

# Alterações estruturais e moleculares (cDNA) precoces em veias safenas humanas cultivadas sob regime pressórico arterial

*Precocious structural and molecular (cDNA) changes in the human saphenous veins cultivated under arterial hemodynamic conditions*

Luís Alberto O. DALLAN, Ayumi A. MIYAKAWA, Luiz Augusto LISBOA, Carlos Alberto ABREU FILHO, Luciene CAMPOS, Thaiz BORIN, José Eduardo KRIEGER, Sérgio Almeida de OLIVEIRA

RBCCV 44205-680

## Resumo

**Objetivo:** A veia safena (VS) empregada na revascularização do miocárdio (RM) fica submetida a estresse tênsil elevado e contínuo. Sua resposta adaptativa à nova condição hemodinâmica pode predispor à oclusão do enxerto. Este trabalho visou verificar as alterações estruturais precoces e moleculares (cDNA) entre VS humanas submetidas a baixo regime pressórico versus condições hemodinâmicas sistêmicas.

**Método:** Quarenta segmentos de VS foram cultivados “*ex vivo*” sob condição hemodinâmica venosa (CHV) (sem pressão, fluxo: 5 ml/min) e sob condição hemodinâmica arterial (CHA) (pressão: 80 mmHg, fluxo: 50 mL/min). Foram analisadas: viabilidade celular (coloração MTT), densidade celular (coloração hoechst 33258) e apoptose (ensaio TUNEL), antes e um, dois e quatro dias após o procedimento. Determinamos alvos moleculares alterados precocemente nas veias cultivadas sob condição arterial, através da análise “cDNA microarray” de segmentos das VS. A busca desses alvos foi realizada através de pool homogeneizado do RNA desses segmentos venosos, interagindo por homologia em lâmina contendo 16000 genes humanos pré-determinados (Agilent Technologies slide). Os genes com expressão alterada foram certificados por PCR em tempo real, em veias de 16 diferentes indivíduos.

**Resultados:** Houve diminuição gradual da densidade celular e da viabilidade tecidual nas VS cultivadas mediante

CHA, enquanto nenhuma alteração ocorreu quando a veia foi cultivada até quatro dias na CHV. No grupo sob CHA houve sinais de processo apoptótico celular (TUNEL-positivo) já a partir do 1º dia de cultivo, o que não ocorreu no outro grupo. A densidade celular das veias sob regime arterial, decorridas 24h de cultivo, era similar à das amostras frescas das mesmas, mas inúmeras células já apresentavam indícios de processo apoptótico. Os alvos moleculares mais alterados (de acordo com o PCR em tempo real) e selecionados para pesquisa foram o Oncogene 3 e a Interleucina 1β. A expressão do Oncogene 3 estava elevada em 11 (68,7%) das veias cultivadas sob regime arterial, enquanto observou-se aumento da expressão da Interleucina 1β em nove (56,2%) desses segmentos venosos ( $p < 0,05$ ).

**Conclusão:** O modelo de estudo “*ex vivo*” permitiu mimetizar os eventos iniciais sofridos “*in vivo*” pela VS utilizada na RM. No grupo CHA houve perda de viabilidade precoce das células (apoptose) e elevação significativa nas expressões gênicas do Oncogene 3 e da Interleucina 1β. O seguimento em longo prazo desses pacientes poderá esclarecer o real papel dessas alterações precoces na perviabilidade desses enxertos venosos.

**Descritores:** Revascularização miocárdica. Veia safena. Expressão gênica.

Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor HC-FMUSP).

Endereço para correspondência: Dr. Luís Alberto Dallan. Av. Dr Enéas Carvalho de Aguiar, 44, 2º andar, Bloco II sala 11 – Jd. América. São Paulo – SP – CEP: 05403-000. Fone: (11) 3069-5234 - Fax: (11) 3069-5014. E-mail: dcidallan@incor.usp.br.

Artigo recebido em abril de 2004  
Artigo aprovado em junho de 2004

**Objective:** The saphenous vein (SV) used in coronary artery bypass grafting is submitted to elevated and continuous shear stress. Occlusion of the grafts can occur in response to the new hemodynamic conditions. The aim of this study is to compare the precocious structural and molecular (cDNA) changes in saphenous veins grafts submitted to low pressure hemodynamic conditions versus systemic hemodynamic conditions.

**Method:** Forty sections of SV were cultivated “*ex-vivo*” under venous hemodynamic conditions (VHC) (without pressure, flow: 5 mL/min) and under arterial hemodynamic conditions (AHC) (pressure: 80 mmHg, flow: 50 mL/min). The following variables were analyzed: cellular viability (MTT assay) cellular density (hoeschst 33258 staining) and apoptosis (TUNEL assay), before and 1, 2 and 4 days after the procedure. “cDNA microarray” analysis of the SV sections was used to determine the precociously changed molecular targets in the veins cultivated under arterial conditions. The identification of these targets was achieved using a RNA homogenized pool of these vein sections, interacting on slides with 16,000 pre-determined human genes (Agilent Technologies slide). The genes with changed expressions were verified by real time PCR in the veins of 16 patients.

**Results:** There was a gradual reduction in the cellular density and in the tissue viability in the saphenous veins cultivated

under AHC, whereas no alterations were observed in the saphenous veins cultivated under VHC up to 4 days. In the AHC group there were signs of a cellular apoptotic process (positive – TUNEL) from the first day after cultivation. In the VHC group these alterations were not observed. Although the cellular density was the same in the veins submitted to arterial conditions, after 24 hours of cultivation, many cells already showed signs of the apoptotic process. The Oncogene 3 and the Interleucin 1 $\beta$  were the most common sites with alterations identified in this research. The Oncogene 3 expression was elevated in 11 (68.7%) of the veins cultivated under AHC, and the Interleucin 1 $\beta$  expression was elevated in 9 (56.2%) of these vein sections ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The “*ex vivo*” study model was able to mimic events that occur “*in vivo*” by SVs utilized in the coronary artery bypass grafting. In the AHC group precocious loss of cellular viability (apoptosis) and significant elevation in the Oncogene 3 and Interleucin 1 $\beta$  genic expressions were observed. The long-term follow up of these patients is important to determine the real effect of these immediate changes in the patency of the vein grafts.

