

Luciene Cristina Gastalho Campos

**Identificação e caracterização de proteínas
modificadas em enxertos de veias safenas
humanas arterializadas no modelo *ex vivo***

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências.**

Área de concentração: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

São Paulo
2008

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

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

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

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

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

*Ao meu marido Wilson Luiz
Com todo meu Amor!*

*Aos meus pais, Luiz e Rita
Que me ensinaram acreditar nos sonhos!
Por todos esses anos de amor,
carinho, dedicação e incentivo!*

*Ao meu irmão Julio
Pelo companheirismo e união!*

Ao meu orientador Prof. Dr. José Eduardo Krieger, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela confiança, apoio, dedicação, por todos os recursos disponibilizados para que este trabalho pudesse ser realizado, pelos seus incansáveis esforços para viabilizar as análises proteômicas, pelos seus ensinamentos e por todo o seu conhecimento compartilhado que contribuíram para a minha formação profissional.

A minha "mãe" e querida amiga Dra. Ayumi Aúrea Miyakawa, pela sua co-orientação, ensinamentos, atenção, companhia, apoio, paciência e dedicação integral durante toda minha formação acadêmica com uma visão crítica e objetividade traduzidos na simplicidade de fazer ciência.

Ao Prof. Dr. Luís Alberto Oliveira Dallon do setor de coronariopatias do In Cor, pela atenção e dedicação dispensadas a este trabalho e pela sua valiosa contribuição com as veias sáfnas humanas.

Ao Prof. Dr. Fabio Cesar Gozzo do Laboratório de Nacional de Luz Síncrotron, pelos ensinamentos, atenção e pela colaboração nos experimentos de espectrometria de massa.

Ao meu Marido Wilson Luiz, meu maior incentivador, por todos seus esforços para me ajudar, pela sua companhia em inúmeros finais de semanas e madrugadas no laboratório. Pela sua atenção, amor, carinho, inspiração, compreensão e apoio incondicional para que meu sonho pudesse se tornar realidade!

Aos meus pais Luiz e Rita, obrigada pela abdicção de tantos sonhos para que os meus pudessem ser realizados, mas hoje acho que consegui realizar um sonho em comum. Obrigada pelo eterno amor e estímulo nos momentos mais difíceis de minha vida. Sem vocês presentes eu não conseguiria concretizar a metade dos meus sonhos e ambições. Sem vocês, tudo isso seria impossível!

Ao meu irmão Julio pelo seu amor e pelos momentos maravilhosos que você sempre me proporcionou. Obrigada por me fazer sorrir mesmo nos momentos mais difíceis e desesperadores.

A minha grande amiga, quase irmã, Thaiz Ferraz Borin, pela maravilhosa convivência desde a minha iniciação científica. Obrigada por ter tornado os momentos de trabalho os mais agradáveis e os momentos de diversões inesquecíveis. Você me deu a oportunidade de dividir todos os momentos bons e ruins que passei ao longo destes anos, me apoiando nas horas tristes e comemorando as horas felizes. Você ocupa um lugar muito especial no meu coração!

*Em especial aos amigos que fizeram ou ainda fazem parte da
"Família" do grupo da Vascular do Laboratório de Genética e
Cardiologia Molecular do In Cor,*

Ana Paula Takano,

Bruno Ctenas,

Carla Petrini,

Chester B. Sacramento,

Fernando Pacheco

Ricardo Azzolini

Thais Girão,

Thaiz Borin,

Valério Barauna,

Vinicius Bassanese e

Wendy Rios,

pela amizade e companheirismo nas horas difíceis, felizes e divertidas.

*Durante esses quatro anos é inegável a contribuição de cada um de
você para a realização deste trabalho, mas o que me faz sentir que
tudo vale à pena é conhecer pessoas tão especiais como vocês!*

As minhas queridas amigas do grupo de Terapia Celular,

Juliana Nakamuta e

Maria Elena Danoviz

*por me proporcionarem momentos de muita alegria. Obrigada por
serem minhas amigas!*

Aos meus grandes amigos,

Isabel Cristina,

Márcio Chaves,

Mariliza Velho,

Maíde e

Silvana Campos

pela convivência diária, por valiosas sugestões para o desenvolvimento desta tese e pelos momentos maravilhosos que compartilhamos juntos.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do In Cor,

Allysson Sampaio,

Kátia Gomes,

Marcilene Floriano,

Márcio Badjelman,

Renata Carmona,

Samantha Omae e

Silvia Lacchini,

pelo carinho e amizade, contribuindo desta forma no desenvolvimento desta Tese.

A Dona Antonia, Dona Odila, Janilton Alves, José Arruda e Marcus, pelo preparo dos materiais. Sempre dispostos a auxiliarem em tudo que fosse necessário. Vocês foram indispensáveis para a realização deste trabalho.

Aos meus avós,

Orlando & Jorgina

e

Rubens & Ozília (in memoriam)

e ao meu Tio Zezinho,

pelo amor e incentivo em todos os momentos e por acreditar que um dia eu realizaria meus sonhos. Com seus ensinamentos me proporcionaram segurança para sempre seguir em frente.

A FAPESP pelo apoio financeiro, tornando viável o desenvolvimento desta tese!

A Deus, que esteve todo o momento ao meu lado, me confortando nos momentos trágicos e ensinando que com paciência, persistência e dedicação não há sonho impossível.

A todos, Muito Obrigada!

Sumário

Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tabelas.....	vi
Lista de Abreviaturas	viii
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiv
1. Introdução.....	1
2. Objetivo	13
2.1 Objetivos específico.....	13
3. Materiais.....	15
3.1. REAGENTES, SAIS, DROGAS E KITS	15
3.2. EQUIPAMENTOS.....	17
3.3. ANTICORPOS.....	19
3.4. PRODUTOS PLÁSTICOS E DESCARTÁVEIS	19
4. Métodos	21
4.1. CULTIVO <i>EX VIVO</i> DE VEIA SAFENA HUMANA	21
4.1.1. Obtenção das veias safenas.....	21
4.1.2. Sistema de Cultura da veia safena.	21
4.2. PROTEOMA	24
4.2.1. Eletroforese Bidimensional (2-D).....	24
<i>4.2.1.1. Extração de Proteínas.....</i>	<i>24</i>
4.2.1.2. Focalização Isoelétrica do gel 2D (Primeira Dimensão)	25
4.2.1.3. Equilíbrio da “IPG Strip”	26
4.2.1.4. SDS-PAGE (Segunda Dimensão)	26
4.2.1.5. Análise do gel 2-D.....	27
4.2.1.6. Processamento do gel (extração da proteína de interesse do gel, digestão triptíca e extração dos Peptídeos).....	28
4.2.2. Análise de Proteoma Diferencial com ICAT (do inglês: “isotope-coded affinity tags”).....	29
4.2.3. Análise por Espectrometria de Massas.....	32
4.3. CULTURA DE CÉLULAS	33

4.3.1. Cultura primária de células de músculo liso de veia safena (SVSMC) e artéria mamária (MASMC) humana	33
4.3.2. Cultura primária de células endoteliais de veia safena (SVEC) humana	33
4.4. ESTÍMULOS FISÍCOS <i>IN VITRO</i>	34
4.4.1. Produção de “shear stress”	34
<i>Figura 4: Sistema de “cone plate” utilizado para produção de “shear stress” nas células endoteliais. O cone gira sobre as células endoteliais e o “shear stress” pode ser variado através de alterações na velocidade angular ou da viscosidade do meio de cultura.</i>	<i>35</i>
4.4.2. Produção de estiramento	35
<i>Figura 5: Sistema “Flexercell” utilizado para produção de “stretch” nas células musculares lisas. A membrana inferior da placa é estirada juntamente com as células que estão aderidas em sua superfície, provocando o estiramento das mesmas.</i>	<i>36</i>
45. MODELO DE ARTERIALIZAÇÃO DE SEGMENTO VENOSO EM RATO	36
4.5.1. Fístula artério-venosa da veia jugular em artéria carótida	36
46. TÉCNICAS DE VALIDAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS ALVO	38
4.6.1. Western Blot:	38
4.6.2. Imuno-histoquímica	40
4.6.3. Imuno-precipitação	43
47. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	44
4.7.1. Extração de RNA	44
4.7.2. Síntese de cDNA	44
4.7.3. RT-PCR	45
4.7.4. RT-PCR em tempo real	47
48. ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5. Resultados	50
5.1. Identificação de proteínas modificadas em veia safena humana arterializada	50
5.1.1. Identificação pela técnica de gel 2-D	50
5.1.2. Identificação pela técnica ICAT	55
5.2. Validação das proteínas diferentemente expressa na veia safena humana arterializada identificadas pelas metodologias proteômicas.	63
5.2.1. α-SMA	63

5.2.2. Proteína rica em cisteína (CRP).....	67
6. Discussão	80
6.1. α -SMA.....	81
6.2. Proteína Rica em Cisteínas (CRP).....	85
6.3. α -SMA e CRP3 atuando conjuntamente no processo de arterialização.....	88
7. Conclusões.....	96
8. Implicações Clínicas	98
9. Referências Bibliográficas	100
Anexo I.....	123
Anexo II	130
Anexo III.....	133
Anexo IV	137
Anexo V.....	141
2. Eletroforese de Gel de Poliacrilamida.....	143
Anexo VI.....	146
<i>Protocolo C:</i>	149
<i>Protocolo D:</i>	150
<i>Protocolo E:</i>	151
Anexo VII.....	163
Anexo VIII.....	176
Referências Bibliográficas – Anexos.....	190

Índice de Figuras

Figura 1	23
Figura 2:	30
Figura 3:	31
Figura 4:	35
Figura 5:	36
Figura 6:	38
Figura 7:	51
Figura 8:	52
Figura 9:	53
Figura 10:	57
Figura 11:	59
Figura 12:	61
Figura 13	64
Figura 14:	65
Figura 15:	66
Figura 16	67
Figura 17:	70
Figura 18:	71
Figura 19:	72
Figura 20:	73
Figura 21:	74
Figura 22:	75
Figura 23:	77
Figura 24:	78
Figura 25:	89
Figura 26:	90
Figura 27:	92
Figura 28:	144

Figura 29:	145
Figura 30:	154
Figura 31:	156
Figura 32:	157
Figura 33:	159
Figura 34:	161
Figura 35:	162
Figura 36:	168
Figura 37:	170
Figura 38:	171
Figura 39:	172
Figura 40:	173
Figura 41:	174
Figura 42:	175
Figura 43:	180
Figura 44:	182
Figura 45:	184
Figura 46:	187

Índice de Tabelas

Tabela 1	40
Tabela 2	42
Tabela 3	46
Tabela 4	47
Tabela 5	54
Tabela 6	54
Tabela 7	55
Tabela 8	55
Tabela 9	60
Tabela 10	62
Tabela 11	69
Tabela 12	171

Lista de Abreviaturas

Lista de Abreviaturas

APS – perssulfato de amônio

α -CAA – alpha actina cardíaca

α -SKA – alpha actina esquelética

α -SMA – alpha actina de músculo liso

BSA – albumina sérica bovina

b-FGF – fator básico de crescimento de fibroblastos

C₁₂ – carbono 12

C₁₃ – carbono 13

CAPPesq – Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CDKs – quinases dependentes de ciclinas

cdNA – ácido desoxirribonucléico complementar

CHAPS – Ciclohexilamino dimetilamônio propano sulfonato

CO₂ – dióxido de carbono

CRP – proteína rica em cisteína

Da – Dalton

DAB – diaminobenzidina tetrahydroclorida

DMEM – meio de cultura de células modificado da Dulbecco

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTPs – desoxinucleotídeos trifosfato

DTT – 1,4-Dithioerythritol

ECs – células endoteliais

ECM – matriz extracelular

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EGF – fator de crescimento epidermal

E2F – fator de transcrição E2

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

ESI – Ionização por eletrodispersão

FBS – soro fetal bovino

FIE – focalização isoeétrica

γ -SMA – gama actina de músculo liso

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

- HCl** – ácido clorídrico
- HNI** – hiperplasia neoíntima
- HPLC** – Cromatografia líquida de alta performance
- HRP** – Horseradish Peroxidase (planta horseradish da família *Amoracia rusticana*)
- IC** – intracelular
- ICAM-1** – molécula de adesão intracelular-1
- ICAT** – codificação isotópica combinada a uma “etiqueta” de afinidade (*do inglês: “isotope-coded affinity tags”*)
- IPG** – Gradiente de pH Imobilizado
- KCl** – cloreto de potássio
- kDa** – QuiloDalton
- KH₂PO₄** – Fosfato Monopotássico
- kVhr** – QuiloVolts/hora
- LC** – Cromatografia líquida
- LEI** – lâmina elástica interna
- LEE** – lâmina elástica externa
- MAEC** – célula endotelial de artéria mamária
- MALDI-TOF** – dessorção de íons em matriz induzida por *laser* – Tempo de Vôo (*do inglês: “matrix assisted laser desorption ionization time of flight”*)
- MAP quinase** – proteína quinase ativada por mitógeno
- MASMC** – célula muscular lisa de artéria mamária
- µg** - microgramas
- MgCl₂** – cloreto de magnésio
- MM** – Massa molecular
- MMP** – metaloproteinase matricial
- MP** – membrana plasmática
- MS** – espectrometria de massa
- m/z** – relação massa carga
- NaCl** – cloreto de sódio
- Na₂HPO₄** – fosfato de sódio dibásico
- NH₄HCO₃** – bicarbonato de amônio
- PAGE** – eletroforese em gel de poliacrilamida

- pb** – pares de bases
- PBS** – solução de bicarbonato de sódio e fosfato
- PBST** – solução de bicarbonato de sódio e fosfato e Tween
- PCR** – Reação em cadeia da polimerase
- PDGF** – fator de crescimento derivado de plaquetas
- pH** – Potencial hidrogeniônico
- pI** – Ponto isoelétrico
- PM** – peso molecular
- PMF** – Impressão digital de peptídeos (do inglês: “*peptide mass fingerprint*”)
- PMSF** – Fluoreto de fenilmetanosulfonil
- Q-TOF** – espectrômetro de massa híbrido – quadrupolo e tempo de voo
- RNA** – ácido ribonucléico
- rpm** – Rotações por minuto
- RT-PCR** – transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase
- SDS** –Dodecil sulfato de sódio
- SMCs** – células de músculo liso
- SVEC** – célula endotelial de veia safena
- SVSMC** – célula muscular lisa de veia safena
- TEMED** – N,N-Tetrametiletilenodiamina
- TFA** – Ácido trifluoracético
- TGF- β** – fator de crescimento transformante beta
- VCAM-1** – molécula de adesão das células vasculares
- W** – watt
- 1-D** – gel unidimensional
- 2-D** – gel bidimensional

Resumo

Resumo

Campos L. C. G. **Identificação e caracterização de proteínas modificadas em enxertos de veias safenas humanas arterializadas no modelo *ex vivo*** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 194p.

A revascularização cardíaca utilizando a ponte de safena é um procedimento bastante utilizado para restabelecer o fluxo coronariano. Apesar do sucesso deste procedimento, a patência deste enxerto pode chegar a menos de 50% em 10 anos. Atribui-se parte deste insucesso a variações no processo adaptativo à nova condição hemodinâmica, onde o “shear stress” e o estiramento aumentados podem estar interferindo na função endotelial e vascular. Este processo envolve a participação de diversas proteínas e o estudo de como elas participam conjuntamente é uma importante abordagem para entender as alterações fisiológicas e patológicas que ocorrem no enxerto vascular. Neste trabalho, tecnologias proteômicas, gel 2-D e ICAT, foram utilizadas para identificar as proteínas que são modificadas nas fases precoces da arterialização do enxerto venoso. Foi utilizado um sistema *ex vivo* de perfusão controlada, desenvolvido em nosso laboratório, onde a veia safena humana foi cultivada tanto em regime hemodinâmico venoso (5 mL/min) e arterial (50 mL/min, 80 mmHg) por 24 horas. Dentre as proteínas identificadas, a maioria apresenta funções estruturais como, por exemplo, α -actina de músculo liso, CRP1, colágeno VI, tropomiosina, miosina, desmina e vimentina. Para avaliação funcional foram selecionadas a α -SMA e a CRP. A α -SMA mostrou-se diminuída nas fases mais precoces da arterialização venosa, com quase desaparecimento após 3 dias da cirurgia, seguido de um aumento nos períodos subseqüentes. A CRP3 mostrou-se com expressão predominantemente arterial tanto em amostra humana como de rato. A arterialização de segmentos venosos induziu a expressão da CRP3, sendo dependente do aumento do estiramento (“stretch”) nas células musculares lisas e não do aumento do “shear stress” na superfície endotelial. Coletivamente, neste trabalho caracterizamos duas proteínas que foram modificadas durante o processo de arterialização e/ou adaptação da veia à condição hemodinâmica arterial. As proteínas identificadas contribuirão para o melhor entendimento do processo de arterialização venosa e poderão ser testadas como novos alvos terapêuticos para melhorar a patência destes enxertos.

Descritores: 1. Biologia molecular 2. Oclusão de enxerto vascular 3. Veia safena 4. Revascularização miocárdica 5. Proteínas citoesqueleto 6. Proteoma 7. Actinas

Abstract

Abstract

Campos L. C. G. **Identification and characterization of modified proteins in arterialized human saphenous vein using an *ex vivo* system** [thesis]. São Paulo: Medical School, University of São Paulo; 2008. 194p.

