

Rapamicina em Combinação com α -Cianoacrilato Contribui à Inibição de Hiperplasia Intimal em Modelos em Ratos

Rapamycin Combined with α -Cyanoacrylate Contributes to Inhibiting Intimal Hyperplasia in Rat Models

Tianshu-Chu, Congrong-Gao, Zhiwei-zhao, Fei-Ling, Ayu-Sun, Yuanbiao-Zheng, Jing-Cao, Jianjun Ge^{ID}

Anhui Medical University, Hefei – China

Resumo

Fundamento: Reestenose de enxertos venosos tem um impacto adverso na circulação de pontagens e no prognóstico de pacientes após a cirurgia de revascularização miocárdica.

Objetivos: Nós utilizamos α -cianoacrilato (α -CA) como suporte extravascular, rapamicina/sirolimus (RPM) como aplicação local e a combinação dos dois (α -CA-RPM) em modelos de enxerto venoso autógeno em ratos para estimular mudança no enxerto venoso. O objetivo do nosso estudo foi observar o efeito de α -CA, RPM e α -CA-RPM na hiperplasia venosa.

Métodos: Cinquenta ratos Sprague Dawley (SD) saudáveis foram randomizados nos 5 grupos seguintes: sham, controle, α -CA, RPM e α -CA-RPM. O procedimento operacional descrito subsequentemente foi utilizado para construir modelos de enxertos da veia jugular na artéria carótida em ratos, em um lado. O nível de endotelina-1 (ET-1) foi determinado por ensaio de imun absorção enzimática (ELISA). As veias enxertadas foram observadas a olho nu 4 semanas após; as veias frescas foram observadas via microscópio e software de processamento de imagem com coloração hematoxilina-eosina (HE) e imuno-histoquímica depois de serem fixadas e armazenadas; α -actina do músculo liso (α SMA) e o fator de von Willebrand (vWF) foram medidos com reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa (RT-PCR). Realizaram-se as comparações com análise de variância de fator único (ANOVA) e o teste de diferença mínima significativa (LSD) de Fisher, com $p < 0,05$ sendo considerado estatisticamente significativo.

Resultados: Nós achamos que a espessura intimal nos grupos α -CA, RPM e α -CA-RPM era menor que no grupo controle ($p < 0,01$) e a espessura no grupo α -CA-RPM era notavelmente menor que nos grupos α -CA e RPM ($p < 0,05$).

Conclusão: A combinação de RPM e α -CA contribui à inibição de hiperplasia em modelos em ratos e é mais efetivo para patência vascular que uso individual de α -CA ou RPM. (Arq Bras Cardiol. 2019; 112(1):3-10)

Palavras-chave: Revascularização Miocárdica/cirurgia; Cianoacrilatos; Sirolimus; Hiperplasia; Oclusão de Enxerto Vascular; Grau de Desobstrução Vascular; Ratos.

Abstract

Background: Vein graft restenosis has an adverse impact on bridge vessel circulation and patient prognosis after coronary artery bypass grafting.

Objectives: We used the extravascular supporter α -cyanoacrylate (α -CA), the local application rapamycin/sirolimus (RPM), and a combination of the two (α -CA-RPM) in rat models of autogenous vein graft to stimulate vein graft change. The aim of our study was to observe the effect of α -CA, RPM, and α -CA-RPM on vein hyperplasia.

Methods: Fifty healthy Sprague Dawley (SD) rats were randomized into the following 5 groups: sham, control, α -CA, RPM, and α -CA-RPM. Operating procedure as subsequently described was used to build models of grafted rat jugular vein on carotid artery on one side. The level of endothelin-1 (ET-1) was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Grafted veins were observed via naked eye 4 weeks later; fresh veins were observed via microscope and image-processing software in hematoxylin-eosin (HE) staining and immunohistochemistry after having been fixed and stored" (i.e. First they were fixed and stored, and second they were observed); α -Smooth Muscle Actin (α SMA) and von Willebrand factor (vWF) were measured with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Comparisons were made with single-factor analysis of variance and Fisher's least significant difference test, with $p < 0.05$ considered significant.

Results: We found that intimal thickness of the α -CA, RPM, and α -CA-RPM groups was lower than that of the control group ($p < 0.01$), and the thickness of the α -CA-RPM group was notably lower than that of the α -CA and RPM groups ($p < 0.05$).

Conclusion: RPM combined with α -CA contributes to inhibiting intimal hyperplasia in rat models and is more effective for vascular patency than individual use of either α -CA or RPM. (Arq Bras Cardiol. 2019; 112(1):3-10)

Keywords: Myocardial Revascularization/surgery; Cyanocrylates; Sirolimus; Hyperplasia; Graft Occlusion, Vascular; Vascular Patency; Rats.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Jianjun Ge •

17 # Lujiang Road, Hefei 230001, P.R.China

E-mail: SLGejianjun@outlook.com

Artigo recebido em 06/11/2017, revisado em 26/06/2018, aceito em 23/07/2018

DOI: 10.5935/abc.20180247

Introdução

A cirurgia de revascularização miocárdica (CRM) é uma das principais terapias para doença coronariana. Porém, 40% dos vasos de pontagem estão totalmente obstruídos e 30% do fluxo sanguíneo vascular é reduzido após a CRM, o que seriamente impacta a sobrevida e o prognóstico do paciente.^{1,2} Mecanismos de reestenose incluem trombose, hiperplasia intimal e aterosclerose. A imigração de células endoteliais e células musculares lisas vasculares é vital para a hiperplasia intimal, que é a principal causa de reestenose.³

Embora os fármacos que inibem a citocinina e regulam o ciclo celular possam contribuir à inibição da hiperplasia intimal, os efeitos colaterais sistêmicos são prejudiciais para os pacientes. Portanto, a aplicação local é muito importante. A rapamicina (sirolimus) é amplamente utilizada para a anti-rejeição após operações de transplante, e os *stents* farmacológicos são amplamente utilizados em artérias coronárias. Pesquisadores verificaram que a aplicação de rapamicina em veias enxertadas é eficaz na inibição da hiperplasia intimal, pois inibe a proliferação e promove a apoptose de células musculares lisas.⁴

Em 1963, Parsonnet e seus colegas observaram que suporte perivenoso era eficaz para a patência vascular.⁵ Subsequentemente, pesquisadores clínicos descobriram que o suporte perivenoso pode aumentar as taxas de patência pela redução da hiperplasia intimal nas veias enxertadas. O α -CA, que é líquido à temperatura ambiente, é inofensivo para o corpo humano. O tempo de degradação é de 1 a 3 meses, dependendo da dosagem. O α -CA é usado em cirurgia para tratar sangramentos e suturar feridas.⁶

Usualmente, o α -CA e a RPM são utilizados como suporte perivenoso e aplicação local, respectivamente. Investigamos de forma inovadora o processo fisiopatológico da hiperplasia da neointima em veias enxertadas após CRM usando modelos de enxerto venoso autógeno em ratos, com o intuito de encontrar novos métodos para inibir a hiperplasia intimal.

