

## Atividade Inflamatória Persistente em Células Circulantes e Tecido Arterial de Pacientes com Stent Convencional Prévio

*Persistent Inflammatory Activity in Blood Cells and Artery Tissue from Patients with Previous Bare Metal Stent*

Pedro Silvio Farsky,<sup>1</sup> Mario H. Hirata,<sup>2</sup> Renato Tambellini Arnoni,<sup>1</sup> Antonio Flavio Sanches Almeida,<sup>1</sup> Mario Issa,<sup>1</sup> Paula Helena Ortiz Lima,<sup>1</sup> Maria de Lourdes Higuchi,<sup>3</sup> Hui T Lin-Wang<sup>2</sup>

Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia,<sup>1</sup> São Paulo, SP - Brasil

Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia,<sup>2</sup> Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, São Paulo, SP - Brasil

Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo,<sup>3</sup> São Paulo, SP - Brasil

### Resumo

**Fundamento:** Estudos relataram maior mortalidade após cirurgia de revascularização miocárdica (RVM) em pacientes com *stent*.

**Objetivo:** Avaliar marcadores inflamatórios em células do sangue periférico e em amostras de tecido de artéria coronária obtidas durante cirurgia de RVM em pacientes com *stent* e compará-los aos de controles.

**Métodos:** A casuística consistiu de dois grupos, um com prévia implantação de *stent* (n = 41) e um controle (n = 26). Em células do sangue periférico coletadas no pré-operatório, analisou-se a expressão dos seguintes genes: *LIGHT*, *IL-6*, *ICAM*, *VCAM*, *CD40*, *NFKB*, *TNF*, *IFNG*. A artéria coronária foi avaliada por imuno-histoquímica para: interleucina-6, *ICAM*, *VCAM*, *CD40*, *NFKB*, *TNF*-alfa e *IFN*-gama. No total, 176 amostras de tecido arterial coronariano foram assim agrupadas para análise: A1- artérias com *stent* (n = 38); A2- artérias nativas de paciente com *stent* em outra artéria (n = 68); e A3- artérias de controles sem *stent* submetidos a cirurgia de RVM de rotina (n = 70). Adotou-se o nível de significância de 0,05.

**Resultados:** Pacientes com *stent* apresentaram maior expressão do gene *TNF* (p = 0,03) e menor do *CD40* (p = 0,01) em células do sangue periférico do que controles sem *stent*. Nas amostras de artéria coronária, a coloração da proteína *TNF*-alfa foi maior no grupo A1, não apenas na camada médio-intimal ( $5,16 \pm 5,05$  vs  $1,90 \pm 2,27$ ; p = 0,02), mas também no tecido adiposo ( $6,69 \pm 3,87$  vs  $2,27 \pm 4,00$ ; p < 0,001). Além disso, o grupo A1 apresentou maior coloração para interleucina-6 no tecido adiposo do que o grupo A3 (p = 0,04).

**Conclusão:** Observou-se expressão sistêmica de *TNF* persistentemente maior em associação com produção local exacerbada de *TNF*-alfa e *IL-6* em pacientes com *stent*. Isso pode contribuir para pior desfecho clínico. (Arq Bras Cardiol. 2018; 111(2):134-141)

**Palavras-chave:** Intervenção Coronária Percutânea; Células Sanguíneas; Inflamação; Stents; Reação em Cadeia de Polimerase; Imuno-Histoquímica; Fator de Necrose Tumoral Alpha; Interleucina-6.

### Abstract

**Background:** Studies have pointed out a higher mortality after coronary artery bypass surgery (CABG) in patients with *stent*.

**Objective:** To evaluate inflammatory markers in peripheral blood cells and in coronary artery tissue samples obtained during CABG in patients with *stent* compared to controls.

**Methods:** The case series consisted of two groups, one with previous *stent* implantation (n = 41) and one control (n = 26). The expression of the *LIGHT*, *IL-6*, *ICAM*, *VCAM*, *CD40*, *NFKB*, *TNF*, *IFNG* genes was analyzed in peripheral blood cells collected preoperatively. The coronary artery was evaluated for: interleukin-6, *ICAM*, *VCAM*, *CD40*, *NFKB*, *TNF*-alpha and *IFN*-gamma by immunohistochemistry. A total of 176 tissue samples were grouped for analysis in: A1- arteries with *stent* (n = 38); A2- native arteries from patients with *stent* in another artery (n = 68); and A3- arteries without *stent* from controls undergoing routinely CABG surgery (n = 70). A significance level of 0.05 was adopted.

**Results:** Patients with *stent* showed higher *TNF* (p = 0.03) and lower *CD40* gene expression (p = 0.01) in peripheral blood cells than controls without *stent*. In coronary artery samples, the *TNF*-alpha protein staining was higher in the group A1, not only in the intima-media layer ( $5.16 \pm 5.05$  vs  $1.90 \pm 2.27$ ; p = 0.02), but also in the adipose tissue ( $6.69 \pm 3.87$  vs  $2.27 \pm 4.00$ ; p < 0.001). Furthermore, group A1 had a higher interleukin-6 protein staining in adipose tissue than group A3 (p = 0.04).

**Conclusion:** We observed a persistently higher systemic *TNF* expression associated with exacerbated *TNF*-alpha and interleukin-6 local production in patients with *stents*. This finding may contribute to a worse clinical outcome. (Arq Bras Cardiol. 2018; 111(2):134-141)

**Keywords:** Percutaneous Coronary Intervention; Blood Cells; Inflammation; Stents; Polymerase Chain Reaction; Immunohistochemistry; Tumor Necrosis Factor-alpha; Interleukin-6.