Coronary artery bypass surgery by saphenous vein graft is still widely used to revascularization of ischemic heart. Despite the success of this procedure, about 50% occlude after 5-10 years. The vein graft is subjected to increased tensile stress and the adaptive vein response to the arterial hemodynamic condition may predispose to bypass occlusion. Several proteins are modulated during arterialization, the understanding of the molecular changes of this process may be useful to new therapeutics approaches development attempting to increase vein graft patency. In this work, proteomics platform, gel 2-D and ICAT, were used to identify the proteins that are modified in the early stages of vein graft arterialization. Human saphenous vein were cultured in an *ex vivo* flow through system in both venous (5 ml / min) and arterial (50 ml / min, 80 mm Hg) hemodynamic conditions for 24 hours. The identified proteins were related to cell structural function, such as α -SMA, CRP1, collagen VI, tropomyosin, myosin, desmin and vimentin. To functional characterization, α -SMA and CRP were selected. In rat vein arterialization model, α -SMA showed to be decreased during the early stages of arterialization and almost disappeared after 3 days of surgery. Later on, α -SMA-positive cells increase reaching similar expression levels of normal jugular vein. The expression of CRP3 showed to be predominantly to arterial beds both in human and rat. When vein segment were submitted to arterial hemodynamic condition, it was observed a significant induction of CRP3 expression. Interestingly, the increase of CRP3 is dependent of stretch stimulus in smooth muscle cells while shear stress did not modify its expression in endothelial cells. Collectively, we successfully identified proteins differentially expressed during the vein arterialization by using proteomic technique. α -SMA and CRP3 were modified in vein segments exposed to arterial hemodynamic condition and efficiently discriminate smooth muscle cell phenotype. The identified proteins will contribute to the better understanding of the venous arterialization process and may be tested as new therapeutic targets for improving the patency these grafts.

Descriptors: 1. Molecular biology 2. Graft occlusion vascular 3. Saphenous vein 4. Myocardial revascularization 5. Cytoskeletal proteins 6. Proteome 7. Actins

Introdução

1. Introdução

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo responsáveis por 16,7 milhões de mortes ao ano (Avezum e cols., 2002 *apud* Lotufo, 2005). A doença arterial coronária destaca-se como uma das maiores causadoras de morte tendo como causa primária a aterosclerose, uma doença inflamatória crônico-degenerativa caracterizada pela disfunção endotelial e acúmulo de lípidos no sistema vascular. A presença das placas ateroscleróticas é o principal mecanismo fisiopatológico que limita o fluxo coronariano (Thérroux e cols., 1998), levando a redução total ou parcial da oferta de O₂ causando a isquemia miocárdica como consequência a este desequilíbrio. Em geral, a doença coronariana constitui a primeira causa de morte, acomete grande parcela da população, e resulta em substancial custo de tratamento na fase hospitalar devido a: (i) intervenções percutâneas com medicamentos adjuvantes e drogas antitrombóticas, (ii) procedimentos invasivos como angioplastia transluminal percutânea associada à colocação de *stents* (recobertos ou não) e (iii) revascularização do miocárdio por enxertos venosos ou arteriais (Mitra e cols., 2006). Além disso, há a necessidade de seguimento de um paciente de alto risco para ocorrência e/ou recorrência de eventos, por uma série de procedimentos não invasivos destinados à detecção de complicações e avaliação da terapêutica instituída. No grande espectro clínico da doença arterial coronariana, as síndromes coronarianas agudas correspondem à fase de instabilidade aguda da doença, com grande risco de morte, dano ao músculo cardíaco do ventrículo esquerdo, progressão da doença e necessidade de intervenções para revascularização do miocárdio (Ryan e cols., 1996 e Thérroux e cols., 1998).

A revascularização miocárdica através da ponte de safena desenvolvida no início da década de 70 representou um marco na terapêutica do infarto do miocárdio (Favaloro, 1969 e Garret e cols., 1973), tornando-se bastante comum e amplamente utilizado para restabelecer o fluxo coronariano (Angell e cols., 1977 e Roth e cols., 1979 *apud* Lytle e cols., 1985). Apesar de sua eficiência, entre 15 a 30% dos enxertos ocluem dentro do primeiro ano de cirurgia, aumentando para mais de 50% após 10 anos do implante (Lytle, 1994, Canver e cols., 1995 e Mehta e cols., 1997), pois sua durabilidade está limitada pelo acelerado desenvolvimento de aterosclerose o que leva a reduzida patência destes enxertos. Por este motivo, enxertos arteriais passaram a complementar a cirurgia de revascularização cardíaca, podendo-se citar a artéria mamária interna, a artéria radial, a artéria gastroepiplóica direita, e a artéria epigástrica inferior (Grondin e cols., 1984, Lytle e cols., 1985, Zeff, e cols., 1988, Oliveira e cols., 2005), que apresentam uma patência de 84,1% contra 56,3% para o enxerto de veia safena para um período de 10 anos pós-cirúrgico (Bulkley & Hutchins, 1977, Campeau e cols., 1983, Campeau e cols., 1984, Grondin e cols., 1984, Lytle, 1994). Apesar da eficiência dos enxertos arteriais, a veia safena ainda é bastante utilizada devido ao fácil acesso, ao seu tamanho e, principalmente, ao grande número de pacientes com várias oclusões em suas coronárias sendo necessário, além dos enxertos arteriais, o uso da ponte de veia safena como complementação cirúrgica. A alta incidência de falha da veia safena como condutora neste ambiente de circulação arterial é dada por uma combinação de alterações estruturais e fisiológicas na parede do vaso. Três processos, bem conhecidos, são a causa desta falha: a trombose precoce, a hiperplasia neoíntima (HNI) e a aterosclerose (Bourassa, 1991 e Fitzgibbon e cols., 1996).

A preservação da perviabilidade das anastomoses venosas está relacionada diretamente com a técnica de preparo do enxerto, com a qualidade da veia e com a adequada administração de drogas antitrombóticas (Loop e cols., 1981 e Loop e cols., 1983). A lesão do endotélio e da camada média durante a preparação cirúrgica e implantação da veia aorto-coronária pode ocasionar a oclusão trombótica do enxerto, devido à liberação local de vasoconstritores, aumento da agregação plaquetária e acúmulo de fatores de coagulação ativados. A obstrução dos enxertos nos primeiros meses após a cirurgia está freqüentemente associada à trombose decorrente de falhas nas técnicas cirúrgicas utilizadas, das alterações na parede do vaso e na dinâmica do fluxo sanguíneo, bem como a componentes do sangue arterial que provocam danos na monocamada endotelial que reveste o vaso. A grande perda de tecido endotelial (Roubos e cols., 1995), provoca a aderência de plaquetas e neutrófilos através da produção de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais danificadas, gerando um acúmulo de fibrina na superfície do lúmen e desencadeando a cascata de coagulação (Dilley e cols., 1992; Verrier e Boyle, 1996). A formação de fios de fibrina também é estimulada através do aumento na quantidade de trombina circulante, que produz monômeros de fibrina a partir do fibrinogênio e favorece o desenvolvimento do coágulo. Isto ocorre uma vez que a produção de trombomodulina, um inibidor de trombina, é diminuída em até 30% como resposta ao descamamento do endotélio (Cook e cols., 1991). A presença de trombina na veia também tem um efeito vasoconstritor, favorecendo a trombose (Yang e cols., 1997).

Durante o primeiro ano após o implante, a hiperplasia neoíntima pode também provocar a oclusão com ou sem a ocorrência de trombose (Roth e cols.,

1979). Os enxertos livres de trombose passam por mudanças fisiopatológicas denominadas arterialização da veia que consiste na presença de hiperplasia neoíntima que se inicia com a proliferação das células musculares lisas que migram para a camada média e são capazes de sintetizar colágeno, elastina e outras substâncias, resultando em fibrose da íntima composta de um número variável de elementos celulares e material extracelular (Eldon e cols., 1981). Macroscopicamente, este processo envolve um espessamento progressivo da média com formação de neoíntima, evoluindo, em alguns casos, para o desenvolvimento do processo aterosclerótico, resultando na oclusão do enxerto venoso. (Mehta e cols., 1997 e Spray e cols., 1977). A hiperplasia neoíntima é o principal processo da doença do enxerto de safena durante o primeiro ano após a cirurgia, sendo causada por dano na camada íntima do vaso, o que resulta em acúmulo de matriz extracelular nesta camada, além de migração e proliferação das células de músculo liso da camada média para a íntima provocando o espessamento do vaso (Shuhaiber e cols., 2002). Este espessamento é considerado por vários patologistas como uma lesão precoce da aterosclerose que eventualmente determinará alterações ao fluxo e oclusão do enxerto (Lawrie e cols., 1977).

A hiperplasia neoíntima ocorre em resposta à descamação e destruição do tecido endotelial que reveste o vaso (LoGerfo e cols., 1983). A restituição desta camada é feita pela deposição de plaquetas que estimula a produção de fatores de crescimento como o PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), TGF (fator de crescimento transformante) e EGF (fator de crescimento da epiderme) (Groves e cols., 1986), levando à proliferação celular. Outro fator envolvido na hiperplasia da íntima do enxerto venoso é o aumento do estresse mecânico associado ao aumento da

distensão pela alta pressão arterial e ao aumento do “shear stress”. Quando a veia safena é implantada no coração, é imediatamente submetida a uma nova condição hemodinâmica, ou seja, a veia que estava em um regime venoso, de baixo fluxo e baixa pressão, e passa para um regime arterial, de alto fluxo, alta pressão e com característica pulsátil. Estas forças hemodinâmicas são bastante importantes para a função vascular, pois influenciam o tônus vascular e a regulação gênica de diversas proteínas, sugerindo que a patência das pontes de safena pode estar também relacionada com a súbita alteração hemodinâmica imposta ao vaso. É descrito que o aumento de “shear stress” na parede do vaso, estimula a produção de bFGF (fator básico de crescimento de fibroblastos) (Nguyen e cols., 1994) fazendo com que células musculares migrem e proliferem na camada íntima, e ainda, induz a deposição de matriz extracelular e o aumento progressivo de fibrose (Linder e cols., 1991; Cox e cols., 1991; Dilley e cols., 1992 e Allaire & Clowes, 1997). A proliferação das células de músculo liso, que causa a hiperplasia na camada íntima do vaso sanguíneo, é dada através de uma cascata de eventos do ciclo celular governados por uma família conservada de proteínas: as quinases dependentes de ciclinas (CDKs) (Morgan, 1997). Estas se associam às ciclinas formando complexos estáveis que, quando ativados, comandam a transição entre os estágios do ciclo celular. Cada complexo apresenta um padrão de expressão específico dependente da fase do ciclo celular e sua atividade depende do seu grau de fosforilação. Inicialmente, os complexos ciclina D/Cdk4 ou Cdk6 e ciclina E/Cdk2 são os responsáveis pela transição de G1 para S (Sherr, 1994 e Sherr, 1996). A subsequente transição de G2 para M é coordenada por ciclina B/Cdk1 (Shuhaiber e cols., 2002).

O passo seguinte, que pode ocorrer em função da hiperplasia neoíntima, é a aterosclerose (Schwartz e cols., 1995). Tais lesões conhecidas como placas ateroscleróticas ou ateromas, são consideradas altamente inflamatórias e envolvem acúmulo de lipídeos na intimidade da parede vascular, migração, proliferação e morte de células e fibrose (Murray e cols., 1997). Este processo passa a ser significativo a partir do 5º ao 7º ano (Neitzel e cols., 1986; Ratliff & Myles, 1989 e Bourassa, 1991), e sua progressão ocorre devido ao dano crônico nas células endoteliais (Boyle e cols., 1997). Partículas lipoproteicas oxidadas são mais facilmente reconhecidas e internalizadas por macrófagos presentes na íntima vascular (Smith, 1990). Adicionalmente à retenção de partículas lipoprotéicas oxidadas na matriz, o endotélio disfuncionante se caracteriza por mudança em sua relação com os leucócitos circulantes por meio da expressão de moléculas de adesão em sua superfície. A própria presença de LDL na íntima do vaso estimula a produção de citocinas (Rajavashisth e cols., 1990), as quais induzem a expressão de moléculas de adesão pelo endotélio. E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 são moléculas de adesão induzidas por esse mecanismo (Cybulsky e cols., 2001). A expressão de moléculas de adesão pelo endotélio é etapa fundamental para o recrutamento de leucócitos, um fenômeno que envolve três fases principais: rolamento, adesão e migração. A etapa de rolamento consiste em frágil contato entre o leucócito e a célula endotelial mediado por selectinas (Dong e cols., 1998). A aderência destes leucócitos no endotélio lesado dá início à resposta inflamatória (Joris e cols., 1983). A etapa seguinte que envolve forte adesão intercelular depende de ligação entre elementos da família das imunoglobulinas (VCAM-1 e ICAM-1) no endotélio e integrinas no leucócito. Aderentes ao endotélio e sob influência de citocinas com propriedades quimiotáticas,

os leucócitos migram para a região subendotelial. Aglomerados na íntima vascular após o fenômeno migratório, os monócitos podem se diferenciar em macrófagos por ação de citocinas, como o fator de estimulação de colônia de macrófago (M-CSF) (Terkeltaub e cols., 1998). Uma vez diferenciados, os macrófagos são capazes de fagocitar as partículas lipídicas que se acumulam na íntima. Após incorporação de grande quantidade de material lipídico, o macrófago assume uma aparência vacuolada peculiar, o que o torna semelhante a uma célula espumosa, como, aliás, é conhecido nesse cenário. Estas células são capazes de produzir fatores de crescimento semelhantes ao PDGF, estimulando a proliferação celular e a formação da hiperplasia neoíntima (Shuhaiber e cols., 2002). A ação continuada deste processo predispõe a formação de faixas de gordura, dando início à placa aterosclerótica. O aumento na expressão das moléculas de adesão, em resposta ao processo inflamatório, também favorece a aterosclerose (Price & Loscalzo, 1999). Além dos macrófagos, vários outros tipos celulares estão presentes nas placas ateroscleróticas humanas. Os linfócitos T são células que, como os macrófagos, também migram e se acumulam no ateroma, onde podem desempenhar funções imunes decisivas para o processo evolutivo da lesão (van der Wal e cols., 1994). A inflamação, embora seja hoje reconhecida em todas as fases de formação e também nos processos de complicação aguda do ateroma, é uma visão inovadora da doença aterosclerótica (Hansson e cols., 2006).

Conforme descrito acima, a arterialização do enxerto venoso é um processo bastante complexo. O entendimento das alterações moleculares que acompanham este evento adaptativo fisiopatológico poderá fornecer alternativas de intervenções para promover a melhora da patência dos mesmos. Modelos animais “in vivo”, de

enxerto venoso em leito arterial, têm sido utilizados para melhor elucidar os eventos envolvidos na arterialização do enxerto venoso. Rodriguez e cols. (2000) mostraram que a interposição da veia safena na artéria carótida de porco leva a uma elevada taxa de apoptose nas primeiras 8 horas após a cirurgia, ocasionando a uma perda de células musculares lisas da camada média vascular, já a taxa de proliferação apresentou-se baixa durante o período do estudo de 48 horas. Este fenômeno parece estar relacionado com mecanismos de sinalização celular, que ativam a morte celular da musculatura lisa localizada na média, que por sua vez é substituída por tecido fibroso e desta maneira contribui para a degeneração do enxerto venoso. Inicialmente a taxa de apoptose no enxerto venoso parece ser maior do que a taxa de proliferação, sendo que o pico de proliferação ocorre após 5-7 dias (Yamamura e col., 1994). Este processo de morte celular que ocorre logo após a interposição do enxerto é resultado do estresse em que a parede da veia é submetida quando colocada em regime arterial. Este regime hemodinâmico de maior fluxo e maior pressão causa um estiramento na parede da veia, cuja estrutura não está preparada para receber tal tensão (Moore e col., 2001), provocando uma série de alterações estruturais e moleculares que contribuem para a hiperplasia da íntima e presença de placas ateroscleróticas. Este processo pode estar relacionado com a regulação de fatores de crescimento como PDGF e TGF- β (Hoch e col., 1995), componentes da cascata das MAP quinases como p38 (Mayr e cols., 2000), fatores de transcrição como E2F (Mann e cols., 1999), e proteínas que compõem e degradam a matriz extracelular como tenascin-C, e as metaloproteinases (MMPs), respectivamente (Wallner e cols., 1999; Leville e cols., 2000). Liu e cols. (1999), realizando estudos de interposição de veia jugular em aorta de ratos, mostraram que o revestimento externo da veia jugular por uma

membrana cilíndrica de politetrafluoretileno evita o processo apoptótico do enxerto, sugerindo que a degeneração do enxerto venoso ocorre devido ao estiramento da parede vascular. Além disso, a redução da força de tensão, devido ao condicionamento da membrana ao redor do enxerto, foi capaz de diminuir drasticamente a degradação das fibras de actinas da musculatura lisa.