**Descriptors:** Myocardial revascularization. Saphenous Vein. Gene Expression.

## INTRODUÇÃO

A operação de revascularização do miocárdio é um dos procedimentos cirúrgicos mais realizados atualmente, devido a sua eficiência no tratamento da insuficiência coronária, promovendo alívio dos sintomas de angina e aumentando a expectativa de vida dos pacientes.

Segmentos de veia safena autógena são os enxertos mais comumente empregados na revascularização do miocárdio, visando restabelecer o fluxo coronário. Apesar da grande efetividade do procedimento, esses vasos podem com o tempo sofrer processo degenerativo, especialmente de origem aterosclerótica, comprometendo os resultados cirúrgicos. Durante o primeiro ano após a operação de revascularização do miocárdio, até 15% dos enxertos de veia safena podem ocluir-se. Nos cinco anos seguintes, esta taxa passa para 1 a 2% ao ano; ao final de 10 anos, apenas 60% dos enxertos de veia safena encontram-se pérvios, sendo que destes apenas 50% estarão livres de lesões ateroscleróticas [1].

O elevado índice de progressão da doença aterosclerótica nos enxertos de veia safena e nas artérias coronárias nativas gera importantes repercussões clínicas.

Até 20% dos pacientes podem apresentar episódios de angina durante o primeiro ano após a operação e 4% destes apresentam recorrência deste sintoma durante os cinco anos subsequentes [2]. Como conseqüência, aproximadamente 31% dos pacientes necessitam ser submetidos à nova revascularização miocárdica, por procedimentos percutâneos ou cirúrgicos decorridos 12 anos da operação inicial.

Os principais fatores relacionados à falência dos enxertos de veia safena são: o trauma cirúrgico durante a dissecação e o preparo do enxerto, a resposta adaptativa do enxerto ao fluxo sanguíneo arterial e a ativação de respostas inflamatórias e de coagulação [1].

O enxerto venoso fica submetido a estresse tênsil elevado e contínuo devido ao regime de pressão arterial sistêmica, levando a uma maior deformação radial e uma maior força de cisalhamento (“shear stress”). Essa variação hemodinâmica passa a atuar na função endotelial, influenciando no tônus vascular, na secreção hormonal e na regulação gênica de diversas proteínas [3].

Neste trabalho, foi desenvolvido um sistema que permitiu submeter a veia safena a diferentes regimes pressóricos, mimetizando situações de pressão venosa e arterial no seu interior. O objetivo deste trabalho foi averiguar a ocorrência

de alterações celulares e genéticas (cDNA) decorrentes dos diferentes regimes hemodinâmicos vigentes.

## MÉTODO

### Veia safena

Quarenta segmentos de veia safena foram obtidos de pacientes submetidos eletivamente à cirurgia de revascularização do miocárdio. Foram realizados cortes histológicos e extração de RNA e proteína desses segmentos. Este protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética do HC-FMUSP (SDC – 1834/01/22).

### Sistema de cultura da veia safena

O método de cultura da veia safena foi adaptado a partir do sistema de capilares artificiais (CELLMAX - Spectrum laboratories), substituindo-se o cartucho contendo os capilares por uma cuba, onde a veia safena era mantida (Figura 1). Foi também acoplado um regulador de pressão, que permitiu o controle de pressão e de fluxo de maneira independente (Figura 2).

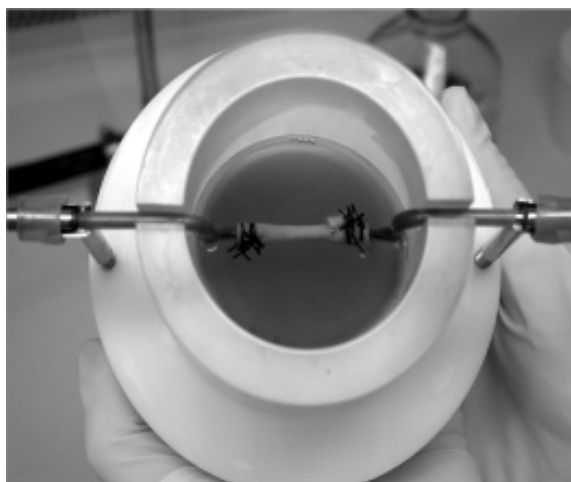


Fig. 1 - Sistema de cultivo "ex vivo" da veia safena

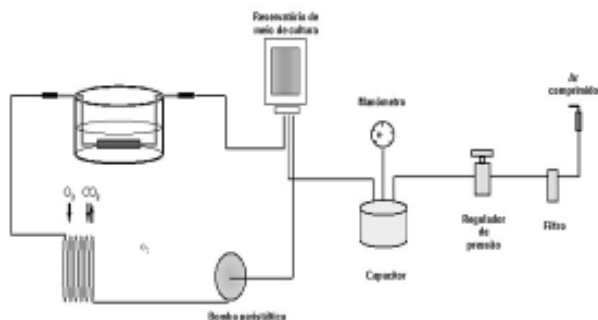


Fig. 2 - Representação esquemática do sistema de cultura "ex vivo", que permite o controle de pressão e de fluxo pela veia safena

Os quarenta segmentos de veia safena foram cultivados "ex vivo" sob condição hemodinâmica venosa (sem pressão, fluxo: 5 ml/min) e sob regime hemodinâmico arterial (pressão: 80 mmHg, fluxo: 50 ml/min;).