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

Correspondência: Pedro Silvio Farsky •

Rua Alberto Faria, 248. CEP 05459-000, Alto de Pinheiros, São Paulo, SP - Brasil

E-mail: [pedro.farsky@gmail.com](mailto:pedro.farsky@gmail.com)

Artigo recebido em 20/08/2017, revisado em 23/02/2018, aceito em 23/02/2018

DOI: 10.5935/abc.20180119

## Introdução

Estudos retrospectivos sugeriram que a cirurgia de revascularização miocárdica (RVM) após intervenção coronariana percutânea (ICP) possa comprometer os desfechos de curto e longo prazo.<sup>1-7</sup> Estudos prévios demonstraram que a ICP associa-se com maior mortalidade hospitalar, a despeito do perfil de menor risco dos pacientes submetidos a ICP,<sup>3</sup> mas não há consenso na literatura.<sup>8</sup> Uma análise do estudo MASS<sup>9</sup> mostrou que pacientes submetidos a ICP apresentavam maior probabilidade de progressão da doença nas artérias coronárias nativas do que aqueles submetidos a cirurgia de RVM ou tratamento clínico.

Durante a ICP, ocorre reação inflamatória focal com ruptura de placa causada pela implantação de *stent*, mas há controvérsia quanto à persistência dessa reação a longo prazo. Há pouca informação quanto à presença de reação inflamatória sistêmica persistente ou mediadores tissulares na artéria coronária após implantação de *stent*, assim como quanto à comparação entre artérias coronárias com *stent*, artérias coronárias sem *stent* mas tendo o paciente *stent* em outra artéria e controles.

A cirurgia de RVM propicia a oportunidade única de coletar amostras de artérias coronárias para avaliar a reação inflamatória local muito tempo após a implantação de *stent*. Este estudo visa avaliar a expressão de genes inflamatórios nas células do sangue periférico e a localização da proteína inflamatória em tecido de artéria coronária obtido durante cirurgia de RVM em pacientes com e sem implantação prévia de *stent*. Vale mencionar que a cirurgia de RVM representa uma oportunidade única de se obter uma diminuta amostra de tecido arterial coronariano para avaliar a reação inflamatória local em seres humanos. Hoje, pacientes submetidos a implantação prévia de *stent* convencional (SC) e que precisam de cirurgia de RVM mais tarde representam um número significativo dos pacientes em hospitais cardiológicos, em especial em países em desenvolvimento. Nossos resultados podem contribuir para esclarecer a persistência de inflamação local e sistêmica na fase tardia da reestenose de *stent*.

## Métodos

### Casística

Os pacientes admitidos para cirurgia eletiva de RVM com implantação prévia de *stent* foram consecutivamente incluídos neste estudo após assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. O protocolo foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto de Cardiologia Dante Pazzanese (Protocolo 4059-2011).

Este estudo incluiu 67 pacientes submetidos a cirurgia eletiva de RVM como se segue: 41 pacientes com prévia implantação intracoronariana de SC e 26 pacientes sem implantação de *stent*. Todos os pacientes tinham angina estável e mais de 6 meses de implantação de *stent*, visando a excluir reestenose em andamento. Os critérios de exclusão consistiram em cirurgias de emergência, síndromes coronarianas agudas e insuficiência renal crônica em uso de diálise devido a reação inflamatória crônica.

Coletou-se amostra de sangue periférico no período pré-operatório da veia antecubital, usando tubos PAXgene (PreAnalytiX®, BD Company, RU) para a análise da expressão sistêmica do gene.

Durante a cirurgia de RVM, obteve-se, no local da arteriotomia, um diminuto fragmento das artérias coronárias que receberam a ponte, em geral 10 mm depois do sítio de implantação do *stent*, para avaliar os marcadores de inflamação locais. Todas as amostras de tecido foram imediatamente imersas em solução de formol tamponado para posterior inclusão em blocos de parafina. Alguns dos fragmentos arteriais obtidos não eram adequados para análise histológica, e, portanto, 176 amostras arteriais foram incluídas e agrupadas como se segue: A1- artérias com *stent* (n = 38); A2- artérias nativas de paciente com *stent* em outra artéria (n = 68); e A3- artérias de pacientes sem implantação prévia de *stent* (n = 70).

### Isolamento de RNA, transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

Extraiu-se o RNA total do sangue periférico coletado em tubos PAXgene (PreAnalytiX®, BD Company, RU) usando o kit PAXgene blood RNA (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha), com posterior quantificação pelo fluorímetro Qubit® 2,0 (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY). A integridade do RNA foi analisada com o sistema TapeStation® 2200 e R6K Screen Tape (Agilent Technologies, Inc. RU). O cDNA foi transcrito a partir de 200 ng do RNA total usando High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Realizou-se qPCR em tempo real no sistema de detecção Rotor-Gene® usando-se o kit TaqMan® Fast Multiplex PCR (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) e *primers* do sistema Applied Biosystem comercialmente disponibilizado por TaqMan® qPCR (Applied Biosystems, Foster, CA, EUA).

Avaliou-se a expressão dos seguintes genes: *LIGHT* (Hs00542477\_m1); *IL-6* (Hs00985639\_m1); *ICAM* (Hs00164932\_m1); *VCAM* (Hs00174239\_m1); *CD40* (Hs01002913\_g1); *NFKB* (Hs00231653\_m1); *TNF* (Hs01113624\_g1); *IFNG* (Hs00989291\_m1) e *GAPDH* (Hs00266705\_g1). Para todos os genes, foram construídas curvas-padrão e determinada a inclinação para calcular a eficiência da PCR. Observou-se eficiência quase igual para todos os sistemas *primer*/sonda. Todas as amostras foram testadas em duplicata usando-se *GAPDH* como gene de referência, previamente escolhido entre os seis genes mais comuns do miocárdio endógeno com o algoritmo geNorm.<sup>10</sup> As amostras amplificadas após 40 ciclos da PCR foram consideradas negativas e excluídas da análise estatística. A expressão do gene de referência *GAPDH* foi aplicada para normalização de dados, sendo a relativa expressão de cada mRNA calculada usando-se o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .<sup>11</sup>

