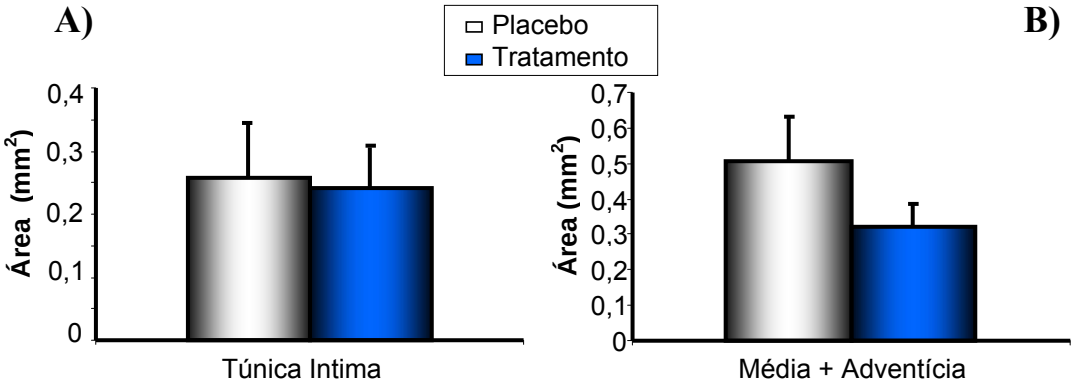

Figura 25. Quantificação das A) túnicas intima e B) túnicas media+adventícia da veia jugular de rato arterializada por 14 dias.Gráfico das medidas de área em **A)** túnica intima e **B)** media e adventícia.

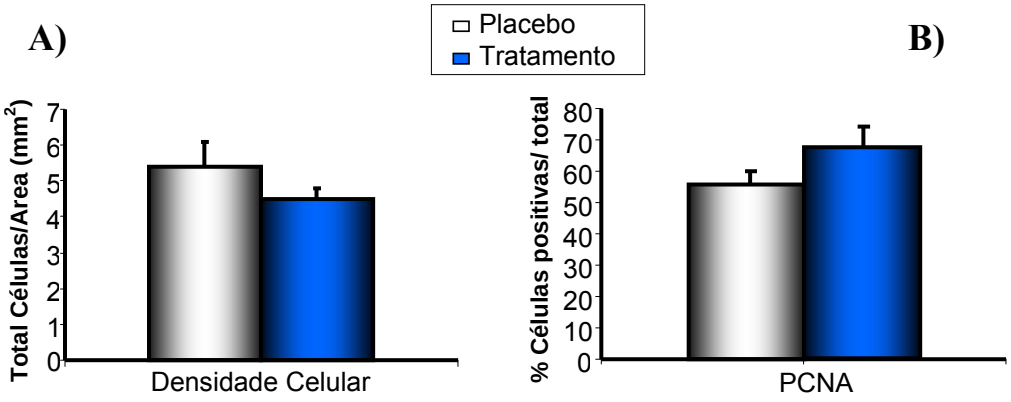

Figura 26. Gráfico das medidas de **A)** densidade e **B)** proliferação celular.

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

HC

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 IV.2, letra "m")*

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 X RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como conseqüência 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 sobrará 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.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Prof. Dr. Protásio Lemos da Luz InCor – Av. Dr. Éneas de Carvalho Aguiar, 44 AB – 3069.5352/ 5447

Dr. Alexandre Miguel Benjó Idem

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 200 .

_____ _____

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO
(Resolução Conselho Nacional de Saúde 196, de 10 outubro 1996)

1. Este termo conterá o registro das informações que o pesquisador fornecerá ao sujeito da pesquisa, em linguagem clara e accessível, evitando-se vocábulos técnicos não compatíveis com o grau de conhecimento do interlocutor.

2. A avaliação do grau de risco deve ser minuciosa, levando em conta qualquer possibilidade de intervenção e de dano à integridade física do sujeito da pesquisa.

3. O formulário poderá ser preenchido em letra de forma legível, datilografia ou meios eletrônicos.

4. Este termo deverá ser elaborado em duas vias, ficando uma via em poder do paciente ou seu representante legal e outra deverá ser juntada ao prontuário do paciente.

5. A via do Termo de Consentimento Pós-Informação submetida à análise da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa -CAPPesq deverá ser idêntica àquela que será fornecida ao sujeito da pesquisa.

11. 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-1β and Signaling of Interleukin-1β 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., Józkowicz, 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., Lespèrance, 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., Berceli, 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-1β 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-1β 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. l., 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 extracelular matrix alterations during neoíntima 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.