Foram analisadas: viabilidade celular (coloração MTT), densidade celular (coloração hoechst 33258) e apoptose (ensaio TUNEL), antes e um, dois e quatro dias após o procedimento. Após este período, foram coletados segmentos venosos para a realização de análise histológica. O "cDNA microarray" foi obtido utilizando-se RNA de tecidos cultivados por um dia.

### Análise histológica

Os segmentos de veia safena foram preparados em formalina tamponada a 4% por um período de 24 a 48 horas. Após este período, o material foi processado e incluído em parafina, sendo cortado em micrótomo na espessura de 5 µm. Os cortes foram, então, corados com hematoxilina-eosina, que permitiu a visibilização da integridade do tecido com coloração azul no núcleo e rosa no citoplasma e com Verhoeff-van Gienson (VVG) para visibilização das lâminas elásticas.

Os núcleos celulares foram também estudados através da coloração com hoechst para avaliação da densidade celular e ensaio de TUNEL para verificar processos apoptóticos.

### Coloração nuclear com Hoechst

Os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33258 (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO). Os cortes de tecido foram desparafinizados e tratados com 0,5% de triton X-100 por 15 minutos a 20° C. A reação de coloração foi realizada com 20 µg/ml de Hoechst 33258 diluído tampão de reação (mmol/l): NaCl 137, KCl 5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,4, NaHCO<sub>3</sub> 4, glicose 5,5, MgCl<sub>2</sub> 2, EGTA 2, PIPES, pH 6,1. A visibilização dos cortes foi realizada utilizando microscópio de fluorescência.

### Ensaio de TUNEL

A fragmentação de DNA foi observada utilizando o "In Situ Cell Death Detection kit, AP" (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) de acordo com as instruções especialmente preconizadas pelos produtores. Os cortes foram desparafinizados e permeabilizados com 0,5% de triton X-100 em 0,1% de citrato de sódio. A reação com a transferase de desoxinucleotidil terminal e a conversão da fosfatase alcalina foram realizadas e os cortes visibilizados em microscópio de luz.

### Coloração com MTT

Para verificar sua viabilidade, os segmentos de veia safena foram incubados por uma hora a 37°C, com 0,5 mg/ml de tetrazolio de metiltiazol (MTT). O MTT tem a propriedade de colorir a mitocôndria ativa de células vivas, corando-as em azul escuro.

#### “cDNA microarray”

O RNA total foi extraído das amostras por método que utiliza o reagente Trizol (Gibco BRL). Seguiu-se tratamento da amostra com DNase, visando eliminar possíveis contaminações de DNA genômico. A partir das amostras de RNA foram produzidos cDNAs marcados com fluorescência (Cy3 e Cy5) e hibridizados em lâminas contendo um painel de cDNAs humanos. Os sinais fluorescentes foram lidos e as diferenças de intensidade foram calculadas para as duas populações de transcritos.

Foi utilizado o 3DNA™ Submicro™ EX Array Detection Kit (Genishere Inc.) para obter os cDNAs marcados, conforme instruções do fabricante. Primeiro, foi realizada a transcrição reversa de 4 µg de RNA total, utilizando oligo dT, contendo seqüência de captura específica para cada molécula 3DNA fluorescente. Os cDNAs gerados foram hibridizados em uma lâmina contendo dois “arrays” com 16000 cDNAs humanos (Agilent Technologies) a 55°C por 15 horas. Em seguida, foi realizada a hibridização dos reagentes fluorescentes 3DNA para a formação do complexo cDNA/3DNA.

#### Quantificação de expressão gênica utilizando RT-PCR em tempo real

O RT-PCR em tempo real é a combinação do PCR com técnicas fluorescentes. Sua determinação em tempo real foi realizada utilizando-se o kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), tendo sido adicionado à reação um intercalante de DNA dupla fita, o SYBR Green I. Assim, a quantidade de produto de PCR na reação é diretamente proporcional à geração de um sinal fluorescente. A intensidade de fluorescência é monitorada após cada ciclo do PCR, o que possibilita a análise durante a fase exponencial da reação. Para obter resultados reprodutíveis e com exatidão, a eficiência da reação deve ser próxima a 100%, ou seja, a quantidade de DNA duplica após cada ciclo da fase exponencial. A curva padrão foi construída e o valor da inclinação da reta permitiu o cálculo da eficiência da reação. Além disso, foi realizada a curva de dissociação para verificar a pureza do produto formado, ou seja, se existia mais de um tipo amplificado formado na reação. A curva de dissociação avalia a dissociação da dupla fita de DNA com o aumento da temperatura, e o produto presente na reação é considerado puro quando apenas uma única temperatura de dissociação é encontrada.

Visando determinar alvos moleculares alterados precocemente nas veias cultivadas sob condições arteriais, procedeu-se à análise “microarray” do cDNA de segmentos das VS cultivadas por um dia. A busca desses alvos foi realizada através de pool homogêneo do RNA desses segmentos venosos, interagindo por homologia em lâmina contendo 16000 genes humanos pré-determinados (Agilent Technologies slide). As expressões mais alteradas do cDNA das veias de cada grupo foram, então, determinadas por

coloração preestabelecida e pesquisadas em veias de 16 diferentes indivíduos.

#### RESULTADOS

##### Caracterização do sistema “*ex vivo*” de cultura de veia safena humana

A coloração por hematoxilina-eosina permitiu verificar que o número de núcleos corados diminuiu gradativamente nas safenas cultivadas por um a quatro dias em regime arterial. Por outro lado, nenhuma alteração foi verificada nos segmentos cultivados em regime venoso (Figura 3). Este mesmo resultado foi verificado através da coloração nuclear com hoechst 33258. A densidade celular gradativamente diminuiu nos segmentos cultivados por um a quatro dias em regime arterial, enquanto que a densidade celular permaneceu inalterada naqueles cultivados em regime venoso (Figura 4).