### Reação imuno-histoquímica

Primeiramente, amostras arteriais fixadas em formol e incluídas em parafina foram cortadas com 4- $\mu$ m de espessura e fixadas em lâminas silanizadas. Seguiram-se desparafinação a 70°C, em forno, por 1 hora, e imersão em três banhos de xilol por 10 minutos. As amostras foram então reidratadas em

concentrações decrescentes (100%, 90%, 75%) de álcool etílico. A recuperação do antígeno foi realizada usando-se o tampão Trilogy® (Cell Marque, California, EUA) em equipamento Decloaker a 90°C por 40 minutos (Biocare Medical, CA, EUA). Os bloqueadores específicos (Erviagas EasyPath, DuraEdge, EUA) foram aplicados para bloqueio de peroxidase endógena e proteínas. Na próxima etapa, as lâminas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários previamente titulados e diluídos em diluente universal (Erviagas EasyPath, DuraEdge, EUA). Usaram-se os anticorpos primários para interleucina-6 (IL-6) (ab6672), ICAM (ab2213), VCAM (ab106777), TNF-alfa (ab1793), IFN-gama (ab9657), CD40 (ab58612) e NFkB (ab16502) de Abcam (Cambridge, MA, RU). A reação de imunoperoxidase foi realizada com Mach4 Kit Universal HRP Polymer + DAB (Biocare Medical, California, EUA), sendo, por fim, as lâminas coradas com hematoxilina de Harris (Erviagas EasyPath, DuraEdge, EUA) e montadas em resina sintética Erv-Mount (Erviagas EasyPath, DuraEdge, EUA). O controle positivo da reação de imuno-histoquímica foi realizado usando-se tecidos com os mesmos antígenos construtivos do antígeno de interesse. Após o processamento de imuno-histoquímica, as lâminas foram digitalizadas em unidade de Scanscope CS System (Aperio Technologies, Inc., CA, EUA), com uma objetiva 20x Olympus UPlanSApo com especificações 20x/0,75 acoplada ao scanner, gerando arquivos de imagem em formato sv5. As imagens digitalizadas foram analisadas com o programa de visualização Aperio ImageScope (Aperio Technologies, Inc., CA, EUA), que informa a porcentagem de áreas coradas positivamente em relação à área total do tecido.

### Análise estatística

As variáveis contínuas foram expressas como média e desvio-padrão ou mediana e intervalo interquartil, dependendo

da suposição de normalidade. As variáveis categóricas foram expressas como frequências absoluta e relativa. Os valores entre os grupos foram comparados pelo teste *t* de Student não pareado após avaliar-se a distribuição quanto à normalidade com o teste Kolmogorov-Smirnov; de outro modo, usou-se o teste U de Mann-Whitney não paramétrico. O teste exato de Fisher ou o qui-quadrado foi usado para as variáveis categóricas com escalas nominais. Para a comparação dos marcadores do tecido arterial, usou-se o teste de Kruskal-Wallis (ou ANOVA, suposição de normalidade), deixando-se o teste de Tukey para as comparações múltiplas não paramétricas. Adotou-se um valor de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo. Usou-se a versão 19 do SPSS.

Para detectar 3 unidades com desvio-padrão de 4, poder de teste de 80% e alfa de 5%, o tamanho da amostra foi calculado em 105 casos.

## Resultados

### Características clínicas dos grupos do estudo

As frequências das características clínicas (Tabela 1), como sexo, diabetes, dislipidemia, tabagismo, acidente vascular encefálico prévio e infarto do miocárdio, foram semelhantes nos dois grupos. Entretanto, o grupo de stent apresentou idade menor e maior prevalência de disfunção ventricular, caracterizada por fração de ejeção menor do que 50%. O grupo controle apresentou maior contagem de plaquetas ( $269.560 \pm 74.461$ ) do que o grupo de stent ( $237.355 \pm 70.831$ ), porém sem significância estatística ( $p = 0,12$ ). Todos os pacientes eram tratados com estatinas e ácido acetilsalicílico.

O tempo decorrido entre a implantação de stent e a cirurgia de RVM foi superior a 6 meses. Nove pacientes

**Tabela 1 – Dados biodemográficos dos grupos estudados: com prévia implantação de stent e controle**

Variáveis	Grupo Stent	Grupo Controle	p valor
Casos	41	26	
Idade (anos)	60,2 ± 7,1	6,3 ± 8,69	0,004
Sexo feminino (%)	13 (31,3)	8 (30,8)	0,58
Contagem de plaquetas	237.355 ± 70.831	269.560 ± 74.461	0,12
Hipertensão (%)	35 (85,4)	22 (84,6)	0,60
Diabetes (%)	17 (42,5)	8 (36,4)	0,42
Tabagismo atual (%)	4 (10,5)	3 (14,3)	0,48
AVE (%)	2 (5,3)	0	0,43
Doença renal crônica (%)	2 (5,3)	0	0,43
Dislipidemia (%)	25 (62,5)	16 (64)	0,56
Infarto do miocárdio (%)	14 (35,9)	5 (22,7)	0,22
FEVE < 50% (%)	14 (41,2)	2 (9,1)	0,009
AAS (%)	41 (100)	26 (100)	1,00
Estatinas (%)	41 (100)	26 (100)	1,00