Além de estudos *in vivo*, trabalhos *ex vivo* tem demonstrado que o fluxo arterial na veia safena diminui a concentração e a atividade funcional da trombomodulina (Gosling e cols., 1999), proteína que confere característica antitrombogênica ao endotélio, alterando a expressão da eNOS (NO sintase endotelial) e das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM -1 (Golledge e cols., 1997), assim influenciando na adesividade do endotélio às plaquetas e aos monócitos. A dificuldade de compreender os processos patológicos em seus aspectos moleculares tem limitado o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes. Atualmente estão sendo criadas novas oportunidades para a compreensão de problemas biológicos complexos e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas e terapêuticas.

Com o seqüenciamento do genoma humano, o grande desafio está em identificar e desvendar a função dos genes. Existem muitas maneiras de identificar a função de um determinado gene, quer seja por busca de homologia com genes já descritos em outros organismos, ou por localização da proteína dentro da célula e seu nível de expressão, incluindo expressão diferencial nos tecidos. Nesse sentido, novos genes envolvidos no processo de espessamento da veia safena em regime hemodinâmico arterial estão sendo estudados em nosso laboratório. Para tanto, foi desenvolvido um sistema de cultura de veia safena que permite o estudo vascular em

condições hemodinâmicas controladas por períodos de até 1 semana (figura 1). Foi demonstrado que o sistema de cultura *ex vivo* reproduz os fenômenos que ocorrem *in vivo* na veia safena, simulando a condição a que ela é submetida após o processo de revascularização cardíaca. Desta forma, representa um modelo interessante para o estudo das modificações que ocorrem na ponte de safena (Miyakawa e cols., 2003). As modificações que ocorrem após 24 horas estão sendo estudadas, na tentativa de identificar as alterações iniciais que ocorrem nos enxertos venosos. Acreditamos que são os eventos iniciais que desencadeiam o processo de arterialização do enxerto venoso e possivelmente as complicações posteriores como oclusão e aterosclerose. 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.

Neste trabalho está sendo empregada a tecnologia proteômica para comparar globalmente as alterações protéicas que estão ocorrendo na veia safena humana cultivada em regime hemodinâmico venoso e arterial. Estão sendo utilizadas as metodologias de gel bidimensional e ICAT (do inglês: “isotope-coded affinity tagging”), que consistem na análise de proteínas expressas de um genoma através da sistemática separação, identificação e quantificação de proteínas de uma amostra (Wilkins e cols., 1996; Pennington e cols., 1997). Gel 2-D e ICAT são métodos importantes para a tecnologia proteômica, porém nenhum deles pode ser considerado independente e suficientemente capaz de identificar todas as proteínas presentes em uma amostra de estudo. Uma análise de complexos multiprotêicos de mitocôndrias demonstrou que nem o ICAT nem o gel 2-D foram capazes de identificar todas as proteínas presentes em uma fração subcellular. Pode-se dizer que cada técnica é

seletiva com respeito às proteínas detectadas (Patton e cols., 2002). Uma das maiores limitações do gel 2-D está na falha de detectar proteínas em baixa abundância e proteínas hidrofóbicas. A visualização das proteínas depende do corante utilizado e usualmente é utilizado o Coomassie Blue R-250, cujo limite de detecção é 150ng de proteína. Já o ICAT é capaz de detectar e de quantificar proteínas de baixa abundância em amostras complexas, porém esta limitada em detectar apenas peptídeos que contenham cisteínas. (Kubota e cols., 2003). Assim, a realização de análise conjunta de ICAT e gel 2-D pode compensar as limitações inerentes a cada uma das duas técnicas e, desta maneira, identificar um maior número de proteínas com padrão diferencial em nosso estudo.

Deste modo, neste trabalho utilizamos o Proteoma para identificar as alterações que ocorrem na veia safena em regime hemodinâmico arterial. Estes dados permitirão a avaliação global das alterações moleculares do enxerto venoso, contribuindo para o entendimento do processo de arterialização e fornecendo proteínas candidatas com potencial terapêutico para melhorar a patência do enxerto venoso

Objetivo

2. Objetivo

Identificar e caracterizar proteínas modificadas na veia safena humana submetida ao regime hemodinâmico arterial no sistema *ex vivo*, de maneira quantitativa e/ou qualitativa.

2.1 Objetivos específicos:

Avaliar durante a arterialização venosa o perfil de expressão da:

- ❖ alfa actina de músculo liso (α -SMA) e
- ❖ Proteína Rica em Cisteína (CRP).

Materials

3. Materiais

3.1. REAGENTES, SAIS, DROGAS E KITS

GE Healthcare:

IPG strip, IPG buffer, DeStreak™ Rehydration solution, IPG cover fluid, membrana de nitrocellulose Hybound ECL, Protein G sepharose 4 Fast Flow, hyperfilm ECL, CHAPS, glicina, acrilamida, bis-acrilamida, iodoacetamida, urea.

Gibco BRL - Invitrogen Co.:

Silver Quest™ Silver staining kit, Superscript III DMEM; FBS; NCS, Penicilina; Estreptomicina; *Trizol*; Agarose; EDTA; Tris-HCl; DTT; dNTPs; oligo dT; RNAsin, PMSF, Human Endothelial médium (SFM), bFGF, EGF, TEMED, APS.

Sigma-Aldrich Co.:

Triton X-100; NaCl; KCl; Na₂HPO₄; KH₂PO₄; NaHCO₃; MgCl₂; EGTA; BSA; Brometo de Etídeo; HEPES, Tween 20, Luminol, ácido p-comárico, coomassie G-250, coomassie brilhant blue R-250, azul de bromofenol, SDS, glycerol, bicarbonate de amônio, sulfato de amônio.

Serva:

Coomassie colloidal blue – serva blue G.

Merck S/A.:

Metanol, Hematoxilina; Etanol; Peróxido de Hidrogênio; Citrato de Sódio; NaOH; Isopropanol, ácido acético, clorofórmio, acetonitrila, TFA, ácido clorídrico, ácido fosfórico.

 **Promega:**

Trypsin porcine,

 **Bio-Rad:**

Kit Bio-Rad assay dye Reagent concentrad.

 **Millipore:**

Zip Tips C18, Kit Amicon ultra 4 centrifugal filter devices.

 **Applied Biosystems:**

Kit high capacity cDNA archive, kit SyBr Green PCR master mix, ICAT.

 **Labsynth:**

Amônio Hidróxido, Ácido Acético e Ácido Clorídric.

 **Dakocytomation;**

Kit LSAB + system-HRP Universal; kit LSAB + system-AP Universal.

 **Outros:**

Azul de Anilina.(**Carlo Erba Reagente**), Formol (**Rioquímica**); DAB (**Novocastra**); Paraplast plus (**Oxford Labware**); *Citrisolv* (**Fisher brand**); Resina Erv-Mount (**EasyPath**); Pentobarbital (**farmácia ICHCFMUSP**); Leite desnatado MOLICO (**Nestlé**); Gelatina (**Vetec**); Tripsina (**Cultilab**); Xilol e acetona (**Quimex**); Soro Fisiológico 0,9% estéril (**Baxter**); Ração (**Nuvital**); Heparina (**Hipolabor**); Ketalar (**União Química S/A**); Rompum (**Vetbrandes**).

3.2. EQUIPAMENTOS

GE Healthcare:

Strip holder, Ettan IPGphor, Ettan Daltsix, resfriador MultiTemp III, Image scanner, Image Master 2-D Elite, Ettan MALDI-TOF, sistema de eletroforese vertical.

Millipore:

Multiprobe II liquid handling workstation, Sistema de Filtração de Água Ultrapura MilliQ Plus.

Applied Biosystem:

ABI PRISM 7700 sequence detector, 4700 Proteomics analyzer MALI-TOF.

Perkin Elmer:

Victor Wallac, prO-TOF 2000 MALDI-TOF MS.

Bio-Rad;

Sistema de eletrotransferência semi-seco.

Waters Micromass:

Q-TOF Ultima, ProteinLyns 2.0.

Outros:

Sistema de Cultura *ex vivo* (**adaptado a partir de CELLMAX - Spectrum Laboratories**), Triturador e Homogeneizador de Tecidos PowerGen 125 (**Fisher Scientific**); Incubadora de CO₂ Umidecida à 37C Modelo 3110 (**Forma Scientific**), Câmara de Newbauer (**Loptik Labor**), Estufa de Cultura Orion 502 (**FANEM**), Fluxo Laminar (**Veco do Brasil Ind.**), Microscópio Invertido Nikon TMS (**Nikon, Inc.**), FX-4000™ Flexercell® Tension Plus™ (**Flexcell® International**

Corporation) Lupa Cirúrgica D.F. Vasconcellos M900 (**DFV**), Mesa Cirúrgica Aquecida K-MOD100 (**Baxter Healthcare Co.**), Inclusor de Tecidos Leica EG1160 (**Leica Histology & E. M. Products**), Processador de Tecidos Leica TP1020 (**Leica Histology & E. M. Products**), Estufa 65°C (**Quimis**), Microscópio de Luz Leica DMLS (**Leica Histology & E. M. Products**), Micrótopo Ergostar HM200 (**Microm**), Painel a Vapor Pascal (**Dakocytomation**), Programa *Leica Qwin* versão 2.2 Q500IW (**Leica Histology & E. M. Products**), ImageJ (**Rasband, 2004**), Cubas para Eletroforese (**Owl Separation System Inc.**), Fonte FB105 (**Fisher Scientific**) e Modelo 250 (**Life Technologies, Gibco BRL Electrophoresis Power Supply**), Espectrofotômetro ND1000 (**NanoDrop**), Microondas (**Continental**), Sistema de Imagem Eagle Eye II (**Stratagene**), Termocicladora PTC 200 (**MJ Research, Inc.**), Centrífuga Eppendorf Refrigerada Modelo 5417R (**Brinkmann Instruments, Inc.**), Concentrador de Amostras *Concentrator5301* (**Eppendorf**), Microcentrífuga (**Wealtec Co.**), Agitador Magnético Corning Modelo PC320 (**Laboratory Stirrer**), Vortex Genie 2 (**Scientific Industries, Inc.**), PH metro 40 pHmeter (**Beckman**), Micropipetas Automáticas Reguláveis P1000, P200, P20, P10 e P2 (**Gilson Medical Electronics**), Pipetador Pipetting AID (**Gilson Medical Electronics**), Freezer -20°C (**Brastemp**), Freezer -80C (**Forma Scientific, Bio Freezer**), Refrigerador 4°C (**Brastemp**), Autoclave Universal Modelo 105 (**FABBE Primar Ind. Ltda**); Balança AB104, Mettler PM2000 (**Mettler Instrument Co.**) e BG4001 (**Gehaka**) e Banho-maria FABBE Modelo 169 (**Primar IDL. Ltda**).

3.3. ANTICORPOS

Anticorpo Monoclonal clone 1A4 contra α -SMA (**Sigma**); Anticorpo contra CRP3 (**Arber e cols., 1994**), GAPDH (**R&D Systems**), anti-mouse (**Zymed**) e anti-rabbit (**Zymed**).

3.4. PRODUTOS PLÁSTICOS E DESCARTÁVEIS

Nunc:

Pipetas graduadas estéreis de 2, 5, 10 e 25mL, Garrafas T75 e T150, placas de cultura de células de 6 Poços.

Scientific Specialties Inc.

Ponteiras P1000, P200 e P2 e Eppendorfs estéreis 1500 e 200uL.

Outros:

Placas Real Time (Applied Biosystems), Fio de Sutura 10.0 (Ethicon, Johnson & Johnson), Lâminas Foscas Lapidadas, Lamínulas e Pap Pen Liquid Blocker (EasyPath), Rodinho Estéril para Raspagem de Placa de Cultura (Costar Co.), Tubos Falcons Estéreis 15 e 50mL (Cellstar), Cassetes M480 (Simport Plastics); Gaiolas e Bebedouros (Beiramar Ltda); Papel Filtro (3M Co.) placas de cultura 150x25mm (Corning).

Metodos

4. Métodos

4.1. CULTIVO *EX VIVO* DE VEIA SAFENA HUMANA

4.1.1. Obtenção das veias safenas

As veias safenas foram obtidas de pacientes submetidos a cirurgia de revascularização cardíaca por ponte de safena no Instituto do Coração, HC-FMUSP. Após o procedimento cirúrgico, os segmentos não utilizados foram levados ao Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor e cultivados no sistema *ex vivo* conforme descrito a seguir. Este protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq 638/04) (Anexo II, item 1) (Termo de consentimento livre e esclarecido – Anexo III).

4.1.2. Sistema de Cultura da veia safena.

As veias safenas foram cultivadas no sistema de cultura *ex vivo*, adaptado no sistema de capilares artificiais (Redmond, E.M., e col., 1995). Neste sistema uma cuba com a veia safena foi colocada no lugar do cartucho contendo os capilares, ainda, foi acoplado um regulador de pressão permitindo o controle da pressão e do fluxo de maneira independente (figura 1). Segmentos da veia safena, de aproximadamente 2 cm, foram cultivados por 24 horas em regime hemodinâmico venoso (fluxo: 5mL/min) ou regime hemodinâmico arterial (fluxo: 50mL/min, pressão: 80mmHg). Em seguida procedeu-se: (1) extração de RNA para análise de expressão gênica pela técnica de RT-PCR e RT-PCR em tempo real; (2) extração de

proteínas para a realização da análise proteômica utilizando as técnicas de gel 2-D e ICAT e (3) processamento e inclusão em parafina para análise histológica.

Este procedimento de cultura *ex vivo* de veia safena foi padronizado no laboratório e reproduz as alterações iniciais que ocorrem no processo de arterialização de segmento venoso *in vivo* (Miyakawa e cols., 2003).

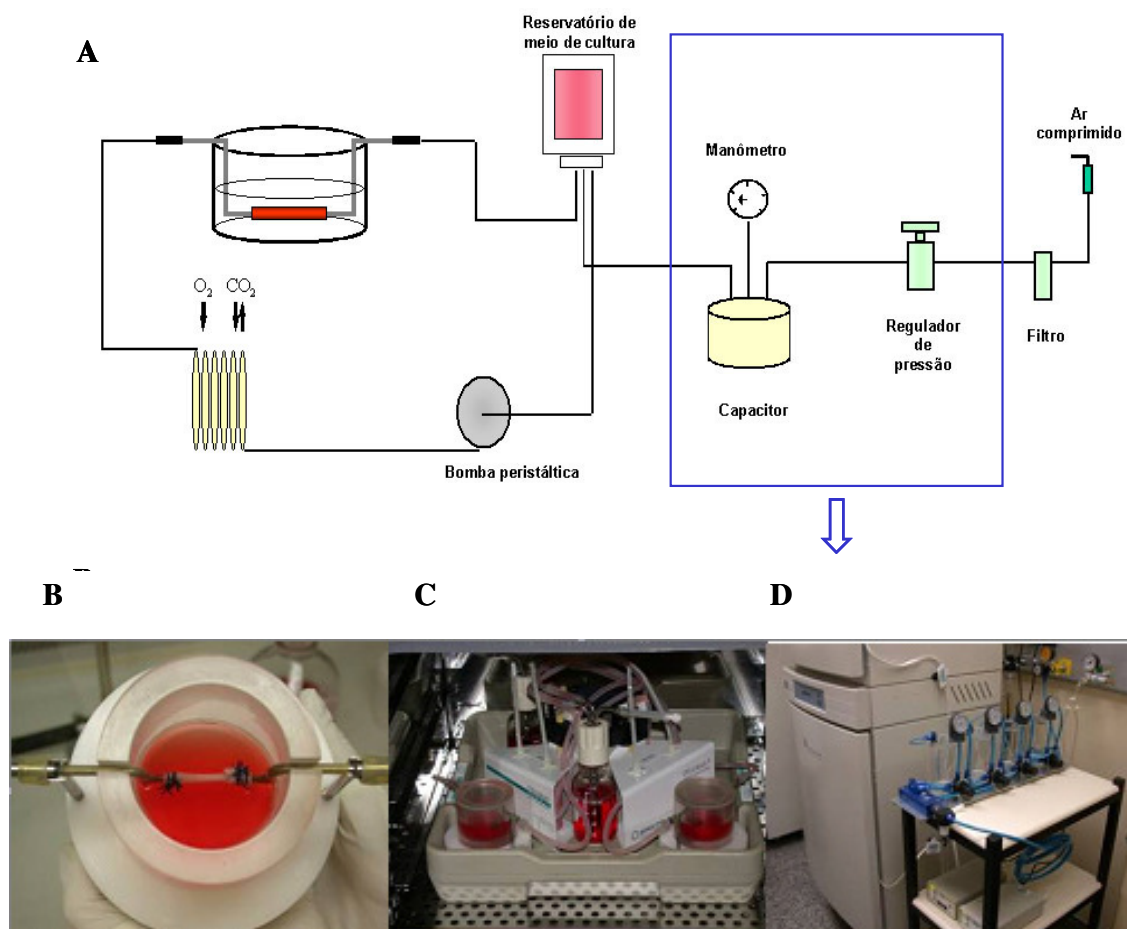


Figura 1: Sistema de cultura *ex vivo* de veia safena humana. (A) Representação esquemática do sistema de cultivo onde a veia safena é colocada na cuba de cultivo e conectada ao sistema. O meio de cultura é retirado do seu reservatório, através de uma bomba peristáltica ajustável, que faz com que o meio flua através de tubo de silicone levando nutrientes para o vaso. Além disto, o sistema possui um aparato de pressurização que permite o controle da pressão de forma independente do fluxo. (B) Segmento de veia safena na cuba contendo meio de cultura, (C) sistema de cultura de veia safena e (D) aparato para pressurização do sistema.