Visando pesquisar a viabilidade tecidual, foram realizadas colorações com MTT como controle em segmentos teciduais frescos (retirados antes do início da cultura) e em segmentos mortos (por exposição à baixa temperatura). Pode-se verificar que os fragmentos frescos foram completamente corados e os fragmentos mortos não apresentaram coloração pelo MTT (Figura 5).

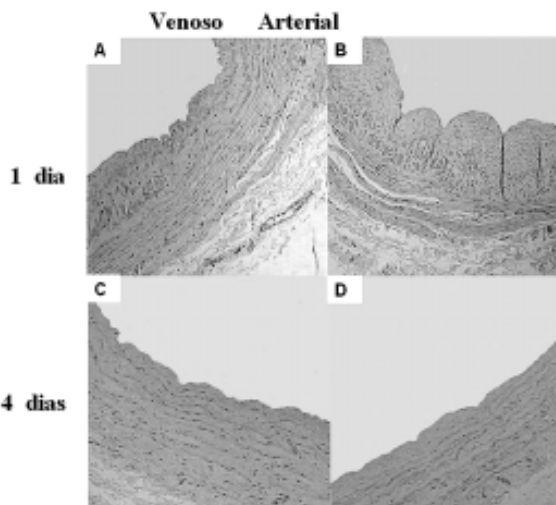


Fig. 3 - Cortes histológicos de veia safena cultivada por 1 (A,B) e 4 (C,D) dias, em regime hemodinâmico venoso (A,C) e arterial (B,D) (aumento de 100X). A coloração através da Hematoxilina-Eosina mostra diminuição gradual no número de núcleos corados no grupo submetido a regime arterial, o que não ocorre no grupo sob regime venoso

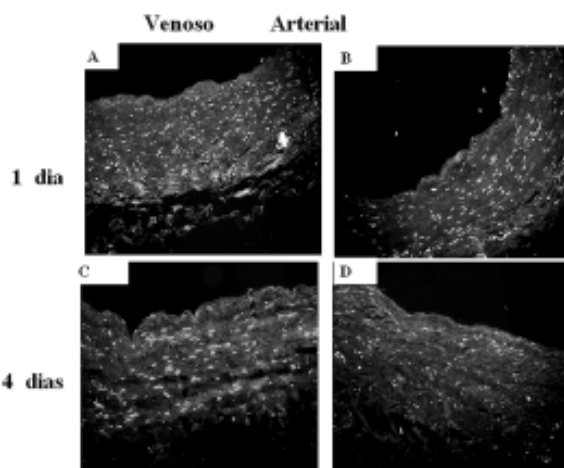


Fig. 4 - Coloração com Hoechst 33258 de veia safena cultivada por um (A,B) e quatro (C,D) dias, em regime hemodinâmico venoso (A,C) e arterial (B,D) (aumento de 100X). Observa-se manutenção da densidade celular nas veias safenas do grupo sob regime venoso (A,C), enquanto há diminuição dessa densidade no grupo sob regime arterial (B,D)

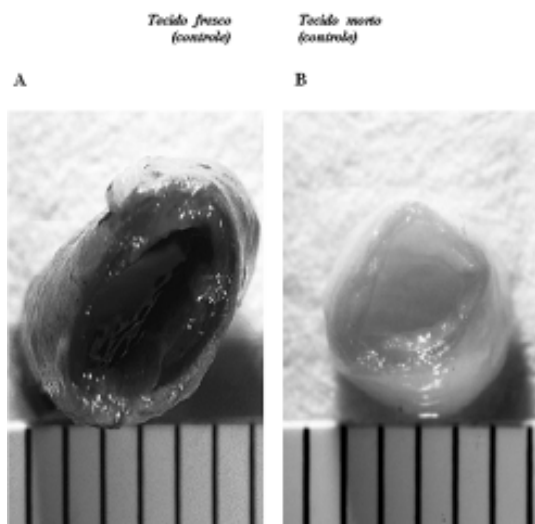


Fig. 5 - Coloração controle de veia safena com MTT, para estabelecimento da viabilidade tecidual: A- Veia safena fresca, que adquire coloração homogênea. B- Tecido morto de veia safena (através de refrigeração). Não houve coloração pelo MTT

Baseado nessa propriedade da coloração MTT, procedeu-se à pesquisa de viabilidade tecidual em nossas amostras de veia safena. Pode-se observar que os segmentos de veia safena submetidos a regime hemodinâmico venoso apresentavam células viáveis em toda parede vascular, quando cultivados por um, dois ou quatro

dias. Já os segmentos de veia cultivados por quatro dias em regime arterial apresentavam ausência de coloração com MTT em algumas porções da parede vascular, sugerindo a morte celular nestas regiões (Figura 6).

Por fim, foi realizado o ensaio de TUNEL para verificar se esta diminuição na densidade e viabilidade celular, observada nas veias safenas cultivadas por 4 dias em regime arterial, decorreu de processo apoptótico. Não foi verificada fragmentação significativa de DNA nas veias safenas cultivadas em regime venoso. As veias cultivadas em regime arterial, entretanto, apresentaram grande quantidade de células apoptóticas quando cultivadas por um ou dois dias (Figura 7).