Métodos

Reagente e método

O α -CA (99% n-octil- α -cianoacrilato + n-butil- α -cianoacrilato) foi adquirido da Beijing Fuaili Science and Technology Development Co. (Beijing, China). A RPM foi adquirida da Selleck Company. Dissolvemos 8 mg de RPM em 1 ml de α -CA (obtidos com pipeta) em um tubo Eppendorf estéril. Após isso, utilizou-se um agitador magnético para misturá-los, obtendo o α -CA-RPM de 8mg/ml, que foi armazenado sob refrigeração de 2 a 8°C. RPM era hidrossolvente e foi preparado pelo mesmo método.⁷

Modelos e grupos

Cinquenta ratos SD (fornecidos pelo Anhui Lab Animal Research Center e identificados pelo comitê de ética médica da Anhui Medical University), machos e fêmeas, entre 10 e 12 semanas de idade, com peso entre 220-280 g, foram randomizados (desenho completamente randomizado) em

5 grupos, cada grupo contendo 10 ratos, e alimentados durante 4 semanas após a operação. O procedimento operacional e o tamanho da amostra foram determinados de acordo com experimentos pilotos e estudos anteriores, conforme descrito abaixo.

Procedimento operacional: utilizou-se uma injeção intraperitoneal de 10% chloral hydrate para anestésiar os ratos. A heparinização foi induzida por uma injeção de heparina (700 UI/Kg) na veia caudal. Uma incisão vertical de aproximadamente 1 cm foi feita no meio do pescoço (desviada para o lado da operação) e as veias foram dissociadas em um lado. Epitoca de 1-2 mm foram obtidas com uma agulha de punção arterial 20G vermelha (BD Company), usada como cânula. A artéria carótida foi isolada até os ramos. Em seguida, duas linhas de sutura e hemoclips foram colocados em ambas as extremidades da artéria para bloquear o fluxo sanguíneo. O meio da artéria foi isolado e cuidadosamente virado para 1-1,2 mm acima da cânula. Utilizou-se uma sutura de seda 6/0 para ligar e fixar a veia para isolá-la das artérias; desta maneira, foi possível abrir os grampos vasculares. Verificamos que o pulso das veias enxertadas era normal e sem sangramento e em seguida suturamos a incisão. Diariamente, verificamos o estado vital e as incisões de todos os ratos. Mantivemos o ambiente fresco, trocamos os ninhos regularmente e demos forragem e água suficiente. Três dias após a operação, cada rato começou a receber uma injeção intramuscular de 400.000 IU de penicilina, diariamente.

Grupo sham: apenas simulou-se o processo de operação. As veias jugulares foram dissociadas e os vasos colaterais foram ligados, sem divisão ou transplante; Grupo controle: enxerto arteriovenoso jugular no mesmo lado; Grupo α -CA: enxerto arteriovenoso jugular e aplicação de cola α -CA nas veias enxertadas; Grupo RPM: enxerto arteriovenoso jugular e aplicação de RPM nas veias enxertadas; Grupo α -CA-RPM: enxerto arteriovenoso jugular no mesmo lado e aplicação de α -CA-RPM nas veias enxertadas.

Coleta de amostras

Amostras de sangue foram coletadas no pré-operatório às 0 h e no pós-operatório às 12 h, 36 h e 4 semanas após a operação. O soro foi obtido por centrifugação e foi armazenado a -80°C até a análise de citocinas. Quatro semanas depois, coletamos uma amostra de veia de cada grupo. Os ratos foram completamente anestesiados, fixados na mesa de operação, heparinizados como descrito anteriormente e operados da mesma maneira pelo mesmo caminho. Observamos as formas e a circulação das veias enxertadas, dos vasos com ligadura e dos vasos isolados nas duas extremidades das cânulas; em seguida, removemos as veias intactas e frescas e lavamos os lúmenes completamente com solução salina normal. As amostras com coloração HE e imuno-histoquímica foram colocadas em microtubos cheios de paraformaldeído e as amostras com RT-PCR foram colocadas em microtubos cheios de reagentes de RNA-EZ e mantidas na geladeira a -80°C. Os ratos foram sacrificados pelo método de deslocamento cervical e adequadamente manipulados.

Ensaio de imunoabsorção enzimática para ET-1

ET-1 foi determinado com kits ELISA (R&D, USA) utilizando 50 μ l de soro para o ensaio. Foram realizadas 3 medidas para cada amostra de sangue e a placa de ELISA foi lida a 450 nm em um leitor de placas.

Exame histológico do tecido enxertado

As veias enxertadas foram imersas em formalina e cortadas em seções de 4 mm. Subsequentemente, realizou-se coloração hematoxilina-eosina (HE) utilizando um kit de coloração hematoxilina e eosina (Beyotime Biotechnology, Shang Hai, China). O sistema de aquisição de imagem do microscópio Olympus foi utilizado para obter imagens de seção (lente objetiva 100 \times) e medir a espessura da íntima. As medidas e a análise de dados foram realizadas por 2 pesquisadores independentes. As seções foram selecionadas aleatoriamente de veias enxertadas e não-enxertadas; em seguida medimos 16 pontos de espessura e calculamos a média. Três seções foram selecionadas e medidas de cada rato. Em seguida, calculamos a espessura da íntima.

Determinação do índice de proliferação

As seções de tecido foram incubadas com o kit de análise imuno-histoquímica para o antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) a 4°C durante uma noite. Após a lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS) (DAKO, Glostrup, Dinamarca) e incubação com o anticorpo secundário, realizou-se a coloração com DAB. As seções de tecido foram desidratadas e instaladas em lâminas. Todas as imagens (lente objetiva 200 \times) foram captadas pelo sistema de aquisição de imagem do microscópio Olympus e pela SPOT Digital Camera (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, EUA). Células positivas para PCNA foram contadas na íntima. Utilizou-se um total de 10 vistas de observação para calcular a porcentagem média de células positivas para PCNA para cada rato.