4.2. PROTEOMA

Esta tecnologia consiste em fornecer o mapeamento das proteínas expressas em um determinado momento podendo ser empregada em células, tecidos, órgãos ou fluídos biológicos, sejam eles fisiológicos ou patológicos. Neste trabalho foram utilizadas 2 técnicas proteômicas: a Eletroforese Bidimensional (2-D) e o ICAT (do inglês: *isotope-coded affinity tags*).

4.2.1. Eletroforese Bidimensional (2-D)

No 2-D dois parâmetros distintos são utilizados para separar proteínas. Em uma primeira dimensão as proteínas foram separadas pela diferença de carga elétrica, já na segunda dimensão elas foram separadas por sua massa relativa (peso molecular) (Anexo IV).

4.2.1.1. Extração de Proteínas

Para otimizar a extração de proteínas da veia safena, três protocolos diferentes foram testados (Anexo V). A Extração C foi o mais eficiente e foi o método empregado para a realização do 2-D.

Extração C

As veias safenas foram trituradas através da pulverização de nitrogênio líquido e utilização de gral e pistilo. Em seguida foram lisadas em tampão de extração, 2% triton X-100, 9M urea, 40mM DTT e 0,5mM PMSF. As proteínas foram obtidas no sobrenadante após duas centrifugações de 13.000rpm por 30

minutos. Em seguida as amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) utilizando o *kit Bio-Rad assay dye Reagent Concentrad*.

Para concentrar as proteínas em um menor volume foi utilizado o kit Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices de acordo com instruções do fabricante.

4.2.1.2. Focalização Isoelétrica do gel 2D (Primeira Dimensão)

Nesta primeira etapa, as proteínas foram separadas de acordo com o seu ponto isoelétrico, utilizando “IPG strip” de 7 e 24 cm, pH 3-10 e pH 4-7. As amostras foram adicionadas a (1) solução de reidratação (8M urea, 0,5% CHAPS, 0,2% DTT, 0,5% “IPG Buffer” e 0,002% azul de bromofenol (1% azul de bromofenol, 50mM Tris-base) ou (2) a solução de reidratação comercial DeStreak™ Rehydration Solution de tal forma que o volume da amostra corresponde-se a 10% do volume total indicado para cada “strip holder” (volume de 125µl para “IPG strip” 7cm e de 450µl para “IPG strip” de 24cm).

As amostras juntamente com a solução de reidratação foram aplicadas no centro do “strip holder” e as “IPG strip” foram posicionadas sobre a solução com o lado do gel, contendo o pH imobilizado, virado para baixo e o lado ácido voltado para o ânodo dentro do “strip holder”. “IPG Cover Fluid” foi aplicado para minimizar a evaporação e cristalização da uréia. O “strip holder” foi fechado e posicionado na plataforma do Ettan IPGphor. O equipamento foi programado de forma que a tira re-hidratasse por 12 horas e que no final da focalização fossem acumulados 64KVh para “IPG strip” de 7 cm e 64 KVh para “IPG strip” de 24 cm.

Sumariamente, esta etapa envolve reidratação das “IPG strips”, aplicação das amostras e focalização isoelétrica.

4.2.1.3. Equilíbrio da “IPG Strip”

Após a focalização, as “IPG Strips” foram submetidas a duas etapas de equilíbrio para a preparação das proteínas para a segunda dimensão. Na primeira etapa ocorre a redução das pontes dissulfeto das proteínas pela ação 10 mg/mL de DTT acrescido a solução de equilíbrio (tris-HCl pH 8,8 50mM, urea 6M, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%) incubada por 15 minutos. Na segunda etapa, para evitar a reoxidação, ocorre a alcalinização dos grupamentos tióis expostos pela ação de 25 mg/mL de iodoacetamida acrescida a solução de equilíbrio (tris-HCl pH 8,8 50mM, urea 6M, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%) e incubada por 15 minutos.

4.2.1.4. SDS-PAGE (Segunda Dimensão)

Após o Equilíbrio das “IPG Strips”, a segunda dimensão foi realizada em géis de poliacrilamida 12,5 % (30% acrilamida 1% bis-acrilamida, 1,5M Tris-HCl pH 8,8, 10% SDS, 10% APS e TEMED), utilizando sistema de cuba vertical para “strips” de 7 cm e cuba de eletroforese vertical Ettan Daltsix.

As “IPG Strips” foram imersas em tampão de eletroforese (25mM Tris pH8,3, 1,9M glicina, 1%SDS) e em seguida posicionadas sobre o gel de poliacrilamida, com o padrão de peso molecular contido em um pequeno pedaço de papel de filtro posicionado do lado ácido do “Strip”. O conjunto foi então selado com solução de agarose (0,5% agarose, 0,002% bromofenol, diluído em tampão de eletroforese). A

eletroforese foi realizada em tampão de eletroforese (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,9M Glicina, 1% SDS), potência de 2,5 W/gel por 30 minutos e 100 W totais até o final da migração. Para manutenção da temperatura a 25°C, foi utilizado um resfriador MultiTemp III na temperatura de 10 °C.

4.2.1.5. Análise do gel 2-D

Assim que terminado a eletroforese, o gel foi fixado por 1-2 horas sob agitação mecânica, na Solução Fixante (etanol 40%, ácido acético 10%). Em seguida, foi corado por no mínimo 1 hora na Solução Corante e descorado em Solução Descorante. O gel foi mantido em água bidestilada.

Ao final da segunda dimensão, os géis foram fixados (40% metanol e 10% ácido acético) por 1-2 horas sob agitação mecânica orbital. Três tipos de coloração foram utilizados: (1) Coomassie brilhant Blue (0,1% coomassie R-250, 40% etanol; 10% ácido acético) e solução descorante (20% metanol, 5% ácido acético), (2) Coomassie Colloidal Blue (8% sulfato de amônio, 0,8% ácido fosfórico, 0,08% coomassie blue G-250 e 20% metanol) e (3) “SilverQuest™ Silver Staining Kit”. Em seguida os géis foram mantidos em água bidestilada e a sua imagem foi adquirida no programa ImageScanner. A detecção e análise para a retirada de cada proteína de interesse foi realizada manualmente ou utilizando o programa ImageMaster 2-D Elite. Este programa detecta as proteínas, quantifica-as por densidade e compara proteínas presentes em diferentes géis.

4.2.1.6. Processamento do gel (extração da proteína de interesse do gel, digestão triptíca e extração dos Peptídeos).

Após análise pelo programa Image Master 2-D Elite, a retirada e o processamento das proteínas de interesse foram realizados de três maneiras: automatizada, manual e retirada manual seguida de processamento automatizado (Anexo VI). A eficiência de 5 protocolos foram testados e após a padronização ficou estabelecido a utilização do protocolo E para processamento das proteínas de interesse.

Protocolo E:

As proteínas de interesse foram recortadas e fragmentadas com o auxílio de um bisturi estéril sobre uma placa de vidro limpa com acetona e etanol e foram colocados em tubos eppendorfs lavados duas vezes com metanol e uma vez com H₂O milliQ. Para remoção dos corantes os pedaços de gel contendo as proteínas foram incubados com solução 50% acetonitrila e 25mM NH₄HCO₃, pH 8. A suspensão foi incubada sob agitação vigorosa por 10 minutos e deixada em repouso durante 15 minutos. Este procedimento foi repetido até total descoloração do gel, o que exigiu 8 repetições para pedaços levemente corados e 15 repetições para géis corados mais intensamente.

Para desidratar os fragmentos de géis foi realizado uma lavagem com 100% acetonitrila e em seguida os géis foram secados em sistema de centrifugação a vácuo durante 25 minutos.

Na etapa de digestão enzimática os géis foram reidratados com solução contendo 10-15µg/ml tripsina diluída em 25mM NH₄HCO₃. A solução enzimática foi aplicada fria (4°C), as amostras permaneceram em banho de gelo durante 10

minutos, em seguida foi adicionado 25mM NH_4HCO_3 e foram colocadas em estufa 37°C durante 20 horas. Após este período o sobrenadante do tubo de digestão foi transferido para um novo tubo eppendorf tratado com metanol.

Para extração dos peptídeos, foi adicionada solução 50% acetonitrila, 5% TFA, em quantidade suficiente para cobrir completamente os pedaços de géis, e agitados suavemente durante 30 minutos. Este processo de extração foi repetido mais uma vez e os sobrenadantes foram combinados e reduzidos, em sistema de centrifugação à vácuo, ao volume de 5 μ l. As amostras foram purificadas em microcolunas C18 ZIP TIPS de acordo com instruções do fabricante. Em seguida, as amostras foram analisadas no espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF, em colaboração com o Dr. Fábio César Gozzo do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS- Campinas SP).

Paralelamente amostras foram enviadas para uma “Proteomics Core Facility” no Schepens Eye Research Institute (Boston – MA) e processadas no equipamento automatizado Multiprobe II liquid handling workstation utilizing Millipore zip plate technology.

4.2.2. Análise de Proteoma Diferencial com ICAT (do inglês: “isotope-coded affinity tags”).

Neste tipo de abordagem as proteínas são marcadas em resíduos de cisteína com etiquetas que permitirão que estas proteínas sejam isoladas e identificadas (Figura 2). A codificação isotópica combinada a uma etiqueta de afinidade de biotina em único agente de alquilação ficou conhecida como marcadores de afinidade isotopicamente codificados (ICAT). Através deste reagente tornou-se possível

codificar isotopicamente peptídeos contendo cisteína e selecioná-los em seguida por afinidade (Anexo VII).

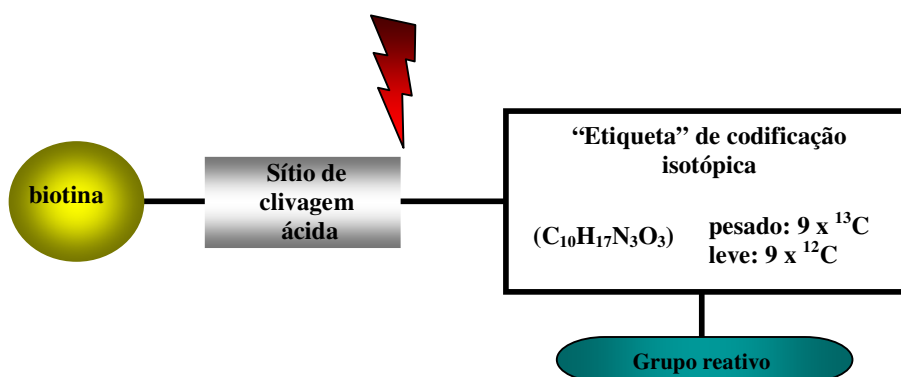


Figura 2: Representação esquemática da estrutura do reagente de ICAT. O reagente consiste em quatro elementos: uma “etiqueta” de afinidade (biotina) que é usada para isolar peptídeos marcados com ICAT; um sítio de clivagem ácida, para remoção da biotina, uma região que possa incorporar isótopos estáveis e um grupo reativo com especificidade para grupos de tiol, ou seja, as cisteínas. O reagente existe em dois formulários: pesado e leve.

O Cleavable ICAT Reagent Kit for Protein Labeling foi utilizado de acordo com instruções do fabricante. Esta metodologia compõe dois diferentes reagentes quimicamente idênticos de ICAT, que se ligam a regiões alquiladas das cisteínas. Um dos reagentes contém nove átomos de carbono 12 [C_{12}] (isotopicamente leve) e o outro nove átomos de carbono 13 [C_{13}] (isotopicamente pesado). Isto resulta em uma diferença em massa de 9 Daltons entre os dois reagentes e, desta maneira, peptídeos que contém uma cisteína apresentarão uma diferença de 9 Daltons entre as duas amostras de estudo, peptídeos com duas cisteínas terão uma diferença de 18 Daltons, e assim por diante. Os resíduos de cisteína reduzidos das proteínas nas duas

amostras a serem comparadas são rotulados separadamente durante o experimento e devido a diferença em massa entre os C_{12} e os C_{13} as amostras marcadas com ICAT pesado e leve foram combinadas e digeridas com tripsina. Os peptídeos marcados, que contém cisteína foram isolados por cromatografia de afinidade e analisados por espectrometria de massa, determinando assim a identidade da proteína que deu origem ao peptídeo e a abundância relativa de cada proteína nas amostras sendo comparadas (Figura 3).

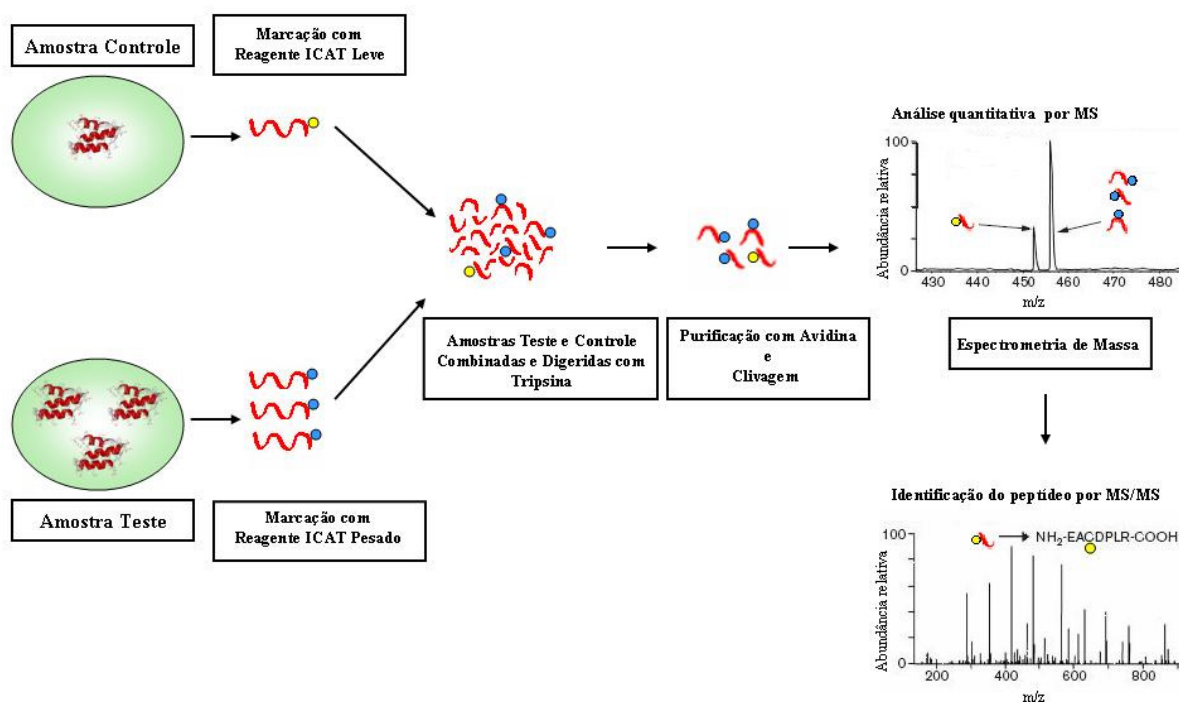


Figura 3: Estratégia de ICAT para análise de expressão diferencial de proteína. As proteínas das células controle e teste são coletadas, desnaturadas, reduzidas, e marcadas com o reagente ICAT leve e pesado, respectivamente. As amostras são combinadas e digeridas com tripsina. Os peptídeos marcados com ICAT são isolados por cromatografia de afinidade a biotina, e analisados por LC-ESI-MS/MS. A relação das intensidades dos íons marcados com ICAT leve e pesado permitem a quantificação, enquanto um subsequente MS/MS fornece a identificação da proteína.

As amostras de veia safena humana submetidas ao regime hemodinâmico venoso e arterial foram marcadas respectivamente com a forma isotopicamente leve [C_{12}] e a forma pesada [C_{13}] do reagente ICAT. Após processamento das amostras a análise foi realizada no espectrômetro de massa Q-TOF.

4.2.3. Análise por Espectrometria de Massas

Essencialmente todos os espectrômetros de massa medem a relação massa/carga de proteínas, peptídeos ou fragmentos de peptídeos. Atualmente, o espectrômetro de massa (MS) tem sido bastante utilizado em projetos para identificação de proteínas, e para detecção e caracterização de modificações pós-traducionais. Com os avanços tecnológicos, diferentes técnicas de proteômica têm sido combinadas com a MS permitindo a identificação de um painel de proteínas resultantes da expressão gênica total de uma amostra.

A análise das amostras obtidas no 2-D foram analisadas pelos equipamentos, 4700 Proteomics Analyzer, prO-TOF 2000 MALDI-TOF MS e Ettan MALDI-ToF. As amostras do experimento ICAT foram analisadas em equipamento Q-TOF Ultima no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) – Campinas, com a colaboração do Dr. Fábio César Gozzo. As descrições detalhadas de cada espectrômetro encontram-se no Anexo VIII.