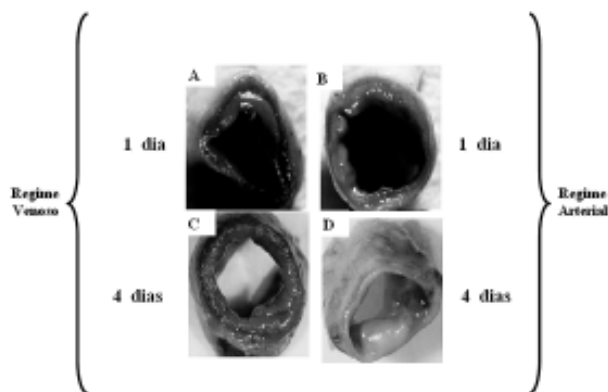


Fig. 6 - Pesquisa de viabilidade tecidual pela coloração MTT em segmentos de veia safena cultivados por um (A,B) e quatro (C,D) dias. Observa-se presença de células viáveis em toda parede vascular quando cultivada em regime pressórico venoso (A,C). As veias do grupo sob regime arterial (B,D) apresentam porções não coradas pelo MTT, sugerindo morte celular nessas regiões

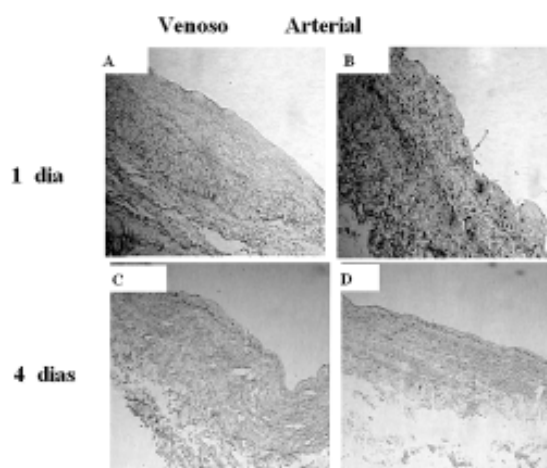


Fig. 7 - Ensaio de TUNEL para estudo de apoptose celular em veias safenas cultivadas por um (A,B) e quatro (C,D) dias, sob regime hemodinâmico venoso (A,C) e arterial (B,D) (aumento de 100X). Somente as veias cultivadas sob regime arterial apresentam grande quantidade de apoptose celular

**Estudo das alterações moleculares da veia safena cultivada em regime hemodinâmico arterial – expressão de interleucina-1 beta (IL-1β) e do oncogene GRO3**

As alterações moleculares das veias safenas cultivadas por um dia sob regime hemodinâmico arterial, observadas através do “cDNA microarray”, estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Genes selecionados em experimento de “cDNA microarray” realizado em veia safena cultivada em regime hemodinâmico venoso (fluxo: 5 ml/min) e arterial (fluxo:50 ml/min, pressão: 80 mmHg) por 1 dia. A lâmina utilizada possui dois arrays (A e B) contendo 16000 cDNAs humanos.

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	1,6	1,7
Oncogene GRO1	2,4	2,6
Interleucina 6 – interferon, beta2	2,2	1,99
Interleucina 1, beta (IL 1β)	2,4	2,5
Inibidor de serina (ou cisteína) proteinase	1,7	2,2
Interleucina 1, beta (IL 1β)	2,1	2,0
Fator de necrose tumoral, proteína induzida 3 alfa	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

Dentre os genes que apresentaram expressão diferenciada em veia safena cultivada por um dia em regime arterial, destacam-se basicamente as citocinas, todas envolvidas com processo tumoral.

Dentre os alvos moleculares mais alterados, foram selecionados para a pesquisa a Interleucina- 1β e o Oncogene

GRO3 (Figura 8). A expressão da Interleucina- 1β estava aumentada em nove (56,2%) das veias cultivadas sob regime arterial, enquanto houve elevação da expressão do Oncogene 3 em 11 (68,7%) desses segmentos venosos (p<0,05).

COMENTÁRIOS

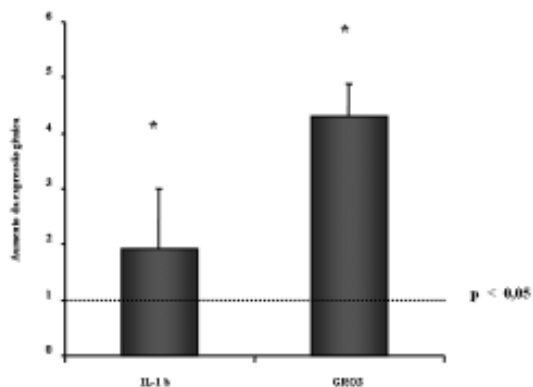


Fig. 8 - Análise de expressão gênica por metodologia quantitativa (RT-PCR) em tempo real. O gráfico representa valores da expressão da veia safena cultivada em regime hemodinâmico arterial em relação aos valores da veia safena cultivada em regime venoso (linha tracejada). Observa-se elevação da expressão da Interleucina 1β e do Oncogene 3 nas veias cultivadas sob condição arterial

A falência dos enxertos de veia safena utilizados na revascularização do miocárdio está envolvida com múltiplos fatores. A oclusão precoce, dentro dos primeiros 30 dias após a operação, é habitualmente resultante de trombose, que pode ser originada por fatores como: diâmetro reduzido ou leito distal desfavorável da artéria coronária revascularizada, gerando redução do fluxo sanguíneo e aumentando o risco de trombose do enxerto [4].

O desenvolvimento de hiperplasia da camada íntima, de forma difusa e concêntrica, é observado nos enxertos de veia safena de pacientes que evoluíram com recidiva dos sintomas anginosos após a revascularização do miocárdio, necessitando ser reoperados. RATLIFF e MYLES [5] detectaram a presença de hiperplasia em 99% dos enxertos de veia safena, analisados em série de 100 pacientes submetidos à reoperação de revascularização do miocárdio.

A manipulação cirúrgica durante a dissecação e preparo do enxerto venoso pode causar lesão endotelial e alteração das vias tromborregulatórias. A perda da integridade endotelial pode gerar agregação de células sanguíneas e plaquetas, e alterar a homeostase da parede vascular do enxerto. A lesão das células endoteliais leva à redução da liberação local de óxido nítrico e prostaciclina, elevando a adesão e a agregação plaquetária. A ativação plaquetária

leva à liberação de fatores pró-coagulantes e vasoconstritores, os quais estimulam a proliferação de “medial vascular smooth muscle cells” (VSMC) e a migração celular para a camada íntima do enxerto [6].