RT-PCR

O RNA total dos tecidos dos vasos foi isolado com o Kit RNeasy (Life Technology, USA). A transcrição reversa foi utilizada para obter cDNA a partir do RNA por meio do Kit de Transcrição Reversa de RNA (Promega, EUA). Um total de 2 μ g de RNA e 1 μ l de primer randômico foram desnaturados a 70°C durante 10 min e anelados a 4°C durante 10 min. Em seguida, 2 μ l de tampão 10 \times , 2 μ l de MgCl₂ (20,8 mol/l) e 1 μ l de transcriptase reversa foram adicionados ao sistema de reação. Acrescentou-se água duplamente destilada (ddH₂O) para levar o volume a 20 μ l. As condições para síntese do cDNA eram de 37°C durante 1 h e 4°C durante 10 min. O PCR também continha 10 μ l de 2 \times SYBR Mixture (Takara, Japão), 7 μ l de ddH₂O, 1 μ l de forward primer e 1 μ l de reverse primer. As condições de PCR eram de 95°C durante 5 min, 95°C durante 15 s, 60°C durante 60 s e 40 ciclos. As sequências dos primers utilizados para RT-PCR eram as seguintes: Forward, 5'-CATCTCCGTGGTCTGAAGT-3' e reverse, 5'-GGCAAGGAAACGTCTAGTG-3' para fator de von Willebrand; forward, 5'-CAGAGTCCAGACAATACCAG-3' e reverse, 5'-GACCCAGATTATGTTTGAGACC para α -actina do

músculo liso; e forward, 5'-ACATGAATGACCTCGTCTCTGA-3' e reverse, 5'-CCTCTTCTGCCCTCTCC-3' para GAPDH. O instrumento para PCR quantitativo em tempo real foi adquirido de ABI (EUA).

Análise estatística

Todos os dados foram analisados com o software de análise estatística SPSS 17.0. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. Visto que os dados mostraram uma distribuição normal, a comparação entre os vários grupos foi analisada por análise de variância de fator único (ANOVA) e a comparação entre dois grupos foi realizada pelo teste de diferença mínima significativa (LSD) de Fisher. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Os ratos sobreviveram bem 4 semanas após a operação

O procedimento de operação descrito anteriormente foi utilizado para construir modelos de enxerto da veia jugular na artéria carótida em ratos, em um lado. No pós-operatório, as veias transplantadas estavam bem preenchidas e os vasos sanguíneos batiam bem; a cola estava uniformemente espalhada na superfície das veias dos grupos α -CA e α -CA-RPM. O estado vital e as incisões dos ratos foram verificados todos os dias. Subsequentemente, descobrimos que um rato no grupo RPM e um no grupo α -CA tinham morrido de temperatura baixa 2 semanas depois da operação; os outros ratos sobreviveram e recuperaram-se bem, com pulso forte nas veias enxertadas. Os ratos foram sacrificados 4 semanas após a cirurgia; notavelmente, apenas 2 ratos apresentaram oclusão venosa, um no grupo α -CA e um no grupo RPM. Correspondentemente, o fluxo sanguíneo nas outras veias enxertadas era patente. As veias no grupo sham tinham se expandido levemente. Além disso, as veias do grupo controle tinham novo tecido de granulação, tubos mais espessos, edema e rigidez leve; porém, as veias dos grupos α -CA, RPM e α -CA-RPM tinham poucos tecidos novos que eram facilmente separados, sem expansão óbvia e claramente divididos dos tecidos ao redor e a cola não estava completamente degradada (Figura 1).

α -CA-RPM reduziu espessamento intimal dos enxertos venosos

Com a finalidade de observarmos os impactos que a intervenção de cada grupo teve na hiperplasia intimal, realizamos coloração das veias enxertadas 4 semanas após a operação. Após isso, utilizamos um sistema de análise de imagens de computador para analisar hiperplasia intimal. Isto revelou que a íntima do grupo controle era notavelmente mais espessa que a dos grupos α -CA, RPM e α -CA-RPM; a diferença era estatisticamente significativa ($91,3 \pm 3,9$, $133,6 \pm 8,0$, $50,6 \pm 5,4$ vs. $233,6 \pm 29,1$ μ m; $p < 0,01$; Figura 2B, C, D, E e F); a íntima do grupo RPM era mais espessa do que a do grupo α -CA; a diferença era estatisticamente significativa ($133,6 \pm 8,0$ vs. $91,3 \pm 3,9$ μ m; $p < 0,05$; Figura 2C, D e F); a íntima dos grupos α -CA e RPM era mais espessa do que a do grupo α -CA-RPM; a diferença era estatisticamente significativa ($50,6 \pm 5,4$ vs. $91,3 \pm 3,9$ μ m, $133,6 \pm 8,0$ μ m; $p < 0,05$; Figura 2 C, D, E e F).

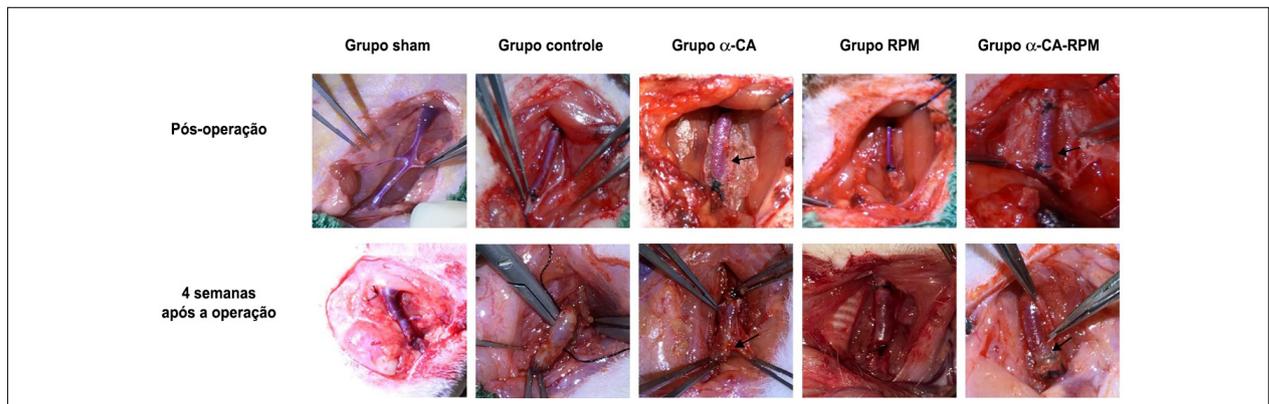


Figura 1 – Os ratos sobreviveram bem 4 semanas após a operação. O procedimento de operação descrito anteriormente foi utilizado para construir modelos de enxertos da veia jugular na artéria carótida em ratos, em um lado. Após a operação, as veias transplantadas estavam bem preenchidas e os vasos sanguíneos batiam bem; a cola estava uniformemente espalhada na superfície das veias dos grupos α -CA e α -CA-RPM (flecha). Quatro semanas após a operação, as veias no grupo sham tinham se expandido levemente; as veias no grupo controle tinham novo tecido de granulação, tubos mais espessos, edema e rigidez leve; no grupo α -CA havia poucos tecidos novos que eram facilmente separados, sem expansão óbvia e claramente divididos dos tecidos ao redor e a cola não estava completamente degradada (flecha); no grupo RPM os tecidos estavam claramente divididos dos tecidos ao redor e eram frescos e sem expansão óbvia. A forma geral do grupo α -CA-RPM era similar à do grupo α -CA.