4.3.CULTURA DE CÉLULAS

4.3.1. Cultura primária de células de músculo liso de veia safena (SVSMC) e artéria mamária (MASMC) humana

Pequenos fragmentos de veia safena ou de artéria mamária, após a retirada a camada endotelial por atrito mecânico, foram colocados em placas de cultura de 6 poços contendo 3% gelatina e cultivados em meio DMEM high glucose suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 100 µL/mL de estreptomicina em estufa umidificada a 37°C, 5% de CO₂. Após aproximadamente 1 semana, de crescimento das células musculares lisas, elas foram ampliadas e caracterizadas com anticorpo anti- α -SMA. Estas células foram mantidas na placa até a confluência de aproximadamente 80% e os repiques foram realizados por exposição à solução de tripsina/EDTA (250mg% - 1:250) por 5 minutos, e a manutenção da cultura em garrafas de 75cm² até a oitava passagem.

A cultura apresenta morfologia característica de células musculares lisas de “hill and valey” e presença de marcador específico para α -SMA.

4.3.2. Cultura primária de células endoteliais de veia safena (SVEC) humana

As culturas primárias de células endoteliais de veia safena foram mantidas em meio Human Endothelial – SFM suplementado com 20% de soro de bezerro recém-nascido, 100 U/mL de penicilina, 100 µL/mL de estreptomicina, 20ng/mL de b-FGF humano (fator básico de crescimento de fibroblasto), 10ng/mL de EGF (fator de crescimento epidermal) e em estufa umidificada a 37°C, 5% de CO₂.

Estas células foram mantidas em garrafas de 150cm² até a confluência de aproximadamente 100% para serem colocadas em placas e submetidas ao “shear stress”. Os repiques foram realizados por exposição à solução de tripsina/EDTA (250mg% - 1:250) por 5 minutos, e a manutenção da cultura foi mantida até a oitava passagem. 3,0 x 10⁶ células foram cultivadas em placas de cultura de 150x25 mm e após 2 dias submetidas ao “shear stress” de 15 dinas/cm² por um período de 24 horas no sistema de “cone plate”.

A cultura apresenta marcadores específicos de células endoteliais como, por exemplo, fator de Von willebrand e VE-caderina.

4.4. ESTÍMULOS FÍSICOS *IN VITRO*

4.4.1. Produção de “shear stress”

Para a produção de “shear stress” foi utilizado o sistema de “cone plate” (figura 4), que é o método tradicional de produzir “shear stress” “in vitro” (Malek, A. e col., 1992). Este sistema consiste de um cone, de ângulo superficial de 0,5°, girando sobre a cultura de células. A velocidade angular (ω) do cone é controlada e o “shear stress” é calculado através da fórmula abaixo:

$$\tau = \eta\omega/\alpha$$

onde: τ é o “shear stress” (dinas/cm²), η a viscosidade do meio de cultura (dinas.s/cm²), ω a velocidade angular do cone (rad./s) e α o ângulo superficial do cone (rad.).

As células foram submetidas ao “shear stress” de 15 dinas/cm² por um período de 24 horas no sistema de “cone plate”. Em seguida, estas células foram processadas para extração de RNA com Trizol.

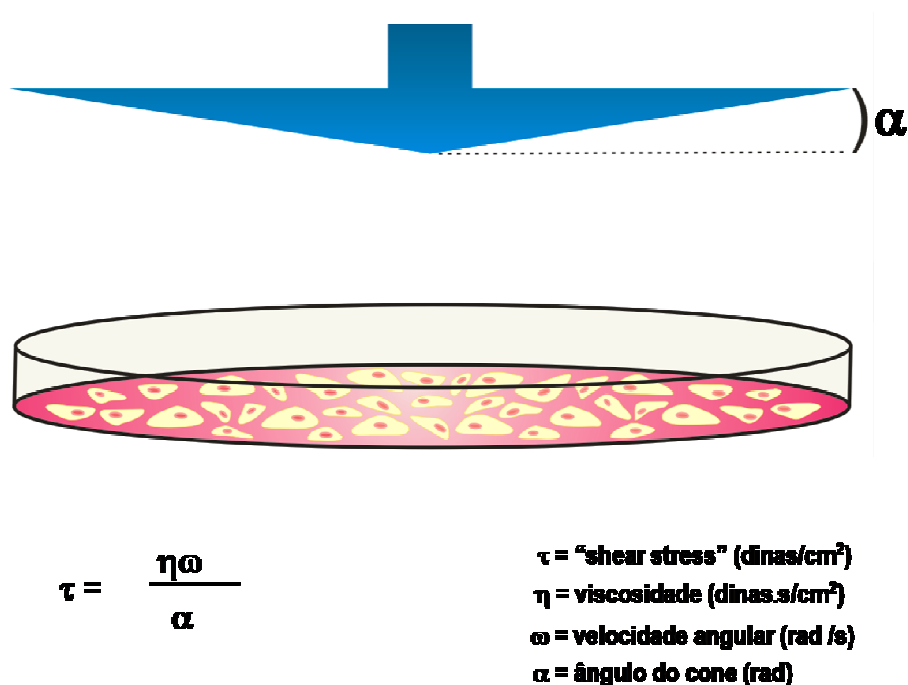


Figura 4: Sistema de "cone plate" utilizado para produção de "shear stress" nas células endoteliais. O cone gira sobre as células endoteliais e o "shear stress" pode ser variado através de alterações na velocidade angular ou da viscosidade do meio de cultura.

4.4.2. Produção de estiramento

Para a produção de estiramento foi utilizado o sistema "FX-4000TM Flexercell[®] Tension PlusTM".

Culturas primárias de células musculares lisas de veias safenas foram cultivadas em meio de cultura DMEM high glucose suplementado com 20% de FBS. $1,5 \times 10^5$ células foram cultivadas em placas de cultura de 6 wells 3,5 cm de diâmetro. Após 24 horas as células foram cultivadas em meio DMEM high glucose suplementado com 0,5% de FBS por um período de 48 horas. Em seguida as células foram submetidas ao estímulo mecânico de 10% de estiramento ("stretch") com

freqüência de 1Hz (figura 5), por um período de 24hs. As células foram lisadas com Trizol.

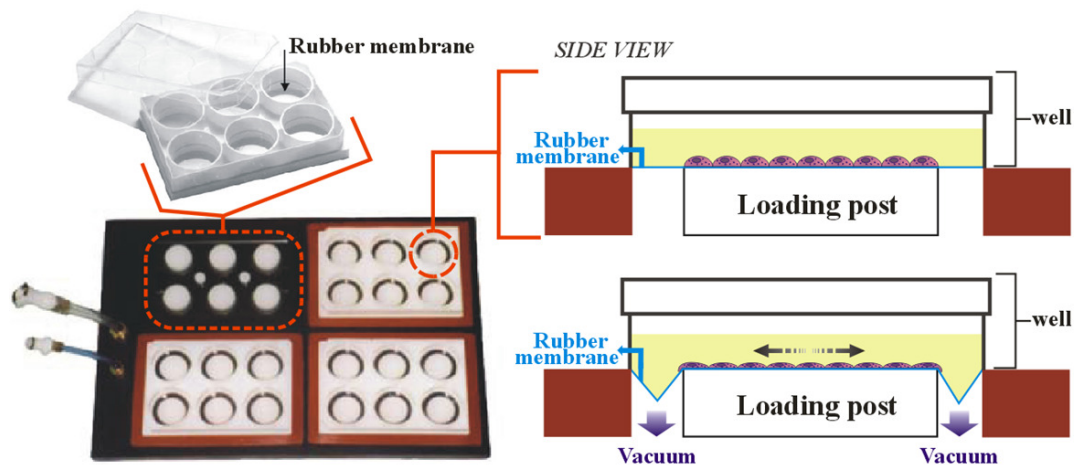


Figura 5: Sistema “Flexercell” utilizado para produção de “stretch” nas células musculares lisas. A membrana inferior da placa é estirada juntamente com as células que estão aderidas em sua superfície, provocando o estiramento das mesmas.

4.5. MODELO DE ARTERIALIZAÇÃO DE SEGMENTO VENOSO EM RATO

4.5.1. Fístula artério-venosa da veia jugular em artéria carótida

Foram usados ratos Wistar machos de 12 a 14 semanas de idade, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os ratos foram mantidos por todo o período com livre acesso a água e comida, temperatura controlada entre 22 e 24°C, com ciclo claro-escuro de 12 horas e, em número de no máximo 5 animais por gaiola. O protocolo de pesquisa nº418/03, abaixo, foi aprovado pela CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da FMUSP (Anexo II, item 2).

Ratos pesando 250g a 350g foram heparinizados com 70UI/Kg via intraperitoneal. Após trinta minutos foram anestesiados com ketalar (50mg/Kg) e rompum (10mg/Kg). A veia jugular externa direita foi dissecada na porção distal, clampeada e cortada. A artéria carótida comum, depois de dissecada, foi clampeada e cortada. A veia jugular externa foi então ligada à artéria carótida comum por anastomose término-terminal, utilizando o fio de sutura 10.0, formando uma junção artério-venosa da veia jugular na artéria carótida (Figura 6). Após a ligadura cirúrgica, o fluxo sanguíneo foi restabelecido e os animais acompanhados por 1, 3, 7, 14, 28 e 90 dias.

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

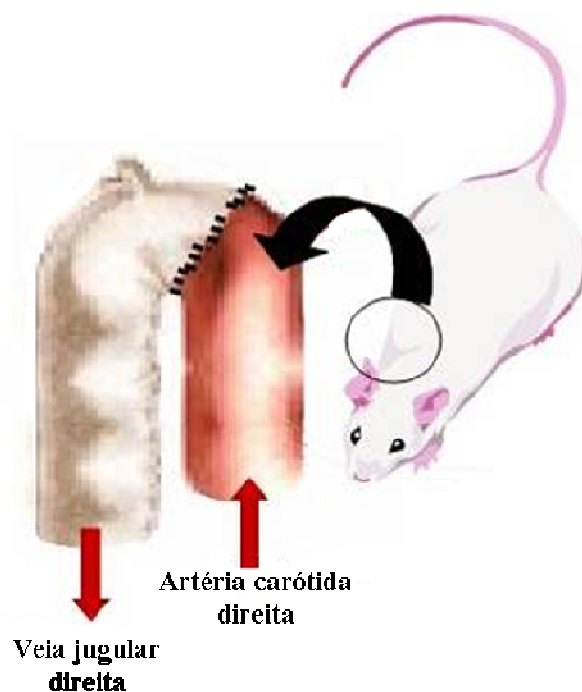


Figura 6: Representação esquemática da Fístula Artério-Venosa entre artéria carótida direita e veia jugular direita, realizada em ratos. As setas indicam a direção do fluxo sanguíneo

4.6. TÉCNICAS DE VALIDAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS

ALVO

4.6.1. Western Blot:

Esta técnica consiste em uma reação de anticorpo primário específico para a proteína de interesse, que está imobilizada em uma membrana de nitrocelulose. A revelação é feita através da utilização de um anticorpo secundário ligado à HRP e a reação química da peroxidase.

A separação das proteínas foi realizada por eletroforese em gel de poliácridamida 6% (para proteínas de alto peso molecular) e 8 ou 10% (para proteínas de baixo peso molecular), como descrito no anexo V item 2. Foram utilizadas concentrações de 30, 40 ou 80µg de extrato de veia safena cultivada no sistema *ex*

vivo. As proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose Hybound ECL, utilizando o sistema de transferência semi-seco, a uma tensão constante de 10 Volts. Para bloquear as reações inespecíficas a membrana foi incubada com 5% leite desnatado por 4 horas e, então, incubados com o anticorpo primário de interesse (tabela 1) diluídos em PBST (137mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,76mM KH₂PO₄ pH 7,4 e 0,1% Tween) e 3% BSA. Após 18h de incubação a 4°C, a membrana foi lavada 3 vezes por 10 minutos com PBST e incubadas por 1h temperatura ambiente com anticorpo secundário (tabela 1) diluídos em PBST e 5% de leite desnatado. Depois de lavagem em PBST, a membrana foi revelada pela reação da peroxidase com a solução (2,5mM Luminol, 400µM ácido p-comárico, 100µM Tris pH 8,5 e 5mM H₂O₂) e expostas ao Hyperfilm ECL. As bandas foram quantificadas no programa ImageJ (Rasband, 2004) utilizando como normalizadores a quantificação do Western blot para GAPDH e a quantificação de um padrão interno utilizado para todas as membranas.

As concentrações de cada anticorpo utilizado encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Descrições dos anticorpos utilizados no Western blot para validação das proteínas α -SMA e CRP3 no processo de arterialização de enxertos venosos e suas respectivas concentrações de uso.

Proteína	Anticorpo Primário	Concentração $\mu\text{g/ml}$	Diluição	Anticorpo Secundário	Concentração $\mu\text{g/ml}$	Diluição
α -actina	α -actina de músculo liso (mouse clone 1A4 – Sigma)	0,25 $\mu\text{g/ml}$	1:4000	Rabbit anti-mouse HRP (Zymed - Invitrogen)	0,2 $\mu\text{g/ml}$	1:8000
CRP3	CRP3 (rabbit – gentilmente cedido por Dr. Arber (Arber e cols., 1994)	-	1:2000	Goat anti-rabbit HRP (Zymed - Invitrogen)	0,4 $\mu\text{g/ml}$	1:4000
GAPDH	GAPDH (rabbit – policlonal – R&D)	0,5 $\mu\text{g/ml}$	1:2000	Goat anti-rabbit HRP (Zymed - Invitrogen)	0,75 $\mu\text{g/ml}$	1:2000

4.6.2. Imuno-histoquímica

Esta técnica consiste em uma reação de um anticorpo primário específico com a proteína de interesse presente em cortes histológicos do tecido estudado, utilizando para revelação um anticorpo secundário ligado à HRP e a reação química da peroxidase.

Os segmentos vasculares foram colocados em formalina tamponada 4% por um período de 24 a 48 horas. Após este período, o material foi processado, incluído em parafina, e em seguida cortado em micrótomo em espessura de 3 μm . No caso dos segmentos de veia jugular arterializada, os cortes foram iniciados a 400 μm a partir da sutura.

Os tecidos foram desparafinizados em *xilol*, reidratados em graduações decrescentes de álcool e água. Para bloquear a peroxidase endógena dos tecidos, foram realizados 7 banhos de água oxigenada por 3 minutos, depois feita a

recuperação antigênica por panela à vapor Pascal em solução de citrato de sódio 10mM, pH6,0, por 50 minutos. Para bloquear as reações inespecíficas os tecidos foram banhados com 2% leite desnatado por 20 minutos e, então, incubados com anticorpo primário de interesse diluído em solução 5% BSA. Após 18h de incubação à 4°C, os tecidos foram lavados 3 vezes por 5 minutos com PBS (137mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM Na₂HPO₄ e 176mM KH₂PO₄, pH 7,4) e incubados com anticorpo secundário. As concentrações de cada anticorpo utilizado encontram-se na Tabela 2. Depois de lavados em PBS os tecidos foram incubados com solução 2 do kit LSAB HRP Universal que contém complexo biotina estreptavidina para amplificação do sinal do anticorpo primário e, então, foram revelados em solução de diaminobenzidina tetrahydroclorida (DAB) por 7 minutos. Os tecidos foram contra corados com colorações específicas (contra-colorações), conforme descrição abaixo, e então diafanizados e as lâminas foram montadas em resina e avaliadas segundo sua marcação.

A quantificação foi realizada através dos programas *Leica Qwin* versão 2.2 Q500IW e *ImageJ* (Rasband, 2004). Foram mensuradas as áreas de marcação positiva para a proteína de interesse e a área total do vaso. Em cada corte foram realizadas 4 medidas por dois avaliadores cegos quanto ao conteúdo das lâminas.

Tabela 2. Descrições dos anticorpos utilizados na Imuno-histoquímica para validação das proteínas α -SMA e CRP3 no processo de arterialização de enxertos venosos e suas respectivas concentrações de uso.

Proteína	Anticorpo Primário	Concentração $\mu\text{g/ml}$	Diluição
α -actina	α -actina de músculo liso (mouse clone 1A4 – Sigma)	16,2 $\mu\text{g/ml}$	1:500
CRP3	CRP3 (rabbit – gentilmente cedido por Dr. Arber (Arber e cols., 1994))	-	1:400

Contra-coloração

α -SMA:

As reações de imuno-histoquímica para α -SMA foram contra-coradas com a hematoxilina de *Harris* que cora em azul o núcleo celulares. Após a reação de imuno-histoquímica os tecidos foram corados com hematoxilina de *Harris* por 2 minutos, enxaguados em água corrente e em seguida mergulhados rapidamente na seqüência de: água amoniacal à 1% para azular a hematoxilina, água corrente, ácido clorídrico à 0,01% para diferenciar a coloração. Finalmente, foram clareados e desidratados em graduações crescentes de alcoóis.

Além disto, foi realizada a coloração de Miller que cora em azul as lâminas elásticas para melhor visualização das túnicas vasculares. Após desparafinização os tecidos foram corados com Miller por 1 hora, clareados em graduações crescentes de alcoóis e enxaguados em água deionizada para fixação da

coloração. Neste caso, a contra-coloração é inicialmente realizada por se tratar de uma solução muito ácida e alcoólica, que retira a imunomarcação se realizada após a mesma.