A elevada pressão hidrostática ocasionada durante a preparação do enxerto pode gerar necrose da VSMC da camada média. Os períodos de isquemia/reperfusão ocasionados durante a implantação do enxerto promovem a infiltração de células inflamatórias na parede do enxerto. Estas células inflamatórias secretam citocinas e fatores de crescimento, estimulando a proliferação e migração de VSMC para a camada média do enxerto. A perda da integridade endotelial é o fator central do processo de degeneração do enxerto venoso. Mesmo após a reconstituição da integridade endotelial, o processo de remodelamento vascular é mantido em menor escala [7].

Por outro lado, o sucesso do enxerto também depende da capacidade de adaptação do vaso que passa de um regime venoso, de baixa pressão, para um regime arterial, de maior pressão e fluxo pulsátil. Essa nova condição pressórica traz ao tecido venoso forças hemodinâmicas que passam a influenciar diretamente o tônus vascular e a regulação gênica de diversas proteínas. O comportamento vascular é bastante dependente da função endotelial e entre os fatores hemodinâmicos o “shear stress” é a principal força agindo no endotélio [3]. O mecanismo pelo qual o endotélio detecta o “shear stress” ainda não está completamente esclarecido, mas existem várias evidências demonstrando que o “shear stress” participa ativamente da homeostasia vascular através da regulação e liberação de proteínas endoteliais. Um exemplo disto é que as lesões ateroscleróticas freqüentemente aparecem em regiões de bifurcação vascular, onde o padrão de fluxo é alterado, tornando-se turbulento e com diminuição do “shear stress” [8]. O “shear stress” diminuído parece favorecer o aparecimento da aterosclerose através da regulação da expressão de genes que participam do mecanismo de controle da estrutura e função vascular. Especula-se que o baixo “shear stress” possibilita a adesão de leucócitos e monócitos através do aumento da expressão de moléculas de adesão como VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular), além da transmigração através da expressão de proteínas quimiotáticas como MCP-1 (proteína quimiotática de monócito) [9]. O “shear stress” reduzido aumenta, também, a produção de fatores mitogênicos como a endotelina-1. Além disto, o “shear stress” reduzido diminui, nessas regiões, a secreção de inibidores da proliferação vascular como o óxido nítrico (ON) e o TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformante- $\beta$ ) [10] e propicia condições favoráveis à proliferação das células musculares.

Em nosso meio, RIEDER et al. [11] demonstraram que o “shear stress” diminui a atividade e a expressão da ECA e esta resposta é mediada por duas seqüências regulatórias,

Barbie-box e GAGA-box, localizadas no intervalo entre -288 e -232 pb do promotor da ECA de rato [12]. Isto reforça a idéia de que na região de bifurcação vascular, onde o “shear stress” é diminuído, ocorre um aumento da produção de ECA, aumentando a disponibilidade local de Ang II. A Ang II pode iniciar ou potencializar a injúria vascular através de efeito mitogênico ou pelo aumento da oxidação da LDL e a expressão de seu receptor LOX-1 em células endoteliais. Desta maneira, a ECA pode ser postulada como um gene de susceptibilidade no desenvolvimento da aterosclerose e, corroborando com esta idéia, diversos estudos mostram a sua presença em lesões ateroscleróticas, principalmente em macrófagos e em células endoteliais de microvasos presentes na lesão, bastante eficientes em reduzir o desenvolvimento da aterosclerose [13]. Apesar de não se conhecer seu mecanismo de ação, tem-se postulado que a atuação desses inibidores da ECA possa ocorrer através de efeitos antiproliferativos na camada muscular vascular [14], de inibição da agregação plaquetária [15] e de atenuação da oxidação da LDL [16].

Da mesma maneira, que o aparecimento da aterosclerose parece estar relacionado com o padrão de fluxo local, a oclusão das pontes de safena pode estar relacionada com a súbita alteração hemodinâmica imposta ao vaso. Existem estudos “*ex vivo*” mostrando que o fluxo arterial na veia safena diminui a concentração e a atividade funcional da trombomodulina [17], proteína que confere característica antitrombogênica ao endotélio, altera a expressão da eNOS (ON sintase endotelial) e das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 [18], influenciando na adesividade do endotélio às plaquetas e aos monócitos.

Um fato interessante que ocorre no enxerto venoso interposto em artéria é a indução de processo apoptótico. A redução do fluxo sanguíneo no enxerto venoso pode ser causada pela diminuição acentuada do calibre da artéria coronária em relação ao diâmetro do enxerto venoso, e ao padrão desfavorável do leito distal da artéria coronária revascularizada, não permitindo a adequada vazão do fluxo sanguíneo [4].

Diversos estudos demonstram a indução da apoptose celular em enxertos venosos interpostos em artérias. A interposição de veia safena em artéria carótida de porco apresenta um pico apoptótico após oito horas do enxerto. Já a taxa de proliferação celular da camada média do vaso apresentou-se baixa durante o período do estudo de 48 horas. 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 cinco-sete dias [19]. 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. Isto pode ser confirmado quando uma membrana de politetrafluoretileno é posicionada de maneira a envolver o enxerto venoso, reduzindo a tensão e o estiramento da parede do vaso, com diminuição significativa da taxa de apoptose no enxerto [20].

No sistema “*ex vivo*” apresentado neste trabalho, foi demonstrado que a densidade celular e a viabilidade tecidual diminui gradualmente quando a veia safena é cultivada em regime hemodinâmico arterial, enquanto nenhuma alteração morfológica ou de viabilidade foi observada nas veias cultivadas em regime venoso por até quatro dias. É interessante notar que as veias safenas cultivadas em regime arterial por um dia apresentaram densidade celular semelhante aos fragmentos frescos, porém várias destas células apresentaram fragmentação de DNA, indicando a presença de processo apoptótico (Figuras 3 e 5). Este evento pode explicar a perda celular observada nos fragmentos de veia safena cultivados em regime arterial.