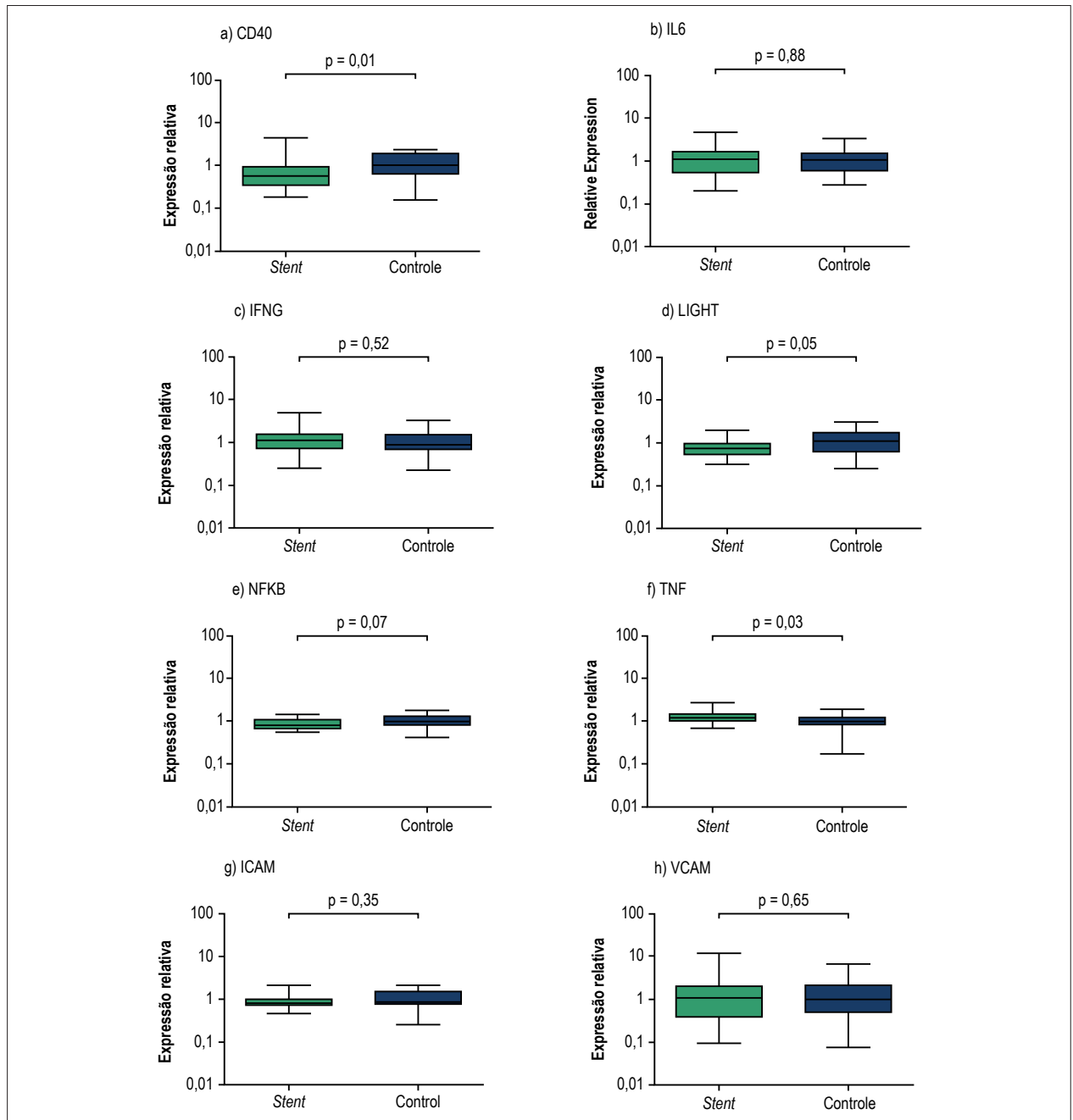
AVE: acidente vascular encefálico; FEVE: fração de ejeção ventricular esquerda; AAS: ácido acetilsalicílico. Idade e contagem de plaquetas expressas como média ± desvio-padrão. Sexo, hipertensão, diabetes, tabagismo, AVE, doença renal crônica, dislipidemia, infarto do miocárdio, FEVE < 50%, uso de AAS e de estatina expressos em números e porcentagens dos pacientes estudados. Adotou-se o nível de significância estatística de  $p < 0,05$ .

(22%) receberam a implantação de *stent* entre 6 e 12 meses, 25 pacientes (61%) receberam apenas um *stent*, sendo que 16 pacientes (39%) receberam dois ou mais *stents*.

### Expressão do gene em células do sangue periférico através de PCR em tempo real

Obteve-se o RNA total das células do sangue periférico, avaliando-se ainda a expressão dos seguintes genes: *LIGHT*,

*IL-6*, *ICAM*, *VCAM*, *CD40*, *NFKB*, *TNF*, *IFNG* e *GAPDH*. Dos oito genes, a expressão de apenas dois diferiu entre os grupos de *stent* e controle: a expressão de *TNF* foi significativamente maior ( $p = 0,0308$ ) no grupo de *stent* (Figura 1-f), sendo a de *CD40* maior no grupo controle ( $p = 0,0106$ ) (Figura 1-a). Não se detectou diferença na expressão dos genes *IL-6*, *IFNG*, *LIGHT*, *NFKB*, *ICAM* e *VCAM* (Figura 1).



**Figura 1** – Expressão de genes inflamatórios no sangue periférico. A expressão dos genes *CD40* (a), *IL-6* (b), *IFNG* (c), *LIGHT* (d), *NFKB* (e), *TNF* (f), *ICAM* (g) e *VCAM* (h) foi avaliada por PCR em tempo real usando o gene *GAPDH* como controle interno para calcular a expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). Os pacientes com implantação coronária de *stent* (n = 35) foram comparados com os controles (n=25) usando o teste não paramétrico de Mann-Whitney. A diferença foi considerada significativa para p-valores < 0,05.

### Análise quantitativa por imuno-histoquímica

A quantificação da coloração das proteínas por imuno-histoquímica é apresentada na Tabela 2 e ilustrada nas Figuras 2 e 3. Os resultados mostraram maior coloração para TNF-alfa nas artérias do tecido adiposo do grupo A1 do que do A2 ( $6,69 \pm 3,87$  vs  $2,27 \pm 4,00$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 2-a). O grupo A1 apresentou maior coloração TNF-alfa na região médio-intimal do que o A3 ( $5,16 \pm 5,05$  vs  $1,90 \pm 2,27$ ;  $p = 0,023$ ) (Figura 2-b). Além disso, detectou-se grande quantidade de TNF-alfa no citoplasma das células inflamatórias e em torno do núcleo lipídico (Figura 3-C e D).

Detectou-se maior quantidade de IL-6 nas artérias do tecido adiposo do grupo A1 do que naquelas do grupo A3 ( $2,29 \pm 1,96$  vs  $0,28 \pm 0,33$ ;  $p = 0,048$ ) (Figura 2-c), também observada ao microscópio (Figura 3-E e F). Não houve diferença entre os grupos quanto à quantificação da coloração de CD40, ICAM, VCAM, NFKB e IFN-gama.