Além disso, conforme descrito na Figura 3, os nossos resultados da coloração imuno-histoquímica para PCNA demonstram que os grupos controle, α -CA, RPM e α -CA-RPM tinham um índice de proliferação significativamente mais alto que o grupo sham ($p < 0,01$; Figura 3A, B, C, D, E e F) e a percentagem de células positivas para PCNA nos grupos α -CA, RPM e α -CA-RPM era significativamente menor que no grupo controle ($p < 0,01$; Figura 3B, C, D, E e F). Ademais, é notável que o índice de proliferação no grupo α -CA-RPM era marcadamente menor que nos grupos α -CA e RPM ($p < 0,01$; Figura 3C, D, E e F). Em conjunto, os nossos resultados demonstram que α -CA, RPM e α -CA-RPM inibem hiperplasia intimal em enxertos venosos; o efeito de α -CA-RPM é mais forte do de α -CA ou RPM.

α -CA-RPM diminuiu hiperplasia intimal e respostas inflamatórias

Com a finalidade de estudar o mecanismo pelo qual os três métodos de intervenção inibem hiperplasia intimal mais profundamente, nós examinamos os valores de α SMA e vWF nas veias enxertadas 4 semanas após a cirurgia. Os valores de α SMA nos grupos α -CA, RPM e α -CA-RPM eram muito menores que no grupo controle, conforme detectado por RT-PCR ($p < 0,01$; Figura 4A). Os valores de α SMA no grupo α -CA-RPM eram menores que nos grupos α -CA e RPM ($p < 0,01$; Figura 4A). Encontraram-se resultados similares nos valores de vWF no grupo α -CA-RPM ($p < 0,01$; Figura 4B). Este resultado verificou que a inibição por α -CA, RPM e α -CA-RPM pode reduzir hiperplasia intimal por bloquearem a sobre-expressão de α SMA e vWF. Notamos que os níveis de ET-1 aumentaram gradualmente nos grupos controle, α -CA, RPM e α -CA-RPM 36 horas após a operação; os dos grupos controle, α -CA e RPM ainda estavam altos 4 semanas após a operação e os do grupo e α -CA-RPM tinham basicamente voltado ao normal. Os níveis de ET-1 no grupo controle eram significativamente mais altos que os dos grupos α -CA, RPM e α -CA-RPM 36 horas e 4 semanas após a operação ($96,1 \pm 7,9$ ng/l vs. $84,0 \pm 10,9$ ng/l,

$79,5 \pm 5,7$ ng/l e $72,7 \pm 9,9$ ng/l; $99,7 \pm 7,7$ ng/l vs. $87,1 \pm 13,3$ ng/l, $65,4 \pm 23,4$ ng/l e $43,7 \pm 20,1$ ng/l; $p < 0,05$, respectivamente). Adicionalmente, 4 semanas após a operação, os níveis de ET-1 no grupo α -CA-RPM eram significativamente menores que nos grupos α -CA, RPM e controle ($43,7 \pm 20,1$ ng/l vs. $87,1 \pm 13,3$ ng/l, $65,4 \pm 23,4$ ng/l e $99,5 \pm 7,7$ ng/l; $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 4C). Estes resultados indicam que α -CA, RPM e α -CA-RPM parecem reduzir respostas inflamatórias e que α -CA-RPM é mais efetivo.

Discussão

O achado principal do nosso estudo é que a aplicação de α -CA, RPM ou α -CA-RPM pode melhorar a patência de modelos de enxerto venoso em ratos por meio da inibição de hiperplasia intimal.⁸ Mais importante, o uso de RPM em combinação com α -CA é mais efetivo que o uso isolado de α -CA ou RPM.

O processo complicado de remodelação de vasos conduz à reestenose de enxertos venosos, mas o mecanismo exato não é explícito. Estudos têm mostrado que a reestenose está relacionada à disfunção de células endoteliais da íntima, à proliferação, à migração de células musculares lisas vasculares, fibroblastos adventícios, reações inflamatórias, força de cisalhamento e mudanças hemodinâmicas.^{9,10} O processo patológico de reestenose de um pontagem pode incluir trombose precoce, hiperplasia intimal e aterosclerose; a hiperplasia intimal é a causa mais importante. Quando se separa, liga, divide, transplanta e revasculariza pontagens, fatores como agregação de plaquetas e neutrófilos, liberação de citocinas e quimiocinas, ativação da via de transdução e reação enzimática podem desencadear hiperplasia de células musculares lisas vasculares e acumulação de células endoteliais. Todos esses fatores podem resultar em hiperplasia intimal e a reestenose dos vasos enxertados decorre em sequência.^{11,12}