O remodelamento vascular é resultado do balanço entre a morte e a proliferação celular. No enxerto venoso em leito arterial, a apoptose ocorre em resposta ao aumento do estresse mecânico e é contrabalançado pelo subsequente processo de proliferação celular. No nosso sistema “*ex vivo*”, a ausência de proliferação celular na veia safena cultivada em regime arterial pode ser explicada pela necessidade de componentes provenientes da circulação sanguínea, que não estão presentes no meio de cultura, ou ainda, pela necessidade de um tempo maior do que quatro dias de cultura. Ainda que o evento de proliferação não tenha sido observado, verificamos que em nosso sistema de cultura “*ex vivo*” estão sendo reproduzidos os fenômenos que ocorrem “*in vivo*”, mostrando que este sistema é um bom modelo para o estudo das modificações que ocorrem na ponte de safena.

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 processo aterosclerótico. Este processo pode estar relacionado com a regulação de fatores de crescimento como PDGF e TGF- $\beta$ , componentes da cascata das MAP quinases como p38, fatores de transcrição como E2F e proteínas que compõem e degradam a matriz extracelular como, respectivamente, tenascin-C e MMPs (metaloproteinases de matriz) [21]. 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.

Atualmente, dispomos de estratégias para análise global de milhares de genes simultaneamente. Dentre elas podemos

destacar o “differential display”, o seqüenciamento aleatório de bibliotecas de cDNA, o SAGE (“serial analysis of gene expression”) e o “cDNA microarray”. O maior conhecimento a respeito dos genes envolvidos no processo aterosclerótico dos enxertos vem possibilitando o desenvolvimento da terapêutica genética.

Neste trabalho desenvolvemos um sistema “*ex vivo*” de cultura de veia safena que permitiu analisar o comportamento vascular em condições hemodinâmicas controladas por períodos de até quatro dias. O estudo foi realizado cultivando a veia safena em regime hemodinâmico arterial para simular a condição a que a veia é submetida após o processo de revascularização miocárdica. Esse sistema mostrou-se adequado como modelo para o estudo das modificações que ocorrem na ponte de safena, uma vez que estão sendo reproduzidos os fenômenos que ocorrem “*in vivo*”. Além disso, utilizando a tecnologia de “cDNA microarray” identificamos dois genes, IL-1 $\beta$  (interleucina-1 $\beta$ ) e GRO3 (oncogene 3), que podem estar participando no processo de arterialização do enxerto venoso. Uma futura atuação sobre os mesmos pode contribuir para maior patência do enxerto.

As alterações moleculares das veias safenas cultivadas por um dia sob regime hemodinâmico arterial, observadas através do “cDNA microarray”, foram apresentadas na Tabela 1. Dentre os genes que apresentaram expressão diferenciada em veia safena cultivada por um dia em regime arterial, destacam-se basicamente as citocinas, todas envolvidas com processo tumoral. Neste contexto, a resposta de proliferação celular na parede do vaso mimetiza aspectos comuns àqueles observados no desenvolvimento de neoplasias com ativação de fatores de crescimento, decorrentes do aumento de estresse. Infelizmente, este é um processo pouco conhecido e que evolui para desenvolvimento de lesão aterosclerótica e oclusão do enxerto em um número significativo de pacientes.

É de fundamental importância o esclarecimento das bases fisiopatológicas do processo aterosclerótico dos enxertos de veia safena. Os estudos a respeito das alterações histológicas e moleculares envolvidas podem propiciar o desenvolvimento de alternativas terapêuticas eficazes no intuito de reduzir o índice de reoperações de revascularização do miocárdio.

O maior conhecimento a respeito dos genes envolvidos no processo aterosclerótico dos enxertos venosos propiciou o desenvolvimento da terapêutica gênica no intuito de controlar este processo. Os primeiros relatos da transferência de material genético exógeno para o sistema vascular foram descritos no final da década de 80 [22]. Existem duas alternativas de abordagem da terapêutica gênica. Uma delas consiste na introdução direta de um gene na célula, fazendo com que esta produza uma determinada proteína. A outra é a



indução de oligonucleotídeos anti-senso, os quais agem como decodificadores e bloqueiam a produção de proteínas [1].

O sucesso da terapêutica gênica depende dos seguintes fatores: a escolha correta da terapêutica para atuar na parede vascular, a disponibilidade de um vetor seguro e eficaz para a transferência do gene e a disponibilidade de mecanismo adequado para a transferência genética.

Existem estudos em evolução a respeito da terapêutica gênica para enxertos de veias safenas. MANNION et al. [23] obtiveram 82% de redução na proliferação de células da camada média de veias safenas porcinas submetidas à terapêutica gênica com oligonucleotídeos c-myc antisense.

GEORGE et al. [24] realizaram estudo com cultura de veias safenas de seres humanos, utilizando inibidores teciduais de metaloproteases (TIMP - 1). Os autores relataram 54% de redução de neointima e 78% de redução de migração de células musculares (smooth muscle cells), após 14 dias da terapêutica.

MANN et al. [25] utilizaram oligonucleotídeos anti-senso CDC2 e PCNA em veias jugulares de coelhos interpostas com artérias carótidas. O vetor utilizado foi o herpes vírus. Os autores demonstraram redução da hiperplasia da neointima e aumento da resistência dos enxertos venosos à aterosclerose induzida por dieta.

Em nosso estudo, a confirmação da expressão gênica foi realizada utilizando uma metodologia quantitativa conhecida como RT-PCR em tempo real. Até o momento foram confirmados o aumento da expressão dos genes IL-1 $\beta$  e GRO3. O papel no processo de arterialização dos enxertos venosos e o potencial terapêutico destes dois genes precisam ser avaliados. Para isso serão utilizados futuros modelos de enxerto venoso em leito arterial de animais de experimentação e metodologias de interferência, como proteína de fusão e interferência por RNA.