CRP3:

As reações de imuno-histoquímica para CRP3 foram contra-corados com azul de anilina que cora o colágeno em azul. Após a reação de imuno-histoquímica os tecidos foram corados com azul de anilina a 2% por 5 minutos, clareados em água deionizada de 4 a 5 vezes, desidratados em graduações crescentes de álcool, diafanizados e montados em resina.

4.6.3. Imuno-precipitação

Na imunoprecipitação, um anticorpo ligado a minúsculas esferas de agarose (uma resina) é utilizado para precipitar o antígeno. Geralmente esta ligação entre anticorpo e agarose é feita através de uma proteína A ou G, mas também pode ser feita através de outras pontes como a biotina/estreptoavidina.

500µg de extrato de veia safena cultivada no sistema *ex vivo* foi incubado com 2µg do anticorpo primário contra α -SMA (monoclonal 1A4) por 18 horas a 4°C. Em seguida, incubado por 2 horas a 4°C com a proteína G ligada à agarose (Protein G Sepharose 4 Fast Flow). Como as esferas de agarose possuem um tamanho imenso quando comparadas com os componentes celulares encontrados no lisado, elas foram precipitadas usando uma centrifugação a baixa velocidade (5000rpm). Após esta centrifugação o precipitado (no qual está o antígeno ligado à agarose) foi dissolvido em uma solução de eletroforese e analisado através da técnica eletroforética descrita no Anexo V item 2.

4.7. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

4.7.1. Extração de RNA

Veias safenas foram trituradas através da pulverização de nitrogênio líquido e em seguida homogeneizadas em 1mL de Trizol utilizando o Triturador e Homogeneizador de Tecidos PowerGen 125. No caso de cultura de células, o Trizol foi adicionado diretamente na cultura. O protocolo foi realizado de acordo com instruções do fabricante. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, à 12000rpm a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e adicionado 200µL de clorofórmio. Os tubos foram homogeneizados e incubados por 3 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação de 15 minutos, 12000rpm a 4°C, a fase superior foi transferida para um novo tubo onde foi adicionado 500µL de isopropanol. Em seguida, as amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas por 10 minutos, 12000rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 1mL de 75% de etanol foi adicionado ao precipitado de RNA. Após centrifugação de 5 minutos, 7500rpm a 4°C, o precipitado de RNA foi diluído em água milliQ. Para se certificar da integridade das moléculas de RNA, ou seja, verificar se não houve nenhuma degradação durante o processo de extração, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% (1% agarose, 40mM Tris acetato e 2mM EDTA).

4.7.2. Síntese de cDNA

500ng de RNA total de veias safenas cultivadas no sistema *ex vivo* foram utilizados para a síntese de cDNA. Para a construção de cDNAs, utilizamos o kit

High – Capacity cDNA Archive, seguindo instruções do fabricante. Este kit utiliza primers randômicos que amplificam seqüências aleatórias do fragmento de RNA.

4µg de RNA total de cultura primária de células musculares lisas endoteliais de veia safena e artéria mamária humana foram utilizados para a síntese de cDNA. A reação de transcriptase reversa foi realizada através da utilização da *Superscript III*, seguindo instruções do fabricante.

Estes 2 protocolos possuem a mesma eficiência de transcrição reversa e são de uso rotineiro no laboratório.

4.7.3. RT-PCR

Após a síntese de cDNA a partir de RNA total, o RT-PCR foi realizado utilizando 50ng de cDNA. Inicialmente os oligonucleotídeos iniciadores (tabela 3) desenhados especificamente para cada gene em estudo foram testados quanto ao número de ciclos (20, 25, 30 e 35). O protocolo estabelecido esta ilustrado na tabela 4.

Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para estudo de RT-PCR e RT-PCR em tempo real, e o tamanho do amplificado gerado.

Gene	Senso (5' → 3') Anti-senso (5' → 3')	Amplicon pb
h - CRP1	senso: 5' gagccagctgccagaatg 3' antisenso: 5' ccttcgactgaacctcttc 3'	95
h - CRP2	senso: 5' ggtgaaatctattgtaaaggatgc 3' antisenso: 5' tactgggcatgaacaagagc 3'	95
h - CRP3	senso: 5' gtgccatctgtgggaagagt 3' antisenso: 5' aaggcctccaaaccaatac 3'	119
r - CRP3	senso: 5' attgggttgagggttac 3' antisenso: 5' tgtgactagcagggtgtg 3'	80
α-actina 2 humana	senso: 5' tcaatgtcccagccatgta 3' antisenso: 5' cattgtgggtgacaccatct 3'	80
28S	senso: 5' tcatcagaccccagaaaagg 3' antisenso: 5' gattcggcaggtgagttgt 3'	101
h - Ciclofilina	senso: 5' atggtcaaccccaccgtgt 3' antisenso: 5' tctgctgtcttgggaccttgc3'	101
r - Ciclofilina	senso: 5' aatgctggaccaaacacaaa 3' antisenso: 5' ccttcttcaccttccaaa 3'	101

Tabela 4. Condições do RT-PCR determinadas para os genes selecionados.

Genes	Ciclos do RT-PCR
α -actina 2- humano, 28S, Ciclofilina	95°C – 5 min, (95°C – 1 min, 60°C – 30 seg, 72°C – 1 min) 26x, 72°C – 10 min
h-CRP1, h-CRP2, h-CRP3, rCRP3	95°C – 5 min, (95°C – 1 min, 60°C – 30 seg, 72°C – 1 min) 34x, 72°C – 10 min

4.7.4. RT-PCR em tempo real

Após a síntese de cDNA a partir de RNA total, o RT-PCR em tempo real foi realizado utilizando o kit SYBR[®] Green PCR Master Mix de acordo com instruções do fabricante. A reação de RT-PCR em tempo real foi realizada no ABI PRISM 7700 *Sequence Detector* utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos (tabela 3) para o gene de interesse e detecção por *SYBR Green*.

Nesta metodologia, o PCR foi combinado a um intercalante fluorescente de DNA dupla fita, o SYBR Green I. Desta forma, um sinal fluorescente gerado é diretamente proporcional à quantidade de produto de PCR na reação. 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 de 100%, ou seja, a quantidade de DNA deve duplicar após cada ciclo da fase exponencial.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados estão representados como média \pm erro padrão da média. As amostras humanas foram comparadas utilizando teste t pareado e as amostras do modelo animal de rato foram comparadas por análise de variância (ANOVA) de um caminho. Os dados foram considerados significativamente diferentes para valores de $p < 0,05$.

Resultados



5. Resultados

5.1. Identificação de proteínas modificadas em veia safena humana arterializada

Para analisar o padrão de proteínas modificadas em veia safena humana arterializada foram utilizadas 2 diferentes metodologias proteômicas: o gel 2-D e o ICAT. O ICAT apresenta vantagens sobre o gel 2-D por ser quantitativo e apresentar maior sensibilidade. A desvantagem é que o ICAT possibilita a identificação somente de peptídeos que contém cisteína, uma vez que o ICAT liga-se à proteína através de alquilação de cisteínas livres. Desta maneira, o gel 2-D e o ICAT são metodologias complementares que possibilitarão a identificação de um amplo espectro de proteínas alteradas quando a veia safena é cultivada em condição hemodinâmica arterial.

5.1.1. Identificação pela técnica de gel 2-D.

Para realização do gel 2-D, 2 “pools” protéicos de veia safena humana cultivada no sistema *ex vivo* foram montadas, cada um composto por 200µg de proteína de 6 indivíduos distintos, totalizando em 1200µg por “pool”. A primeira dimensão foi realizada com “IPG-Strip” de 24cm com faixa de pH 4-7 ou pH 3-10. Após a segunda dimensão o gel foi corado com Coomassie Colloidal e a imagem foi adquirida no programa ImageScanner. A figura 7 representa a retirada das proteínas de interesse do gel contendo amostras do “pool” 1. A detecção e análise das proteínas foram realizadas utilizando-se o programa ImageMaster 2D Elite. As proteínas de interesse foram isoladas manualmente e enviadas para o Instituto de Pesquisas Schepens Eye para serem identificadas no espectrômetro de massa do tipo MALDI.

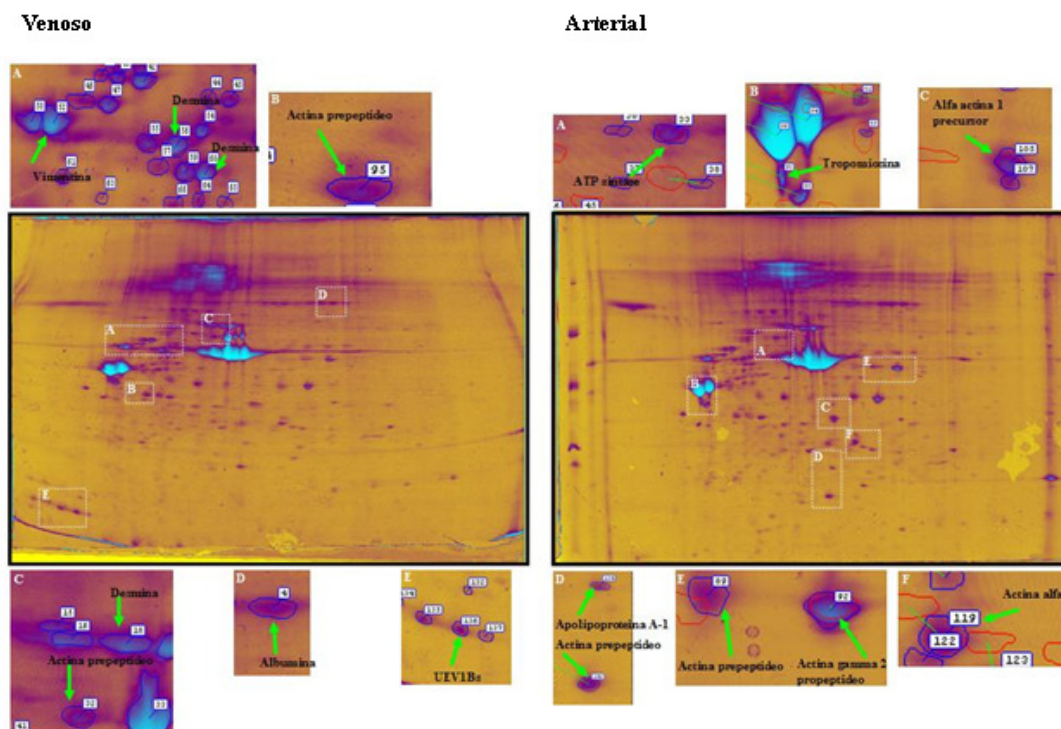


Figura 7: Gel 2D utilizando “IPG-strip” 24cm pH 4-7, corado com Coomassie Colloidal Blue, “Pool” 1 de veia safena cultivada em regime hemodinâmico venoso (5mL/min) (esquerda) e arterial (50mL/min - 80mmHg) (direita). As setas indicam proteínas que apresentaram diferença de expressão entre as duas condições de cultura de veia safena e foram isoladas e identificadas pela análise por espectrometria de massa.

As proteínas de interesse selecionadas para identificação foram quantificadas no programa ImageMaster 2D Elite e as figuras 8 e 9 representam respectivamente, as amostras de proteína de veia safena do “pool” 1 e do “pool” 2.

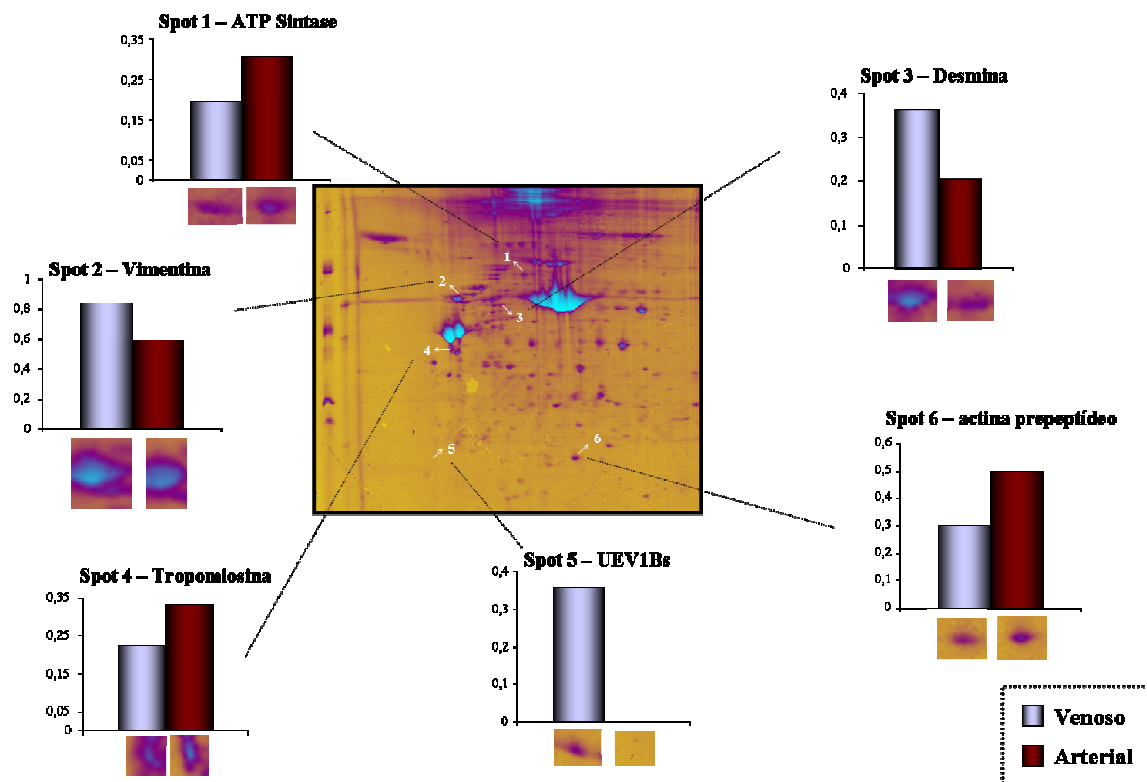


Figura 8: Gel 2-D de veia safena cultivada em regime arterial utilizando “pool”1 e quantificação de algumas proteínas identificadas.

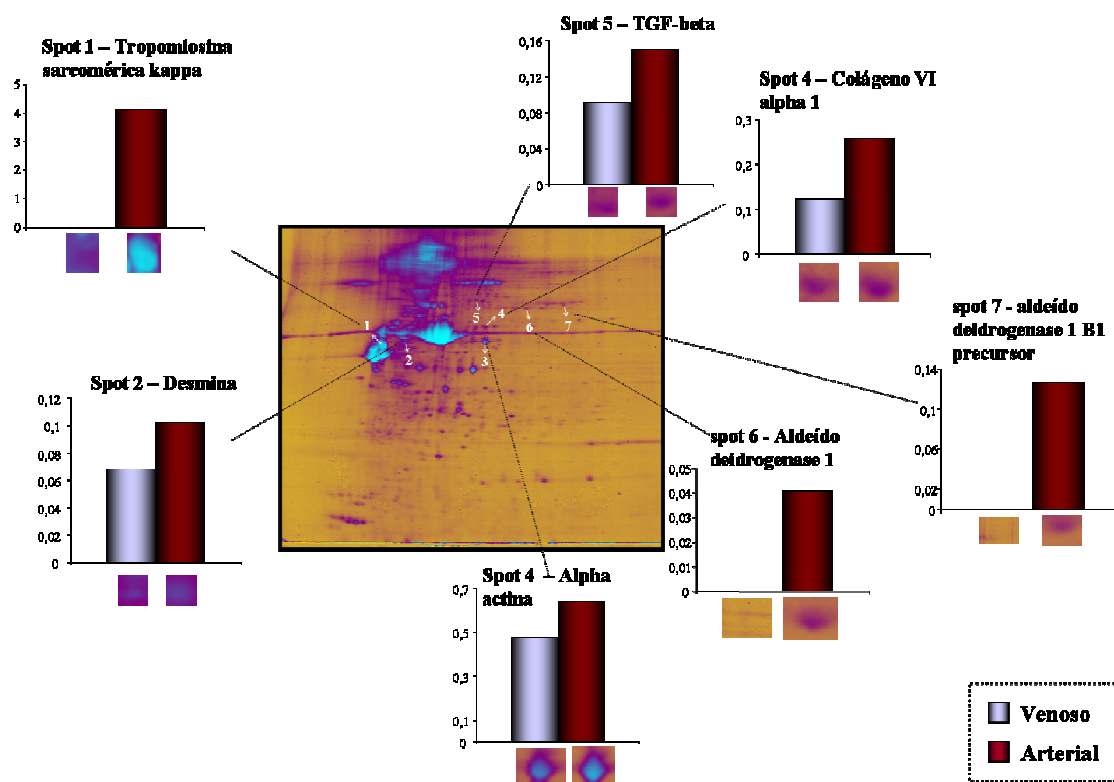


Figura 9: Gel 2-D de veia safena cultivada em regime arterial utilizando “pool”2 e quantificação de algumas proteínas identificadas.