O exame histológico evidenciou células positivas para complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHCII) circundando o núcleo lipídico, provavelmente macrófagos (Figura 3-A e B). Essas células também coraram para TNF-alfa,

sendo detectadas no tecido adiposo e na camada íntima (Figuras 3-C e 3-D). Menos células positivas para IL-6 foram observadas na mesma camada arterial (Figura 3-E e 3-F).

### Discussão

Este estudo analisou a expressão de genes nas células de sangue periférico e a localização de proteína no tecido de artérias coronárias, para avaliar inflamação sistêmica e local simultânea. Observou-se expressão sistêmica persistentemente maior de TNF-alfa nas células do sangue periférico, além de produção local exacerbada de TNF-alfa e IL-6 nas artérias coronárias.

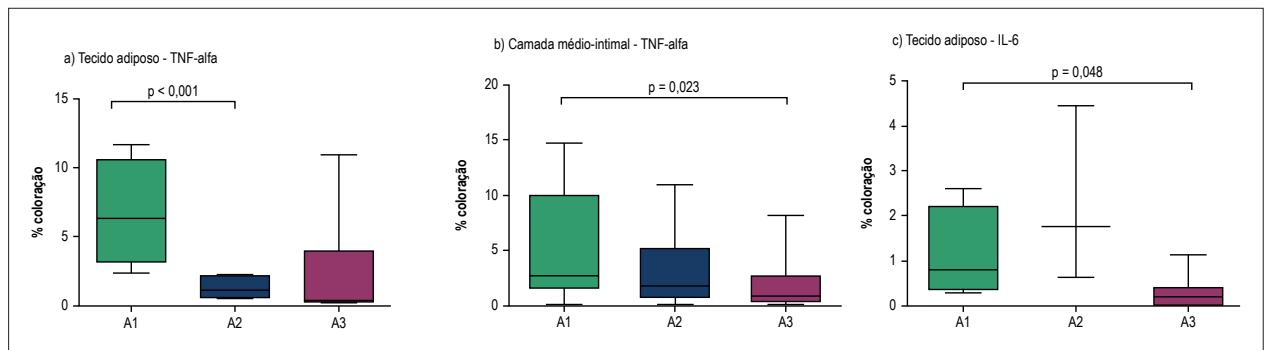
Nosso estudo avaliou, em pacientes estáveis, inflamação local coronária e sistêmica após a implantação de stent em comparação a controles. Todos os pacientes incluídos haviam sido submetidos a ICP mais de 6 meses antes e tinham indicação para cirurgia de RVM. Com relação ao tempo de implantação de stent, 9 dos 41 pacientes (22%) haviam sido submetidos à ICP há menos de um ano, e 32 pacientes (78%) haviam sido submetidos à ICP há mais de um ano. Um estudo anterior mostrou que a reação inflamatória inerente à ICP

**Tabela 2 –** Quantificação das proteínas CD40, ICAM, VCAM, MHC-II, TNF-alfa, NFKB, IL-6 e IFN-gama na camada arterial médio-intimal, adventícia e tecido adiposo por imuno-histoquímica