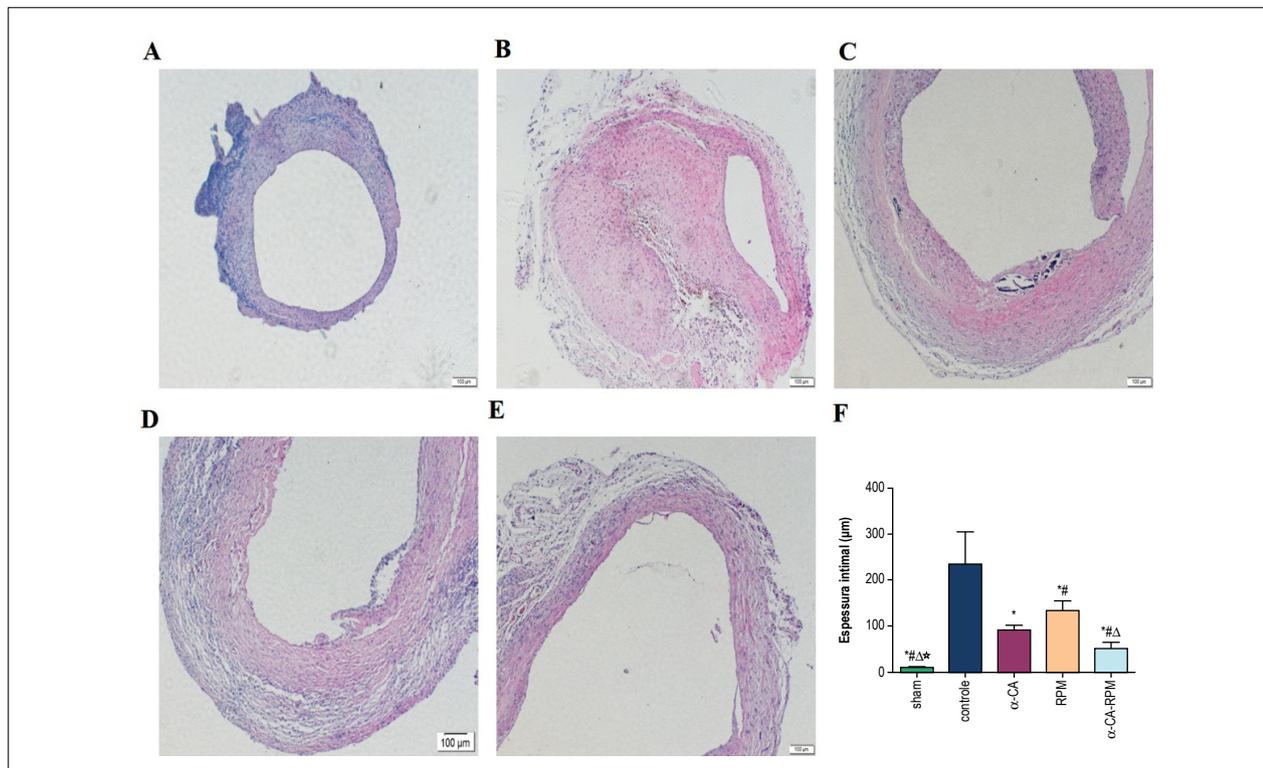


Figura 2 – α -CA-RPM reduziu espessamento intimal dos enxertos venosos. Quatro semanas após a operação, os tecidos foram coletados, fixados em formalina, cortados em seções de 4 μ m e coloridos com HE. Imagens (lente objetiva 100 \times) foram obtidas e analisadas com o sistema micro-imagem de Olympus. Os ratos foram divididos em 5 grupos: grupo sham (A), grupo controle (B), grupo α -CA (C), grupo RPM (D) e grupo α -CA-RPM (E). (F) representa o gráfico estatístico a espessura intimal de cada grupo. A íntima do grupo controle era notavelmente mais espessa que a dos grupos α -CA, RPM e α -CA-RPM; a diferença era estatisticamente significativa ($91,3 \pm 3,9$, $133,6 \pm 8,0$, $50,6 \pm 5,4$ vs., $233,6 \pm 29,1$ μ m; $p < 0,01$); a íntima do grupo RPM era mais espessa da do grupo α -CA; a diferença era estatisticamente significativa ($133,6 \pm 8,0$ vs. $91,3 \pm 3,9$ μ m; $p < 0,05$); a íntima dos grupos α -CA e RPM era mais espessa da do grupo α -CA-RPM; a diferença era estatisticamente significativa ($50,6 \pm 5,4$ vs. $91,3 \pm 3,9$ μ m, $133,6 \pm 8,0$ μ m; $p < 0,05$). * Havia diferenças óbvias entre o grupo controle e os demais grupos, $p < 0,05$. # Havia diferenças óbvias entre o grupo α -CA e os demais grupos, $p < 0,05$. Δ Havia diferenças óbvias entre o grupo RPM e os demais grupos, $p < 0,05$. * Havia diferenças óbvias entre o grupo α -CA-RPM e os demais grupos, $p < 0,05$.

Em 1963, Parsonnet e seus colegas indicaram, pela primeira vez, que suportes extravasculares podiam melhorar as taxas de patência das veias enxertadas.⁵ Numerosos ensaios básicos e clínicos têm comprovado que suportes extravasculares podem inibir hiperplasia intimal e melhorar as taxas de patência. Quatro suportes extravasculares têm sido amplamente utilizados em ensaios básicos e clínicos, i.e. stent extravascular de nitinol, stent extravascular polimérico, cola de fibrina e α -CA. Reconhece-se que α -CA pode não apenas inibir a expansão dos vasos após o transplante mas também estimular a migração das células musculares lisas vasculares para a membrana externa vascular.^{13,14} Estimulados por α -CA, muitos neutrófilos e monócitos agregam à adventícia, especialmente fagócitos mononucleares que podem liberar quantidades de fatores quimiotáticos para atrair a imigração e colonização de células musculares lisas vasculares e fibroblastos.¹⁵ Uma série de mudanças mencionadas acima ativarão vários fatores anti-ateroscleróticos: NO, PGI₂, cAMP e cGMP. Eles também podem diminuir colesterol intimal e inibir fatores pro-ateroscleróticos.¹⁶ Os resultados do nosso experimento revelaram que as veias do grupo α -CA tinham poucos tecidos frescos que eram facilmente separados, sem expansão óbvia e claramente divididos dos tecidos ao redor 4 semanas após a operação. A cola não estava completamente degradada e

a íntima do grupo α -CA era menos espessa que a do grupo controle. Além disso, a porcentagem de células positivas para PCNA era significativamente menor que no grupo controle. Sobretudo, como suporte extravascular α -CA foi capaz de inibir hiperplasia intimal e melhorar a taxa de patência.

A proliferação, imigração e secreção de células musculares lisas vasculares são fundamentais à hiperplasia intimal, que contribui à reestenose de enxertos venosos. Embora certos fármacos possam ser efetivos em inibir a hiperplasia intimal por meio da inibição da citocinina e a regulação do ciclo celular, reações tóxicas severas e efeitos colaterais limitam o seu uso extensivo; consequentemente, a aplicação local torna-se particularmente significativa. A RPM, colchicina e outros fármacos são utilizados localmente em veias enxertadas. Após a anastomose, o fármaco é aplicado uniformemente nas veias enxertadas. A RPM pode acelerar a apoptose de células musculares lisas vasculares por meio da inibição da transformação das células da fase G1 à fase S, deste modo suprimindo a proliferação e imigração das células musculares lisas vasculares. Adicionalmente, RPM protege a função das células endoteliais e reduz a liberação de peptídeo vasoativo quando as células endoteliais são lesadas.¹⁷⁻¹⁹ Além disso, a RPM também pode inibir a diferenciação, proliferação