As tabelas 5, 6, 7 e 8 mostram as proteínas identificadas nos diferentes “pools” e que estavam quantitativamente e/ou qualitativamente em quantidades diferentes na veia safena arterializada. Pode-se notar que a maioria das proteínas identificadas apresentam funções estruturais. Isto sugere que quando a veia safena é colocada em regime arterial ocorrem alterações estruturais importantes necessárias para sua adaptação, de tal forma que possa desempenhar suas funções fisiológicas na nova condição hemodinâmica que está sendo exposta. Neste contexto, chamamos a atenção para a proteína, α -actina 2 (α -SMA), destacada na tabela 6, que foi selecionada para validação individual na veia safena de pacientes cultivadas no sistema *ex vivo*.

Tabela 5. Proteínas identificadas pela técnica de gel 2-D realizado no “Pool” 1 e “Pool” 2

“POOL” 1			“POOL” 2		
Proteínas aumentadas	pI	PM	Proteínas aumentadas	pI	PM
Actina α -1	5,7	38kDa	α -actina proproteína	5,7	33kDa
Actina γ -2 propeptídeo	5,8	42kDa	α -actina	5,8	42kDa
Actina prepeptídeo	6	37kDa	Actina α -1	5,7	38kDa
ATP sintase	5,2	56kDa	Actina γ -1 propeptídeo	6	42kDa
Tropomiosina	4,7	32kDa	Colágeno VI α-1	6	48kDa
			Desmina	4,7	53kDa
			TGF-β	6	75kDa
			Vimentina	5	50kDa
			Tropomiosina 4	4,5	28kDa
			Miosina isoforma 1	4,6	17kDa
			Actina prepeptídeo	5	37kDa

que estavam *aumentadas* na veia safena humana arterializada no sistema *ex vivo*.

Tabela 6. Proteínas identificadas pela técnica de gel 2-D realizado no “Pool” 1 e “Pool” 2

que estavam *diminuídas* na veia safena humana arterializada no sistema *ex vivo*.

“POOL” 1			“POOL” 2		
Proteínas diminuídas	pI	PM	Proteínas diminuídas	pI	PM
Actina prepeptídeo	4,6	28kDa	Miosina isoforma 3	4,5	17kDa
Albumina	5,9	71kDa	Tropomiosina β -2	4,6	33kDa
Desmina	5,2	53kDa	ATP sintase	5,3	56kDa
Vimentina	4,8	40kDa	Vimentina	5	45kDa
			Desmina	5,2	53kDa
			Tropomiosina α -1	4,7	32kDa
			α-actina 2	5,5	42kDa

Tabela 7. Proteínas identificadas pela técnica de gel 2-D realizado no “Pool” 1 e “Pool” 2 que *são expressas apenas* na veia safena humana arterializada no sistema *ex vivo*.

“POOL” 1			“POOL” 2		
Expressa apenas em SV arterializada	pI	PM	Expressa apenas em SV arterializada	pI	PM
Actina α -1 precursor	5,2	25kDa	Aldeído desidrogenase 1A1	7,2	55kDa
ApoA1	5,6	28kDa	Aldeído desidrogenase 1B1	6,4	48kDa
			Tropomiosina k sarcomérica	4,3	32kDa
			Miosina cadeia leve 2	4	19kDa
			Tropomiosina 1	4,5	33kDa
			Desmina	4,7	53kDa

Tabela 8. Proteína identificada pela técnica de gel 2-D realizado no “Pool” 1 e “Pool” 2 que *não é expressa* na veia safena humana arterializada no sistema *ex vivo*.

“POOL” 1		
Não Expressa em SV arterializada	pI	PM
UEV1Bs	4,1	17kDa

5.1.2. Identificação pela técnica ICAT

Inicialmente, foi necessário passar por uma série de padronizações para familiarização com a técnica e para testar o funcionamento da metodologia nas amostras de veia safena humana (Anexo VII). Através deste procedimento foi possível determinar as condições de experimento necessárias para o processamento das amostras de veia safena. Com isso, ficou determinado que a amostra deve ser

injetada no espectrômetro de massa Q-TOF com um fluxo de 0,5µl/min., separada por cromatografia de fase-reversa, onde os peptídeos são separados de acordo com sua hidrofobicidade, utilizando um gradiente de acetonitrila de 0% à 70% por um período de 120 minutos. A figura 10 mostra no cromatograma da análise de proteínas de veia safena marcadas com ICAT que ao final da migração, nas condições descritas acima, a intensidade de fragmentação dos íons já está muito próxima ao ruído inicial mostrando que toda a amostra foi analisada (figura 10A). Pode-se observar também a presença de vários peptídeos marcados com o par de ICAT, e a presença de pares de peptídeos com diferenças de expressão como exemplificado na região indicada pela seta (Figura 10B).

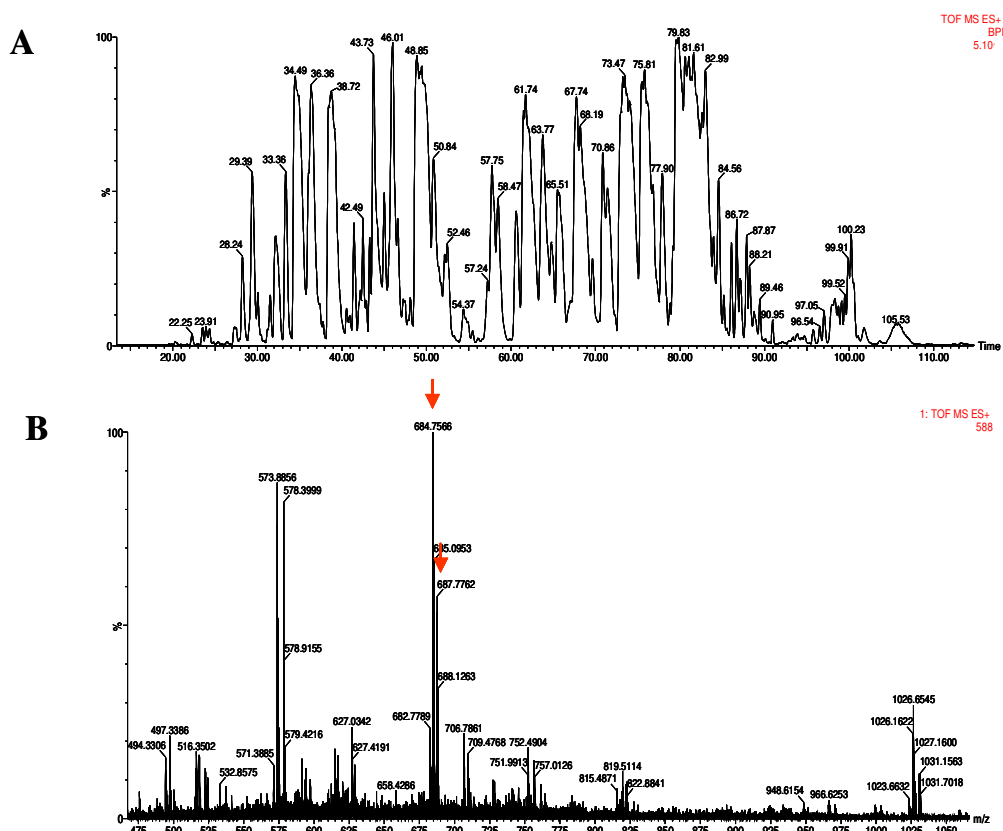


Figura 10: (A) Cromatograma obtido pela análise no Q-ToF (Waters-Micromass) por LC/MS de amostras de veia safena cultivadas em regime venoso e arterial marcadas com ICAT isotopicamente leve e pesado, respectivamente. Após 120 minutos de corrida a intensidade de fragmentação de peptídeos está muito próxima ao ruído inicial da corrida indicando a análise completa da amostra. (B) espectro obtida a partir do cromatograma representado em (A). Pode-se observar a presença de vários peptídeos marcados com o par de ICAT, e as setas exemplifica um par de peptídeo com diferenças de expressão.

A análise do cromatograma foi realizada pelo programa ProteinLyns 2.0 – Waters que gerou uma tabela contendo informações de cada peptídeo marcado pelo par de ICAT (tabela 9), com análises quanto ao seu padrão isotópico e a distância m/z entre os pares como exemplificado na Figura 11. Na figura 11A observa-se um

peptídeo com íon de carga +3 que contém uma distância m/z entre o par peptídico ICAT igual a 6. Isto resulta na diferença de massa entre o par peptídico de 18Da mostrando a presença de duas cisteínas no peptídeo. A quantificação das áreas mostra que este peptídeo está em maior quantidade na amostra venosa do que na amostra arterial. Nas figuras 11B e 11C estão exemplificados peptídeos com íon carga +2 com distância de 4,5 m/z . Em ambos os casos a diferença de massa entre os pares peptídicos ICAT é 9Da mostrando a existência de 1 cisteína (ver tabela 12 do anexo VII). Uma observação importante é que na figura 11B está representado um peptídeo com diminuição da expressão na veia safena cultivada em regime hemodinâmico arterial em relação à expressão do peptídeo de veia safena que foi cultivada em regime hemodinâmico venoso, já na figura 11C está sendo mostrado um peptídeo com aumento de expressão na veia safena que foi cultivada em regime hemodinâmico arterial em relação ao venoso. Na tabela 9 estão sendo mostradas informações como quantidade de cisteínas, tempo de eluição e massa do peptídeo fragmentado, área dos picos dos pares peptídicos e a relação entre as áreas. Os dados fornecidos pelo programa foram conferidos levando em consideração que o par peptídico deve ter o mesmo pico de tempo de eluição e os valores das áreas maiores do que 50. O mesmo pico de eluição indica que se trata do mesmo peptídeo, pois estes possuem as mesmas características e devem eluir da coluna em tempos bastante semelhantes; os valores de área maiores que 50 é para evitar valores de intensidade muito baixa que possam ser confundidos com ruídos gerados pelo aparelho Q-ToF. Estão sendo mostrados 4 peptídeos que apresentaram uma maior expressão em veia safena que foi submetido ao regime hemodinâmico arterial em relação ao peptídeo de veia safena que permaneceu em regime hemodinâmico venoso e 15 peptídeos que

apresentaram em menor quantidade do peptídeo de veia safena que estava em condição arterial em relação ao que permaneceu em condição venosa. Para identificação dos peptídeos de interesse há a necessidade de uma nova etapa de análise por LC/MS/MS. A realização desta nova etapa não foi possível porque toda a amostra foi utilizada para a padronização do método.

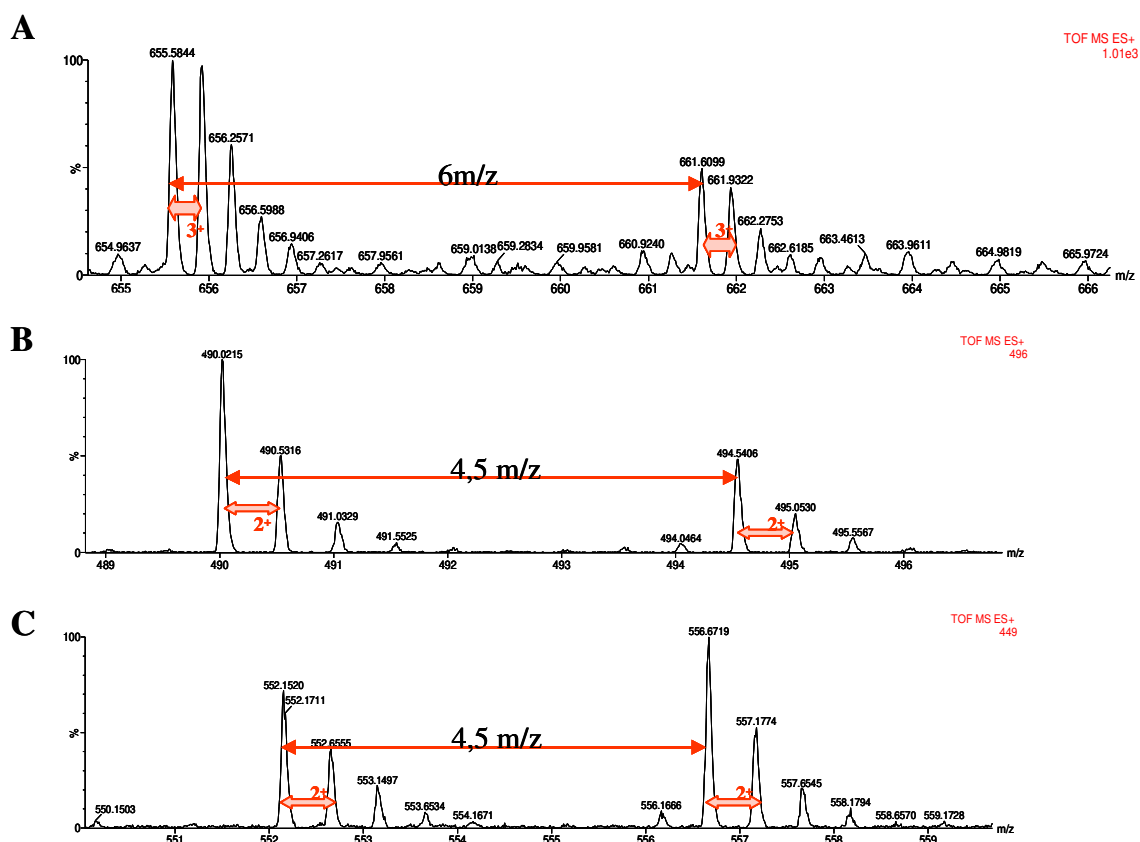


Figura 11: Espectros amostra de veia safena cultivada em regime venoso e arterial marcadas, respectivamente, com ICAT isotopicamente leve e pesado analisado pelo Q-ToF (Waters-Micromass) por LC/MS. (A) Representação de um peptídeo que contém 2 cisteínas, marcado com o par de ICAT; (B) Representação de um peptídeo que contém 1 cisteína, marcado com o par de ICAT e uma diminuição na expressão do peptídeo de veia safena que foi cultivada em regime hemodinâmico arterial e (C) Representação de um aumento na expressão do peptídeo de veia safena que foi cultivada em regime hemodinâmico arterial.

Tabela 9. Peptídeos marcados com o par de ICAT que apresentaram diferença de expressão, analisado pelo programa ProteinLynx 2.0 – Waters.

Peptídeo	Cisteína	Tempo de Eluição do peptídeo marcado com ICAT leve						Tempo de Eluição do peptídeo marcado com ICAT pesado						Razão área leve/área pesado
		Massa Leve	Massa pesado	Carga	Início	Topo	Fim	Início	Topo	Fim	Área leve	Área pesado		
1	1	689,524	691,774	4	43,2	43,4	43,7	43,23	43,4	43,7	99,83	138	0,72	
2	1	552,154	556,687	2	64,9	65	65,1	64,94	65	65,1	76,34	102,71	0,74	
3	1	902,3715	904,6185	4	76,2	76,2	76,3	76,15	76,2	76,3	43,12	56,93	0,75	
4	1	566,52	571,031	2	40,1	40,5	40,9	40,15	40,5	40,7	184,57	224,1	0,82	
5	1	760,0264	763,0485	3	44,3	44,5	45,1	44,34	44,5	44,9	936,12	698,27	1,34	
6	1	372,0637	376,583	4	52,4	52,4	52,5	52,41	52,4	52,6	2145,23	1460,82	1,46	
7	2	606,9683	614,9818	2	27,4	27,5	27,6	27,32	27,5	27,6	719,23	388,15	1,85	
8	1	431,05	435,564	2	24,9	25,2	25,6	24,89	25,2	25,5	74,24	37,04	2,00	
9	2	635,586	661,603	3	30,5	30,8	31,1	30,54	30,8	31,2	139,98	69,62	2,01	
10	1	498,033	502,543	2	40,3	40,6	41,1	40,23	40,6	41	128,36	63,02	2,04	
11	1	697,037	701,551	2	42,9	43,3	43,5	43,14	43,2	43,5	161,37	70,5	2,29	
12	1	473,534	478,048	2	53,9	54,4	55,1	53,86	54,4	54,5	793,17	319,44	2,48	
13	1	490,028	494,545	2	40,3	40,5	41,1	40,01	40,5	41,2	1318,78	701,47	1,92	
14	1	690,317	693,329	3	42	42,1	42,5	41,96	42,1	42,5	331,17	130,52	2,54	
15	1	939,67	942,679	3	47,2	47,5	47,6	47,44	47,5	47,6	144,56	54,64	2,65	
16	1	456,118	460,631	2	52,4	52,4	52,6	52,41	52,4	52,5	302,15	107,96	2,80	
17	1	648,463	652,976	2	30,1	30,5	31,2	30,22	30,4	31	291,65	98,35	2,97	
18	2	502,6439	508,6688	3	23,7	23,9	24,3	23,74	23,9	24,2	369,12	142,3	2,17	
19	1	369,645	369,6613	3	27,4	27,5	27,6	27,36	27,5	27,6	135,42	5,69	23,80	

Com a metodologia experimental testada, foi realizado um experimento utilizando 150µg de proteína do “pool” 1 de veias safenas cultivadas em regime venoso e arterial (o mesmo utilizado no gel 2-D), que foram marcadas respectivamente com ICAT isotopicamente leve (C₁₂) e pesado (C₁₃). A figura 12 representa o cromatograma (A) e o espectro (B) do experimento de ICAT realizado no “pool” 1 com a presença de vários peptídeos marcados com o par de ICAT, e a presença de pares de peptídeos com diferenças de expressão como exemplificado na região indicada pela seta (Figura 12B).