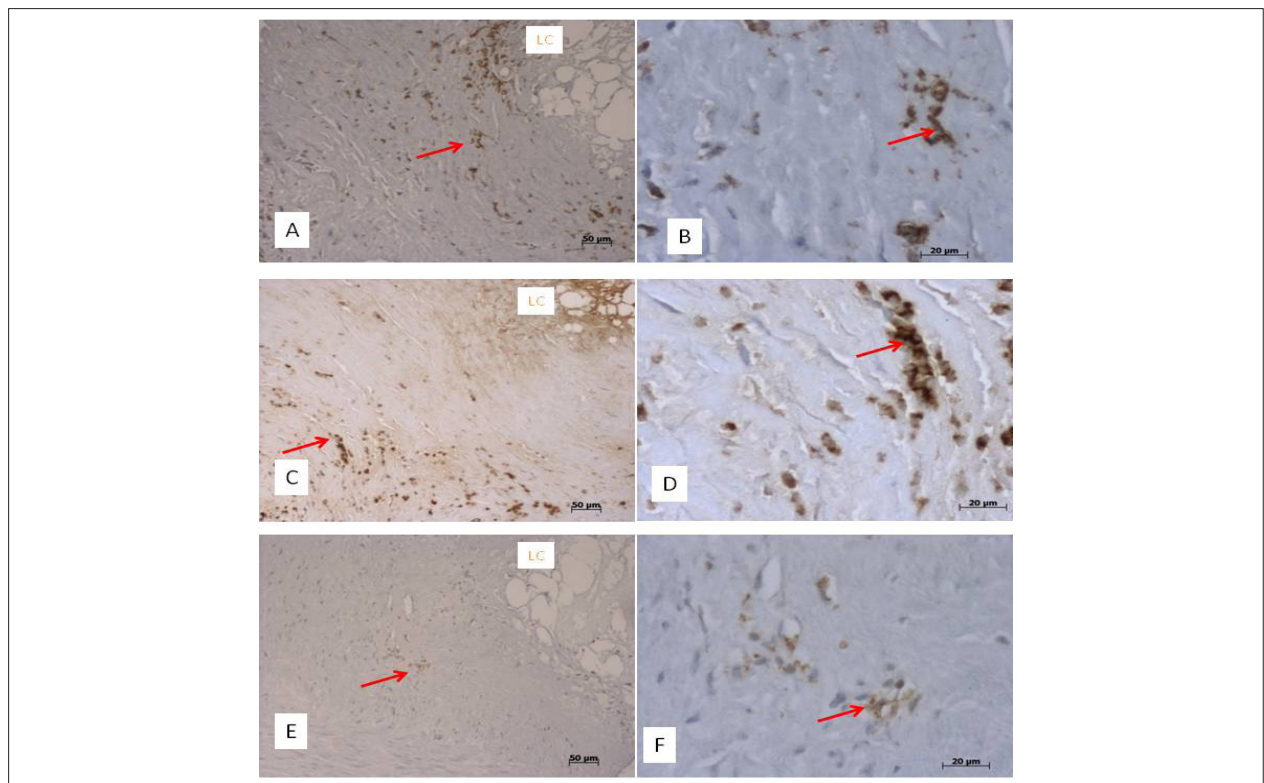
Proteína	camadas arteriais	Grupo A1			Grupo A2			Grupo A3			p valor ( $\alpha = 0,05$ )			
		n	média	DP	n	média	DP	n	média	DP	3 grupos	1 vs 2	1 vs 3	2 vs 3
CD40	médio-intimal	16	1,37	2,02	27	1,51	1,73	23	1,11	1,56	0,55	ns	ns	ns
	adventícia	13	0,70	0,77	26	0,82	0,71	19	1,27	1,66	0,58	ns	ns	ns
	tecido adiposo	3	0,73	0,12	6	0,62	0,58	9	0,58	0,74	0,45	ns	ns	ns
ICAM	médio-intimal	18	3,27	3,00	27	3,47	3,77	20	2,81	4,23	0,16	ns	ns	ns
	adventícia	14	4,07	3,67	25	4,22	4,82	19	3,99	5,39	0,76	ns	ns	ns
	tecido adiposo	1	5,93	-	7	1,99	1,37	5	1,52	1,64	0,22	ns	ns	ns
VCAM	médio-intimal	14	11,88	16,01	24	10,33	9,64	23	7,88	6,12	0,76	ns	ns	ns
	adventícia	11	4,69	8,39	19	4,09	4,74	21	2,56	2,26	0,68	ns	ns	ns
	tecido adiposo	2	4,31	5,28	4	1,76	1,22	4	0,32	0,36	0,10	ns	ns	ns
MHC II	total area	7	0,74	0,59	8	0,47	0,12	30	0,75	0,52	0,307	ns	ns	ns
	médio-intimal	15	5,16	5,05	24	3,11	3,01	21	1,90	2,27	0,03	ns	0,023	ns
TNF-alfa	adventícia	14	4,05	2,82	21	2,28	2,24	20	3,57	5,95	0,10	ns	ns	ns
	tecido adiposo	4	6,69	3,88	4	1,27	0,84	9	2,27	4,00	0,05	0,001	ns	ns
	médio-intimal	14	1,11	1,14	24	0,93	0,88	20	0,92	1,07	0,96	ns	ns	ns
NFKB	adventícia	14	0,64	0,61	21	0,83	0,78	19	0,76	0,55	0,65	ns	ns	ns
	tecido adiposo	2	1,18	0,87	6	0,52	0,44	6	1,63	2,58	0,66	ns	ns	ns
	médio-intimal	16	1,15	1,12	23	1,27	1,61	21	0,66	0,88	0,17	ns	ns	ns
Interleucina-6	adventícia	15	1,65	2,04	20	1,65	2,02	21	0,91	0,74	0,69	ns	ns	ns
	tecido adiposo	4	1,12	1,03	3	2,29	1,96	11	0,28	0,33	0,01	ns	0,061	0,048
	médio-intimal	14	0,67	0,70	25	0,66	0,69	22	0,56	0,84	0,36	ns	ns	ns
IFN-gama	adventícia	12	0,52	0,41	20	0,59	0,54	21	0,40	0,46	0,36	ns	ns	ns
	tecido adiposo	3	0,54	0,53	4	0,14	0,10	7	0,10	0,11	0,13	ns	ns	ns

DP: desvio-padrão. Os grupos foram comparados com o teste de Kruskal-Wallis ou ANOVA: A1 (artérias sem stent); A2 (artérias nativas de pacientes com stent em outra artéria); e A3 (controle, pacientes sem implantação prévia de stent). Adotou-se o nível de significância estatística de  $p < 0,05$ .





**Figura 2** – Comparação da coloração das proteínas TNF-alfa e IL-6 em diferentes camadas do tecido arterial. Três grupos foram comparados: A1 (artérias com stent), A2 (artérias nativas de pacientes com stent em outra artéria) e A3 (controle, sem implantação prévia de stent). A coloração da proteína TNF-alfa foi maior no tecido adiposo do grupo A1 ( $6,69 \pm 3,87$  vs  $2,27 \pm 4,00$ ;  $p < 0,001$ ) (a), assim como na camada médio-intimal ( $5,16 \pm 5,05$  vs  $1,90 \pm 2,27$ ;  $p = 0,02$ ) (b). A coloração da proteína IL-6 foi maior no tecido adiposo do grupo A1 do que no do grupo A3 ( $2,29 \pm 1,96$  vs  $0,28 \pm 0,33$ ;  $p = 0,048$ ) (c). O teste de Kruskal-Wallis e o teste de Tukey para comparações múltiplas não paramétricas foram usados para a análise estatística. A diferença foi considerada significativa para  $p$ -valores  $< 0,05$ .



**Figura 3** – Visão panorâmica (esquerda) e de grande aumento (direita) da camada arterial médio-intimal corada por imunohistoquímica de indivíduos com implantação prévia de stent. Painéis A e B mostram células MHCII-positivas, com morfologia de macrófagos (setas), circundando o núcleo lipídico (LC). Painéis C e D mostram grande quantidade de TNF-alfa no citoplasma de células inflamatórias (setas) e no núcleo lipídico (LC). Painéis E e F exibem menor número de células inflamatórias positivas para a proteína IL-6 em sítios semelhantes (setas).

não mais existia nesse período.<sup>12</sup> Nenhum paciente com stent farmacológico (SF) foi arrolado no presente estudo. A literatura prévia relata um maior número de linfócitos T e macrófagos nas lesões de SF do que nas de SC, sugerindo que o mecanismo de reestenose após a implantação do SF seja diferente daquele observado após a implantação do SC.<sup>13</sup>

Neste estudo, a expressão de gene nas células do sangue periférico e a localização de proteína no tecido das artérias

coronárias foram consideradas para avaliar inflamação sistêmica e local, respectivamente. Vale a pena mencionar que a cirurgia de RVM representa uma rara oportunidade para se obter amostras de tecido arterial coronariano para pesquisa sem prejuízo para o paciente, sendo essa a razão pela qual tão poucos estudos trabalharam com esse tipo de amostra biológica. Na maioria deles, as amostras foram obtidas de placas ateroscleróticas por endarterectomia.<sup>14,15</sup>