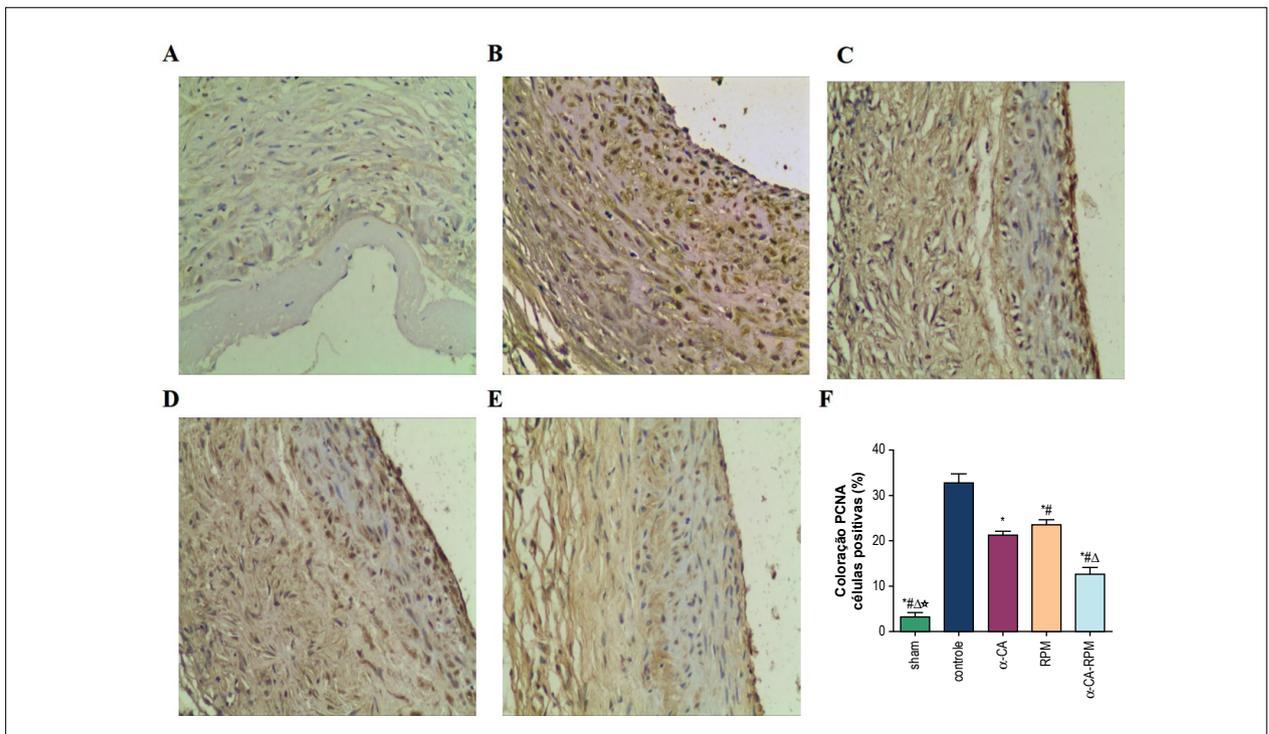


Figura 3 – α -CA-RPM diminuiu o índice de proliferação do enxerto venoso. Quatro semanas após a operação, os tecidos foram coletados, fixados em formalina, cortados em seções de 4 μ m e coloridos com o anticorpo primário anti-PCNA. Imagens (lente objetiva 200 \times) foram obtidas e analisadas com o sistema micro-imagem de Olympus. Os ratos foram divididos em 5 grupos: grupo sham (A), grupo controle (B), grupo α -CA (C), grupo RPM (D) e grupo α -CA-RPM (E). (F) representa o gráfico estatístico do índice de proliferação de PCNA de cada grupo. * Havia diferenças óbvias entre o grupo controle e os demais grupos, $p < 0,01$. # Havia diferenças óbvias entre o grupo α -CA e os demais grupos, $p < 0,01$. Δ Havia diferenças óbvias entre o grupo RPM e os demais grupos, $p < 0,01$. * Havia diferenças óbvias entre o grupo α -CA-RPM e os demais grupos, $p < 0,01$.

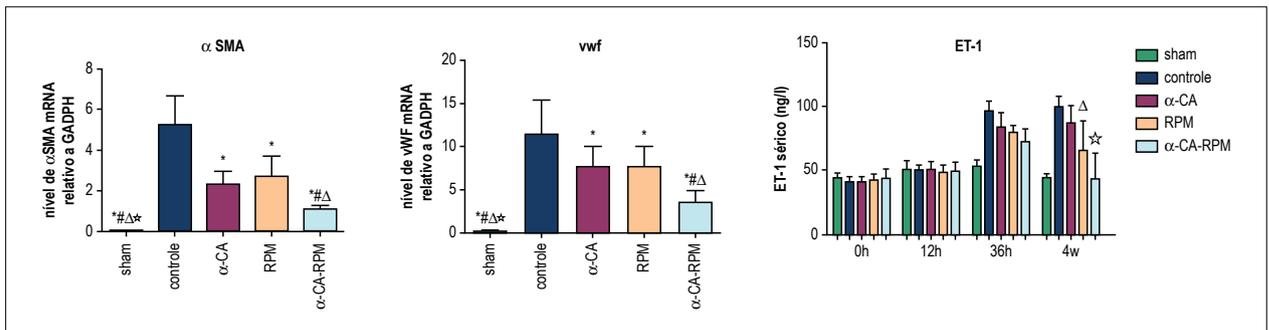


Figura 4 – α -CA-RPM diminuiu a expressão de α SMA e vWF e respostas inflamatórias. Quatro semanas após a operação, realizou-se RT-PCR para detectar α SMA e vWF nas veias enxertadas. (A) Os valores de α SMA nos grupos α -CA, RPM e α -CA-RPM eram muito menores que no grupo controle, conforme detectado por RT-PCR. Os valores de α SMA no grupo α -CA-RPM eram menores que nos grupos α -CA e RPM ($p < 0,01$). (B) Encontraram-se resultados similares nos valores de vWF no grupo α -CA-RPM ($p < 0,01$). (C) Mostram-se os níveis séricos de ET-1 para cada grupo em diversos momentos. Os níveis de ET-1 o grupo controle eram significativamente mais altos que os dos grupos α -CA, RPM e α -CA-RPM 36 horas e 4 semanas após a operação ($96,1 \pm 7,9$ ng/l vs. $84,0 \pm 10,9$ ng/l, $79,5 \pm 5,7$ ng/l e $72,7 \pm 9,9$ ng/l; $99,7 \pm 7,7$ ng/l vs. $87,1 \pm 13,3$ ng/l, $65,4 \pm 23,4$ ng/l e $43,7 \pm 20,1$ ng/l; $p < 0,05$, respectivamente). Adicionalmente, 4 semanas após a operação, os níveis de ET-1 no grupo α -CA-RPM eram significativamente menores que nos grupos α -CA, RPM e controle ($43,7 \pm 20,1$ ng/l vs. $87,1 \pm 13,3$ ng/l, $65,4 \pm 23,4$ ng/l e $99,5 \pm 7,7$ ng/l; $p < 0,05$, respectivamente). * Havia diferenças óbvias entre o grupo α -CA e os demais grupos, $p < 0,01$. # Havia diferenças óbvias entre o grupo α -CA e os grupos sham, controle e α -CA-RPM, $p < 0,01$. Δ Havia diferenças óbvias entre o grupo RPM e os grupos sham, controle e α -CA-RPM, $p < 0,01$. * Havia diferenças óbvias entre o grupo α -CA-RPM e os demais grupos, $p < 0,01$.

e migração de células progenitoras endoteliais (CPE) e reduz a expressão de NOS-mRNA em CPE.^{20,21} Os nossos resultados verificaram que as veias no grupo RPM claramente divididos dos tecidos do entorno eram frescas e não tinham se expandido. Ademais, a íntima do grupo RPM era menos espessa do que a do grupo controle e a percentagem de células

positivas para PCNA era marcadamente menor que no grupo controle. Em resumo, RPM pode inibir a hiperplasia intimal e melhorar a taxa de patência.