## CONCLUSÕES

O modelo do estudo ‘*ex-vivo*’ associado à análise através do sistema “cDNA microarray” de segmentos de veias safenas utilizados na revascularização do miocárdio permitiu identificar a elevação do processo de apoptose e a maior expressão gênica do Oncogene 3 e da Interleucina 1 $\beta$  nas veias cultivadas sob condições pressóricas arteriais.

O esclarecimento dessas alterações genéticas presentes nos enxertos de veia safena utilizados na revascularização cirúrgica do miocárdio é de fundamental importância para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, como a terapêutica genética, para a prevenção do desenvolvimento do processo aterosclerótico do enxerto venoso.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Akowuah EF, Sheridan PJ, Cooper GJ, Newman C. Preventing saphenous vein graft failure: does gene therapy have a role? *Ann Thorac Surg* 2003;76:959-66.
- 2 Cameron A, Davis K, Rogers W. Recurrence of angina after coronary artery bypass surgery: predictors and prognosis (CASS Registry). *Coronary Artery Surgery Study. J Am Coll Cardiol* 1995;26:895-9.
- 3 Davies PF. How do vascular endothelial cells respond to flow? *News Physiol Sci* 1989;4:22-5.
- 4 Paz MA, Lupon J, Bosch X, Pomar JL, Sanz G. Predictors of early saphenous vein aortocoronary bypass graft occlusion. The GESIC Study Group. *Ann Thorac Surg* 1993;56:1101-6.
- 5 Ratliff NB, Myles JL. Rapidly progressive atherosclerosis in aortocoronary saphenous vein grafts: possible immune-mediated disease. *Arch Pathol Lab Med* 1989;113:772-6.
- 6 Groves HM, Kinlough-Rathbone RL, Mustard JF. Development of non-thrombogenicity of injured rabbit aortas despite inhibition of platelet adherence. *Arteriosclerosis* 1986;6:189-95.
- 7 Angelini GD, Passani SL, Breckenridge IM, Newby AC. Nature and pressure dependence of damage induced by distension of human saphenous vein coronary artery bypass grafts. *Cardiovasc Res* 1987;21:902-7.
- 8 Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN. Hemodynamics and atherosclerosis: insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med* 1988;112:1018-31.
- 9 Shyy YJ, Hsieh HJ, Usami S, Chien S. Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4678-82.
- 10 Ohno M., Cooke JP, Dzau VJ, Gibbons GH. Fluid shear stress induces endothelial transforming growth factor beta-1 transcription and production: modulation by potassium channel blockade. *J Clin Invest* 1995;95:1363-9.
- 11 Rieder MJ, Carmona R, Krieger JE, Pritchard Jr. KA, Greene AS. Suppression of angiotensin-converting enzyme expression and activity by shear stress. *Circ Res* 1997;80:312-9.
- 12 Miyakawa AA, Junqueira ML, Krieger JE. Identification of two novel shear stress responsive elements in rat angiotensin-I converting enzyme promoter. *Physiol Genomics*. 2004. In press.
- 13 Chobanian AV, Haudenschild CC, Nickerson C, Drago R. Antiatherogenic effect of captopril in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Hypertension* 1990;15:327-31.

- 
- 14 Daemen MJ, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res* 1991;68:450-6.
  - 15 Keidar S, Oiknine J, Leiba A, Shapira C, Leiba M, Aviram M. Fosinopril reduces ADP-induced platelet aggregation in hypertensive patients. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;27:183-6.
  - 16 Hayek T, Attias J, Smith J, Breslow JL, Keidar S. Antiatherosclerotic and antioxidative effects of captopril in apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31:540-4.
  - 17 Gosling M, Golledge J, Turner RJ, Powell JT. Arterial flow conditions downregulate thrombomodulin on saphenous vein endothelium. *Circulation* 1999;99:1047-53.
  - 18 Golledge J, Turner RJ, Harley SL, Springall DR, Powell JT. Circumferential deformation and shear stress induce differential responses in saphenous vein endothelium exposed to arterial flow. *J Clin Invest* 1997;99:2719-26.
  - 19 Yamamura S, Okadome K, Onohara T, Komori K, Sugimachi K. Blood flow and kinetics of smooth muscle cell proliferation in canine autogenous vein grafts: in vivo BrdU incorporation. *J Surg Res* 1994;56:155-61.
  - 20 Moore MM, Goldman J, Patel AR, Chien S, Liu SQ. Role of tensile stress and Strain in the induction of cell death in experimental vein grafts. *J Biomech* 2001;34:289-97.
  - 21 Leville CD, Dassow MS, Seabrook GR, Jean-Claude JM, Towne JB, Cambria RA. All-trans-retinoic acid decreases vein graft intimal hyperplasia and matrix metalloproteinase activity in vivo. *J Surg Res* 2000;90:183-90.
  - 22 Nabel EG, Plautz G, Boyce FM, Stanley JC, Nabel GJ. Recombinant gene expression in vivo within endothelial cells of arterial wall. *Science* 1989;244:1342-4.
  - 23 Mannion JD, Ormont ML, Shi Y, O'Brien JE Jr, Chung W, Roque F et al.. Saphenous vein graft protection: effects of c-myc antisense. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115:152-61.
  - 24 George SJ, Lloyd CT, Angelini GD, Newby AC, Baker AH. Inhibition of late vein graft neointima formation in human and porcine models by adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Circulation* 2000;101:296-304.
  - 25 Mann MJ, Gibbons GH, Kernoff RS, Diet FP, Tsao PS, Cooke JP et al.. Genetic engineering of vein grafts resistant to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4502-6.