### Análise do sangue

A análise da expressão do mRNA das células do sangue circulante indicou uma expressão significativamente maior do gene *TNF* no grupo com prévia implantação de *stent* do que nos controles (Figura 1-f), sugerindo maior ativação desse gene em leucócitos de pacientes submetidos à implantação de *stent*. Esse gene codifica uma citocina pleiotrópica envolvida em ampla gama de atividades biológicas, como inflamação, sobrevivência celular, proliferação celular e, paradoxalmente, morte celular.<sup>16</sup>

Observamos ainda uma expressão significativamente maior do gene *CD40* nas células do sangue do grupo de *stent* do que nas dos controles (Figura 1-a). O CD40 é o receptor para CD40L, estando presente nas plaquetas. Gerdes et al.,<sup>17</sup> demonstraram em camundongos *knockout* para CD40 e ApoE que as plaquetas têm papel crucial na inflamação, estimulando a ativação de leucócitos e células endoteliais, promovendo, assim, aterosclerose.

### Amostras de tecido de artéria coronária

Analisamos o tecido arterial separado em três camadas (adventícia, médio-intimal e tecido adiposo) corado com *hematoxilina-eosina* e imuno-histoquímica. Vale ressaltar que, embora apenas poucas amostras coletadas contenham tecido adiposo, devido à dificuldade em obter todas as camadas em fragmentos tão diminutos, pudemos distinguir uma maior quantidade das proteínas TNF-alfa e IL-6 no tecido adiposo dos grupos A1 e A2 do que naquele dos controles (Figuras 2-a e 2-c). O tecido adiposo branco é considerado uma glândula endócrina, sendo sua principal característica a resistência à insulina e à leptina, assim como a produção de citocinas inflamatórias (TNF-alfa e IL-6) e proteína quimioatrativa de monócitos,<sup>18,19</sup> envolvidas na aterogênese.<sup>20,21</sup> Interessante notar que a análise histológica mostrou células imunes ativadas, com expressão de MHCII na membrana (Figura 3), circundando o núcleo lipídico. Além disso, tais células foram colocalizadas com coloração para TNF-alfa e IL-6, sugerindo uma maior resposta inflamatória no tecido adiposo em torno de artérias de indivíduos com implantação prévia de *stent*.

A proteína TNF-alfa também foi expressa em maior quantidade na camada médio-intimal do grupo A1 do que na dos grupos A2 e A3 (Figura 2-b). Provavelmente as células imunes migraram da circulação sanguínea para aquela camada, principalmente macrófagos, que são responsáveis pela produção daquela citocina. Essas são também células positivas para MHCII, primeiramente responsáveis pela apresentação dos peptídeos antigênicos para as células T do sistema imune.

A IL-6 é uma citocina multifuncional com papel central na inflamação e na injúria tecidual.<sup>22</sup> A IL-6 ativa o receptor de plaquetas GPIIb/IIIa e a interação leucócito-plaqueta, favorecendo, assim, a condição pró-trombótica e a aterogênese. Estudos prévios mostraram que o aumento da IL-6 circulante está associado com o risco de reestenose coronária e lesões *de novo* na artéria coronária,<sup>23</sup> assim como com a gravidade da estenose.<sup>24</sup> Observou-se aumento da expressão do mRNA e da proteína da IL-6 na parede arterial aterosclerótica humana. Nosso estudo mostrou uma quantidade significativamente maior da proteína da IL-6 no tecido coronariano de pacientes com implantação prévia de

*stent* do que no de controles, sugerindo que a inflamação arterial local seja intensificada pela implantação de *stent*.

Nosso achado indicou a presença de inflamação crônica persistente sistêmica e local em indivíduos com implantação prévia de *stent*, podendo contribuir para o pior desfecho descrito em um estudo prévio de meta-análise.<sup>7</sup>

Sabe-se que a resposta inflamatória persistente pode resultar em várias complicações, como formação da placa aterosclerótica nas artérias. Um subestudo do estudo MASS II<sup>9</sup> comparou os resultados de angiografias consecutivas para a progressão da aterosclerose de artérias coronárias em pacientes submetidos a tratamento médico (TM), a cirurgia de RVM e a angioplastia. Os autores observaram maior progressão em pelo menos um vaso nativo em pacientes submetidos a angioplastia do que naqueles submetidos a cirurgia de RVM e pacientes em TM, concluindo que a angioplastia tem a pior progressão nas artérias coronárias nativas, especialmente nos territórios da descendente anterior esquerda. Além disso, nosso resultado mostrou inflamação nas artérias nativas de indivíduos com implantação prévia de *stent*.

### Limitações

Este estudo limitou-se aos SC. Tivemos muito poucos SF com reestenose e indicação de cirurgia de RVM. Devido ao diminuto tamanho das amostras, obteve-se apenas um pequeno número de amostras com tecido adiposo no grupo A2. Além disso, devido ao diminuto tamanho das amostras, muitas delas mostraram-se inadequadas para análise, sendo algumas por material insuficiente. Vale mencionar que o cirurgião primeiro assegura a segurança do paciente.

A amostra arterial foi coletada no segmento menos afetado, considerando o melhor resultado cirúrgico na implantação do enxerto, distal ao *stent*, local de possível menor inflamação e menos afetado pelo *stent*.

A reestenose associa-se com reação inflamatória local e sistêmica que pode estar relacionada com lesões obstrutivas nas artérias com *stent*. Entretanto, apenas nove pacientes foram operados em menos de 365 dias, e as amostras arteriais foram obtidas a pelo menos 10 mm do local de implantação do *stent*, o que reduz sua influência nos resultados.

As estatinas, que possuem atividade anti-inflamatória, podem ter influenciado parcialmente esses resultados, o que foi minimizado pois todos os pacientes recebiam esses medicamentos, procedimento terapêutico com indicação classe I.

### Conclusão

Concluindo, a expressão sistêmica de *TNF* persistentemente maior em associação com a produção local exacerbada de TNF-alfa e IL-6 nas artérias coronárias com implantação prévia de SC pode contribuir para o pior desfecho clínico após cirurgia de RVM.

### Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Farsky PS, Hirata MH, Lima PHO, Lin-Wang HT; Obtenção de dados: Farsky PS, Arnoni RT, Almeida AFS, Issa M, Lima PHO, Higuchi ML, Lin-Wang HT; Análise e interpretação dos dados: Farsky PS, Hirata MH,

Arnoni RT, Almeida AFS, Issa M, Lima PHO, Higuchi ML, Lin-Wang HT; Análise estatística: Lin-Wang HT; Obtenção de financiamento: Farsky PS, Lima PHO; Redação do manuscrito: Farsky PS, Lin-Wang HT; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Farsky PS, Hirata MH, Arnoni RT, Almeida AFS, Issa M, Lin-Wang HT.

#### Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

#### Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPESP.

#### Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de tese de Pós-Doutorado de Pedro Sílvio Farsky pelo Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia / Universidade de São Paulo.

#### Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Cardiologia Dante Pazzanese sob o número de protocolo 4059-2011. Todos os procedimentos envolvidos nesse estudo estão de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, atualizada em 2013. O consentimento informado foi obtido de todos os participantes incluídos no estudo.

## Referências

1. Gaudino M, Cellini C, Pragliola C, Trani C, Burzotta F, Schiavoni G, et al. Arterial versus venous bypass grafts in patients with in-stent restenosis. *Circulation*. 2005;112(9 Suppl):I265-9.
2. Gomes WJ, Buffolo E. Coronary stenting and inflammation: implications for further surgical and medical treatment. *Ann Thorac Surg*. 2006;81(5):1918-25.
3. Hassan A, Buth KJ, Baskett RJ, Ali IS, Maitland A, Sullivan JA, et al. The association between prior percutaneous coronary intervention and short-term outcomes after coronary artery bypass grafting. *Am Heart J*. 2005;150(5):1026-31.
4. Rao C, Stanbridge Rde L, Chikwe J, Pepper J, Skapinakis P, Aziz O, et al. Does previous percutaneous coronary stenting compromise the long-term efficacy of subsequent coronary artery bypass surgery? A microsimulation study. *Ann Thorac Surg*. 2008;85(2):501-7.
5. Thielmann M, Leyh R, Massoudy P, Neuhäuser M, Aleksic I, Kamler M, et al. Prognostic significance of multiple previous percutaneous coronary interventions in patients undergoing elective coronary artery bypass surgery. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):I441-7.
6. Thielmann M, Neuhauser M, Knipp S, Kottenberg-Assenmacher E, Marr A, Pizanis N, et al. Prognostic impact of previous percutaneous coronary intervention in patients with diabetes mellitus and triple-vessel disease undergoing coronary artery bypass surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007;134(2):470-6.
7. Ueki C, Sakaguchi G, Akimoto T, Shintani T, Ohashi Y, Sato H. Influence of previous percutaneous coronary intervention on clinical outcome of coronary artery bypass grafting: a meta-analysis of comparative studies. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2015;20(4):531-7.
8. Yap CH, Yan BP, Akowuah E, Dinh DT, Smith JA, Shardey GC, et al. Does prior percutaneous coronary intervention adversely affect early and mid-term survival after coronary artery surgery? *JACC Cardiovasc Interv*. 2009;2(8):758-64.
9. Borges JC, Lopes N, Soares PR, Góis AF, Stolf NA, Oliveira SA, et al. Five-year follow-up of angiographic disease progression after medicine, angioplasty, or surgery. *J Cardiothorac Surg*. 2010 Oct 26;5:91.
10. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paeppe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002 June 18;3(7):RESEARCH0034.
11. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
12. Wu M, Gu X, Li X, Li Y, Zhou H, Lu G, et al. C-reactive protein and inflammatory cytokines during percutaneous coronary intervention. *J Vasc Res*. 2016;53(1-2):39-48.
13. Yoneda S, Abe S, Kanaya T, Oda K, Nishino S, Kageyama M, et al. Late-phase inflammatory response as a feature of in-stent restenosis after drug-eluting stent implantation. *Coron Artery Dis*. 2013;24(5):368-73.
14. Kim WJ, Kang YJ, Suk K, Park JE, Kwon BS, Lee WH. Comparative analysis of the expression patterns of various TNFSF/TNFRSF in atherosclerotic plaques. *Immunol Invest*. 2008;37(4):359-73.
15. Depre C, Ribichini F, Wijns W. Morphological analysis of atherosclerotic plaque retrieved by coronary atherectomy. *Semin Interv Cardiol*. 2000;5(4):175-84.
16. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(9):745-56.
17. Gerdes N, Seijkens T, Lievens D, Kuijpers MJ, Winkels H, Projahn D, et al. Platelet CD40 exacerbates atherosclerosis by transcellular activation of endothelial cells and leukocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(3):482-90.
18. Wang P, Mariman E, Renes J, Keijzer J. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *J Cell Physiol*. 2008;216(1):3-13.
19. Kuryszko J, Slawuta P, Sapikowski G. Secretory function of adipose tissue. *Pol J Vet Sci*. 2016;19(2):441-6.
20. Lee WH, Kim SH, Lee Y, Lee BB, Kwon B, Song H, et al. Tumor necrosis factor receptor superfamily 14 is involved in atherogenesis by inducing proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(12):2004-10.
21. Schuett H, Luchtefeld M, Grothusen C, Grote K, Schieffer B. How much is too much? Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2009;102(2):215-22.
22. Hartman J, Frishman WH. Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy. *Cardiol Rev*. 2014;22(3):147-51.
23. Kazmierczak E, Grajek S, Kowal J, Chmara E, Grygier M, Pyda M, et al. Prognostic usefulness of IL-6 and VEGF for the occurrence of changes in coronary arteries of patients with stable angina and implanted stents. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(15):2169-75.
24. Szkodziniski J, Blazelonis A, Wilczek K, Hudzik B, Romanowski W, Gasior M, et al. The role of interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in predicting restenosis within stented infarct-related artery. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2009;22(2):493-500.



Este é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos da licença de atribuição pelo Creative Commons