O presente estudo visou experimentar a combinação de um suporte extravascular e uma aplicação local. Nós escolhemos α -CA como o suporte extravascular, RPM como a aplicação

local e α -CA-RPM como a combinação. Utilizou-se α -CA-RPM em modelos de enxerto venoso autólogo em ratos para estimular o processo patofisiológico após CRM. É de interesse que a percentagem de células positivas para PCNA no grupo α -CA-RPM era marcadamente menor que nos grupos controle, α -CA e RPM, o que indica que α -CA-RPM era mais efetivo em inibir a hiperplasia intimal que α -CA ou RPM, isoladamente. Nós concluímos que α -CA-RPM pode combinar a efetividade de suportes extravasculares e aplicações locais e que inibe a hiperplasia intimal melhor. Entretanto, α -CA é um veículo ideal para a formulação de um fármaco com liberação controlada a longo prazo que circunda o enxerto venoso estavelmente de maneira que a RPM seja liberada lentamente e sem desperdício.

A endotelina-1 (ET-1) tem sido implicada na patogênese da reestenose e a hipertrofia vascular por meio do aumento da agregação de plaquetas e neutrófilos, a liberação de citocinas e quimiocinas, o acúmulo de células endoteliais e a promoção da migração de células musculares lisas vasculares em direção à camada intimal.²² Os nossos resultados indicam que α -CA, RPM e α -CA-RPM podem estabilizar a função celular endotelial e diminuir a liberação de ET-1 para inibir a hiperplasia intimal. Uma antagonista dos receptores de endotelina A/B contribuiu para a redução da hiperplasia intimal em uma cultura de órgãos de veias safenas humanas e impediu o desenvolvimento neointimal da angioplastia coronariana em porcos, o qual está de acordo com o nosso experimento.^{23,24} A α SMA é a proteína específica das células musculares lisas vasculares e a sua expressão pode refletir a hiperplasia das células musculares lisas vasculares. Examinamos o valor de α SMA nas veias enxertadas com RT-PCR e verificamos que os valores nos grupos α -CA, RPM e α -CA-RPM eram menores que no grupo controle. Notavelmente, o valor do grupo α -CA-RPM era menor que nos grupos α -CA e RPM. Um estudo no qual o componente de α SMA das células progenitoras vasculares foi correlacionado com o escore de Gensini da artéria coronária também fez a mesma observação.²⁵ Um experimento em um modelo suíno de desvio arteriovenoso também forneceu evidências tangíveis que apoiam este ponto de vista.²⁶

O vWF é uma glicoproteína codificada pelo braço curto do cromossomo 12 que pode ser combinada com fibras de colágeno e plaquetas; está intimamente relacionada com uma série de doenças cardiovasculares, tais como aterosclerose, síndrome coronariana aguda e fibrilação atrial.²⁷ O vWF estimula a proliferação das células musculares lisas vasculares diretamente, o que resulta em efeito de dose-resposta direto. Também acelera a hiperplasia intimal no endotélio intacto sem ativação plaquetária ou liberação de fator de crescimento derivado de plaquetas.²⁸ Similarmente, nós achamos que os valores de vWF nos grupos α -CA, RPM e α -CA-RPM eram menores que no grupo controle e o do grupo α -CA-RPM era menor que nos grupos α -CA e RPM. Os nossos resultados em ratos são corroborados por experimentos em outros animais, por exemplo, um estudo de eficácia em cachorros e um estudo sobre hiperplasia intimal de artérias carótidas de coelhos.^{29,30} Estes resultados demonstram que α -CA, RPM e α -CA-RPM podem reduzir a hiperplasia intimal por bloquearem a sobre-expressão de α SMA e vWF.

Os nossos resultados mostram que rapamicina em combinação com α -cianoacrilato contribuiu à inibição de hiperplasia intimal e é mais efetivo para patência vascular que o uso individual de α -CA ou RPM em modelos em ratos 4 semanas após operação. Os efeitos a longo prazo de α -CA-RPM em remodelação de enxertos venosos ainda não estão claros. A nossa equipe conduzirá pesquisa futura em porcos após CRM e os impactos de intervenções relacionadas às veias enxertadas.

Conclusão

Os nossos resultados confirmaram que α -CA-RPM contribuiu à inibição de hiperplasia intimal e é mais efetivo para patência vascular que o uso individual de α -CA ou RPM em modelos de cirurgia de revascularização miocárdica em ratos. Os efeitos positivos parecem ser associados à diminuição de espessamento intimal, à redução de proliferação celular no enxerto venoso e à diminuição de respostas inflamatórias. Embora os efeitos a curto prazo de α -CA-RPM pareçam promissores, os efeitos a longo prazo e o significado clínico de α -CA-RPM em CRM precisam ser estudados futuramente.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer XR Huang e DK Huang pela sua técnica especializada.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Tianshu-Chu, Congrong-Gao, Zhiwei-zhao; obtenção de dados: Tianshu-Chu, Fei-Ling, Ayu-Sun; análise e interpretação dos dados: Tianshu-Chu, Jing-Cao, Yuanbiao-Zheng, Jianjun Ge; análise estatística: Tianshu-Chu, Congrong-Gao, Zhiwei-zhao; redação do manuscrito: Tianshu-Chu, Congrong-Gao, Fei-Ling, Ayu-Sun; revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Tianshu-Chu, Congrong-Gao, Zhiwei-zhao, Fei-Ling, Ayu-Sun, Jianjun Ge.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pelo National Natural Science Foundation of China.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Tianshu-Chu pela Anhui Medical University.

Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Anhui Animal Ethics Committee sob o número de protocolo ah56743.

Referências

1. Blaas I, Heinz K, Wurtinger P, Turkcan A, Tepekoylu C, Grimm M, et al. Vein graft thrombi, a niche for smooth muscle cell colonization - a hypothesis to explain the asymmetry of intimal hyperplasia. *J Thromb Haemost*. 2016;14(5):1095-104.
2. Hameau DR, Veas PN, Mendez LM, Martinez RG. Focal arterialization and neoatherosclerosis of a saphenous vein graft. Improving our understanding of late graft failures. *Arq Bras Cardiol*. 2016;107(5):495-6.
3. Sur S, Sugimoto JT, Agrawal DK. Coronary artery bypass graft: why is the saphenous vein prone to intimal hyperplasia? *Can J Physiol Pharmacol*. 2014;92(7):531-45.
4. Taggart DP, Ben Gal Y, Lees B, Patel N, Webb C, Rehman SM, et al. A randomized trial of external stenting for saphenous vein grafts in coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg*. 2015;99(6):2039-45.
5. Parsonnet V, Lari AA, Shah IH. New stent for support of veins in arterial grafts. *Arch Surg*. 1963 Oct;87:696-702.
6. Yao J, Zhang Y, Hu Q, Zeng D, Hua F, Meng W, et al. Optimization of paenol-loaded poly(butyl-2-cyanoacrylate) nanocapsules by central composite design with response surface methodology together with the antibacterial properties. *Eur J Pharm Sci*. 2017 Apr 1;101:189-99.
7. Dai L, Gao M, Gu C, Zhang F, Yu Y. Perivenous application of cyanoacrylate tissue sealants reduces intimal and medial thickening of the vein graft and inflammatory responses in a rabbit model of carotid artery bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2016;49(2):675-81.
8. Zou Y, Dietrich H, Hu Y, Metzler B, Wick G, Xu Q. Mouse model of venous bypass graft arteriosclerosis. *Am J Pathol*. 1998;153(4):1301-10.
9. Jeremy JY, Dashwood MR, Mehta D, Izzat MB, Shukla N, Angelini GD. Nitric oxide, prostacyclin and cyclic nucleotide formation in externally stented porcine vein grafts. *Atherosclerosis*. 1998;141(2):297-305.
10. Shi Y, O'Brien JE Jr, Mannion JD, Morrison RC, Chung W, Fard A, et al. Remodeling of autologous saphenous vein grafts. The role of perivascular myofibroblasts. *Circulation*. 1997;95(12):2684-93.
11. Owens CD, Rybicki FJ, Wake N, Schanzer A, Mitsouras D, Gerhard-Herman MD, et al. Early remodeling of lower extremity vein grafts: inflammation influences biomechanical adaptation. *J Vasc Surg*. 2008;47(6):1235-42.
12. Masuda H, Kawamura K, Nanjo H, Sho E, Komatsu M, Sugiyama T, et al. Ultrastructure of endothelial cells under flow alteration. *Microsc Res Tech*. 2003;60(1):2-12.
13. Vijayan V, Shukla N, Johnson JL, Gadsdon P, Angelini GD, Smith FC, et al. Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath. *J Vasc Surg*. 2004;40(5):1011-9.
14. George SJ, Izzat MB, Gadsdon P, Johnson JL, Yim AP, Wan S, et al. Macroporosity is necessary for the reduction of neointimal and medial thickening by external stenting of porcine saphenous vein bypass grafts. *Atherosclerosis*. 2001;155(2):329-36.
15. Owens CD. Adaptive changes in autogenous vein grafts for arterial reconstruction: clinical implications. *J Vasc Surg*. 2010;51(3):736-46.
16. Angelini GD, Lloyd C, Bush R, Johnson J, Newby AC. An external, oversized, porous polyester stent reduces vein graft neointima formation, cholesterol concentration, and vascular cell adhesion molecule 1 expression in cholesterol-fed pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;124(5):950-6.
17. Kong J, Deng Y, Dong Q, Liu W, Lu Y. Colchicine reduces restenosis after balloon angioplasty treatment for in-stent restenosis. *Arch Med Res*. 2015;46(2):101-6.
18. Miao LF, Yin YP, Cui YL, Chen LF, Zeng Y, Huang CL, et al. Efficacy and mechanism of local delivery of rapamycin and rapamycin-loaded poly(lactico-glycolic) acid nanoparticles on coronary restenosis of injury-stenosis model of minipigs. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2016;96(1):36-42.
19. Guo M, Zhang Y, Tian D, Wu X, Chen Z, Ma L, et al. Inhibitory effect of topical application of 5-fluorouracil on intimal hyperplasia of vein graft. *Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2009;23(8):940-6.
20. Wang XT, Venkatraman S, Boey F, Loo SC, Tan LP. Effects of controlled-released sirolimus from polymer matrices on human coronary artery smooth muscle cells. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2007;18(11):1401-14.
21. Taniwaki M, Raber L, Magro M, Kalesan B, Onuma Y, Stefanini GC, et al. Long-term comparison of everolimus-eluting stents with sirolimus- and paclitaxel-eluting stents for percutaneous coronary intervention of saphenous vein grafts. *EuroIntervention*. 2014;9(12):1432-40.
22. Tsujino M, Hirata Y, Eguchi S, Watanabe T, Chatani F, Marumo F. Nonselective ETA/ETB receptor antagonist blocks proliferation of rat vascular smooth muscle cells after balloon angioplasty. *Life Sci*. 1995;56(25):PL449-54.
23. Sanmartin M, Fernandez-Ortiz A, Fantidis P, Aragoncillo P, Fernandez-Durango R, Rollin R, et al. Effects of bosentan on neointimal response following coronary angioplasty. *Eur J Clin Invest*. 2003;33(9):762-8.
24. Aziz O, Rahman MS, Hadjianastassiou VG, Kokotsakis J, Vitali M, Cherian A, et al. Novel applications of Dermabond (2-octyl -cyanoacrylate) in cardiothoracic surgery. *Surg Technol Int*. 2007 Apr 5;16:46-51.
25. Wang CH, Hsieh IC, Chen SJ, Wang JS, Cherng WJ, Chen CC, et al. VE-Cadherin(low)alpha-smooth muscle actin+ component of vascular progenitor cells correlates with the coronary artery Gensini score. *Circ J*. 2012;76(2):477-84.
26. Goldstone RN, McCormack MC, Khan SI, Salinas HM, Meppelink A, Randolph MA, et al. Photochemical tissue passivation reduces vein graft intimal hyperplasia in a swine model of arteriovenous bypass grafting. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(8):pii:e003856.
27. Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood*. 2015;125(13):2019-28.
28. Qin F, Impeduglia T, Schaffer P, Dardik H. Overexpression of von Willebrand factor is an independent risk factor for pathogenesis of intimal hyperplasia: preliminary studies. *J Vasc Surg*. 2003;37(2):433-9.
29. Azuma H, Niimi Y, Terada T, Hamasaki H. Accelerated endothelial regeneration and intimal hyperplasia following a repeated denudation of rabbit carotid arteries: morphological and immunohistochemical studies. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1995;22(10):748-54.
30. Wang X, Zhao Y, Fu Z, He Y, Xiang D, Zhang L. Prelining autogenic endothelial cells in allogeneic vessels inhibits thrombosis and intimal hyperplasia: an efficacy study in dogs. *J Surg Res*. 2011;169(1):148-55.