Tabela 10. Proteínas identificadas em experimento de ICAT realizado no “Pool” 1 de veia safena humana cultivada em regime hemodinâmico venoso (fluxo: 5 mL/min.) e arterial (fluxo:50 mL/min., pressão: 80 mmHg) por 24 horas.

Expressão aumentada em veia safena arterializada	Expressão diminuída em veia safena arterializada	n.º vezes A/V
- Colágeno VI α -1		+ 3,1
	- Filarina A α	- 3,8
	- Proteína rica em glicina e cisteína 1(CRP1)	- 1,6
	- Precursor biglicana	- 2,2
	- Cadeia Pesada de Miosina isoforma de músculo liso (SMMHC)	- 2,2
	- Tropomiosina β 2	- 2,1
	- Actina α 2	- 2

Apesar de 165 peptídeos terem sido selecionados na análise LC/MS com expressão diferenciada em veias safenas arterializadas, houve uma baixa eficiência durante o sequenciamento (análise LC/MS/MS). Isto pode ter ocorrido devido à baixa quantidade do peptídeo que seria identificado, ou seja, impossibilitando que a intensidade do sinal atingisse a sensibilidade do aparelho, ou ainda a abundância de proteínas estruturais na amostra proporcionou picos com intensidade de sinal muito forte no cromatograma o que acabou encobrendo os peptídeos em menor quantidade.

Assim como no gel 2-D, o ICAT mostrou que as proteínas diferentemente expressas nas veias safenas arterializadas desempenham função estrutural nas

células, mostrando mais uma vez que elas parecem ser muito importantes no processo de arterialização dos enxertos venosos. Em destaque nas tabelas 6 e 10 estão as proteínas que foram selecionadas para iniciar as validações funcionais. Note que a α -SMA apresentou-se diminuída quando analisada pelas duas metodologias proteômicas.

5.2. Validação das proteínas diferentemente expressa na veia safena humana arterializada identificadas pelas metodologias proteômicas.

Os alvos selecionados para validação foram: α -SMA e a CRP. Devido à utilização de “pools” protéicos para a realização das estratégias proteômicas, há a necessidade de validação dos alvos selecionados em amostras individuais de segmentos de veia safena arterializadas. A seguir, serão apresentados os dados de validação das proteínas candidatas e as estratégias que estão sendo utilizadas para a caracterização funcional das mesmas.

5.2.1. α - SMA

As α -SMAs são microfilamentos longos de 42KDa com características contráteis e participam ativamente nos movimentos celulares. A α -SMA em conjunto com diversas proteínas que constituem o citoesqueleto, formam uma estrutura altamente dinâmica que se reorganiza continuamente sempre que a célula altera a forma, se divide ou responde ao seu ambiente.

A expressão protéica da α -SMA foi avaliada em amostras individuais de segmentos de veias safenas humanas cultivadas em regime venoso e arterial por

24 horas. Experimento de “western blot” mostrou que a α -SMA não modifica na veia safena arterializada (em unidades arbitrárias - venoso: $100 \pm 4,5$ e arterial: $104,23 \pm 4,12$) (Figura 13A), já a imuno-histoquímica sugere um aumento da produção de proteína α -SMA (em área SMA positiva/área total do vaso - venoso: $100 \pm 5,2$ e arterial: $120,12 \pm 7,6$; $p < 0,05$) (Figura 13B). A expressão gênica também foi avaliada, e da mesma maneira que a expressão protéica, não houve alteração significativa da α -SMA, no entanto pode ser observada uma tendência a diminuição (Figura 13C). Analisando as amostras individualmente, foi possível notar uma grande variabilidade na expressão de α -SMA entre os indivíduos estudados, tanto na expressão protéica (figura 14) como na expressão gênica.

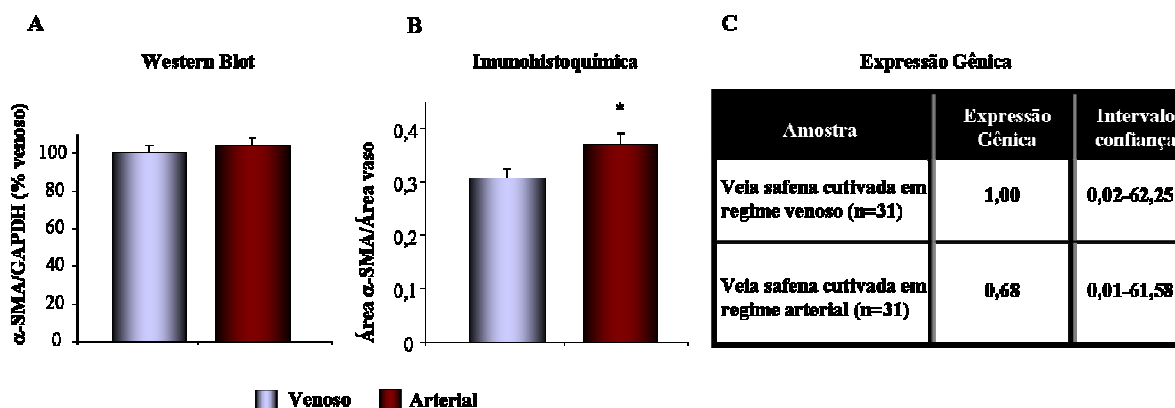


Figura 13: Quantificação de: (A) western Blot, (B) imuno-histoquímica e (C) RT-PCR em tempo real, para α -SMA. Em cinza, veia safena cultivada no sistema hemodinâmico venoso (fluxo: 5ml/min) e em vermelho, veia safena cultivada no sistema hemodinâmico arterial (fluxo: 50ml/min e pressão: 80mmHg). * $p < 0,05$ vs veia safena cultivada no sistema hemodinâmico venoso.

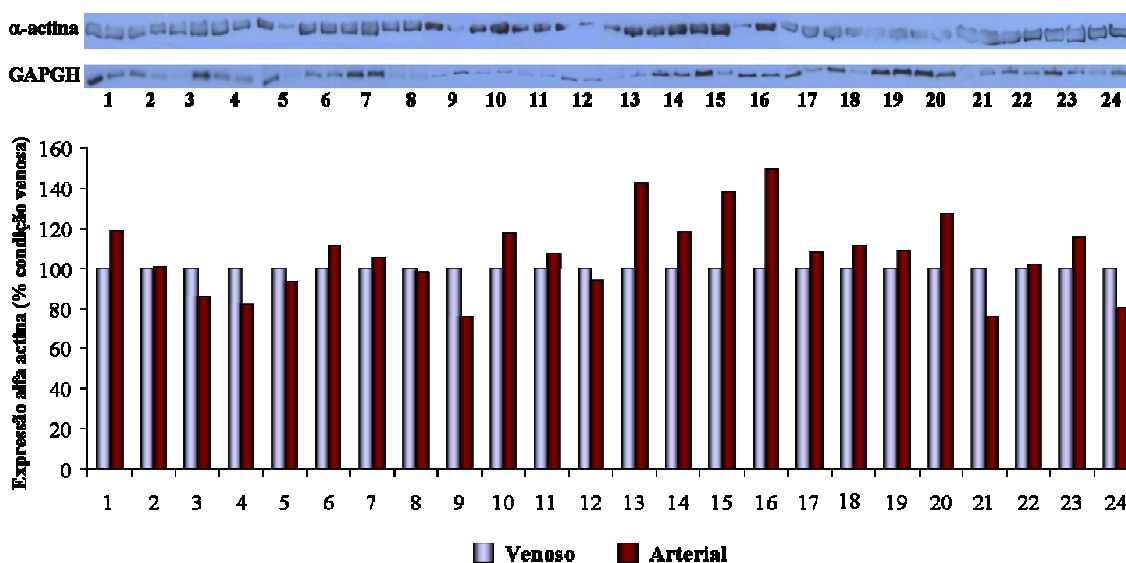


Figura 14: Análise individual de 24 pacientes. Quantificação do western blot de α -SMA normalizadas por GAPDH. Em cinza veia safena cultivada no sistema hemodinâmico venoso (fluxo: 5ml/min) e em vermelho veia safena cultivada no sistema hemodinâmico arterial (fluxo: 50ml/min e pressão: 80mmHg).

Nos resultados obtidos pela análise de gel 2-D, além da α -SMA foram identificados a presença de vários pré-peptídeos de actina aumentados na veia safena arterializada. Este cenário nos sugere que na veia safena submetida ao regime hemodinâmico arterial ocorre uma diminuição da α -SMA, e um aumento de pré-peptídeos de actina como produto de degradação da α -SMA. Desta forma, a presença destes pré-peptídeos também foi avaliada. Para isto, foi realizada uma imunoprecipitação da α -SMA a partir do extrato total de veias safenas. Na figura 15 pode-se observar que além da α -SMA (42 kDa), há a presença de proteína de 37 kDa, indicando que provavelmente o pré-peptídeo de actina identificado pela análise de gel 2-D também é reconhecido pelo anticorpo. Assim, nos resultados de imunohistoquímica a quantificação realizada deve ser resultante tanto da α -SMA como do

pré-peptídeo de actina, justificando a discordância dos dados de proteoma com os da validação individual.

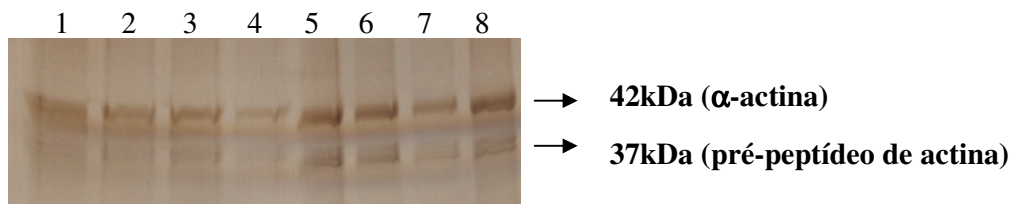


Figura 15: Gel 1D, corado com prata, da imunoprecipitação de α -SMA utilizando 500 μ g de proteína de veia safena humana cultivada no sistema *ex vivo*. Colunas 1,3,5 e 7 extrato de veia safena cultivada no regime hemodinâmico venoso (fluxo: 5ml/min) e colunas 2, 4, 6 e 8 extrato de veia safena cultivada em regime hemodinâmico arterial (fluxo: 50ml/min e pressão: 80mmHg).

Para avaliar o perfil da α -SMA durante o processo de arterialização do enxerto venoso *in vivo*, segmentos de veia jugular de rato arterializada foram analisados nos períodos de 1 dia (n=5), 3 dias (n=9), 7 dias (n=8), 14 dias (n=9), 28dias (n=8) e 90 dias (n=5) após a cirurgia. Foi realizada imuno-histoquímica para α -SMA, o que mostrou um evento muito interessante de perda de marcação para SMC nos primeiros dias de arterialização do vaso (figura 16A). A marcação para α -SMA diminui após o primeiro dia de arterialização e praticamente desaparece no terceiro dia. Após 7 e 14 dias de cirurgia as SMC começam a reaparecer de forma ainda desorganizada, sendo que após 28 dias pode-se verificar aumento ainda maior de SMC e de maneira um pouco mais organizada 90 dias após a cirurgia (figura 16B).

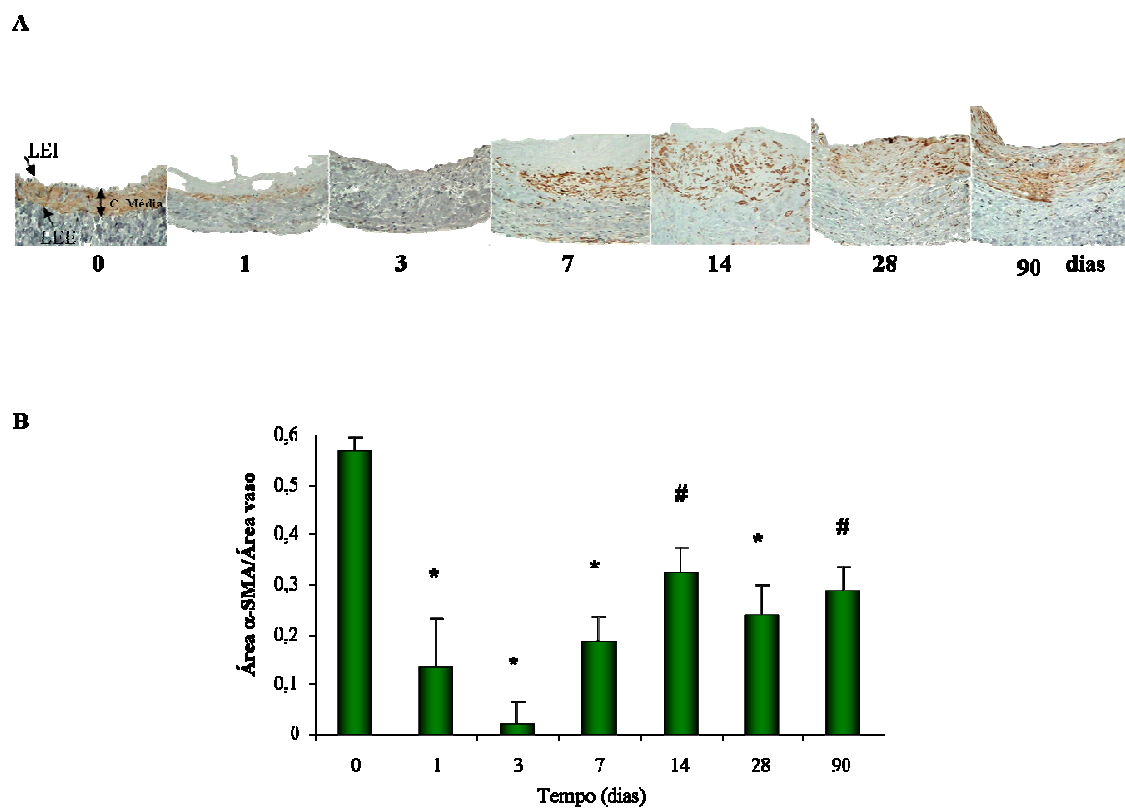


Figura 16: Imuno-histoquímica para α -SMA de segmentos de veia jugular de rato arterializada nos períodos de 1, 3, 7, 14, 28 e 90 dias (A). Aumento 40x. Quantificação da imuno-histoquímica para α -SMA. * $p < 0,001$ vs veia jugular normal e # $p < 0,05$ vs veia jugular normal.

5.2.2. Proteína rica em cisteína (CRP)

CRP1, identificada pela metodologia ICAT, apresentou menor expressão proteica na veia safena arterializada no sistema *ex vivo*. Esta proteína pertence à família de Proteínas ricas em cisteínas (CRPs) (CRP1, CRP2/SmLIM, e CRP3/MLP) e são constituídas por 2 domínios LIM. Suas funções descritas estão associadas à interação proteína-proteína em placas de adesão e a filamentos de actina. Estas proteínas não interagem diretamente com a actina, mas com proteínas associadas a

ela, como a α -actinina e a zicina, estabilizando a estrutura dos complexos de adesão (Harper e cols., 2000). Recentemente foi demonstrado que além da função de estruturação do citoesqueleto, CRP1 e CRP2 atuam no núcleo como cofator transcricional e facilitam a diferenciação muscular lisa (Chang e cols., 2003). Curiosamente, as CRPs foram identificadas em uma classe de proteínas que regulam a diferenciação celular, o crescimento, o destino e as interações com o citoesqueleto de actina (Arber e cols., 1994, 1996 e 1997; Feuerstein e cols., 1994; Henderson e cols., 2002 e Jain 1996) podendo, desta forma, participar do remodelamento vascular.

Devido à ausência de disponibilidade no laboratório de anticorpo para CRPs, a validação foi realizada por avaliação de expressão gênica. Experimentos de RT-PCR em tempo real mostraram tendência de diminuição da expressão do CRP1 (Tabela 11). A ausência de significância estatística pode ser resultante da grande variabilidade de resposta observada entre os diferentes indivíduos; ou ainda, sugestivo de que não há alteração da expressão gênica e somente modificação da expressão protéica.

Tabela 11. Análise da expressão gênica do gene CRP1 por RT-PCR em tempo real.

Amostra	Expressão Gênica	Intervalo confiança
Veia safena cultivada em regime venoso (n=31)	1,00	0,08-12,48
Veia safena cultivada em regime arterial (n=31)	0,58	0,12-24,53

Ainda que somente o CRP1 tenha sido indentificado pela metodologia proteômica, decidimos avaliar também os demais membros pertencentes à família CRP. CRP1 e CRP2 apresentaram expressão semelhante tanto nas amostras de veia safena quanto de artéria mamária. Por outro lado, o gene CRP3 aparece com baixa expressão apenas na artéria mamária, estando praticamente ausente na veia safena. Para melhor avaliar o padrão de expressão destes genes, além dos segmentos vasculares, foram também avaliadas culturas primárias de células endoteliais e musculares lisas de veia safena e artéria mamária. Interessantemente, em células endoteliais de veia safena e artéria mamária a expressão do CRP3 é praticamente indetectável, sendo observada a expressão deste gene em células musculares lisas de artéria mamária e ausência em células musculares lisas de veia safena (figura 17).

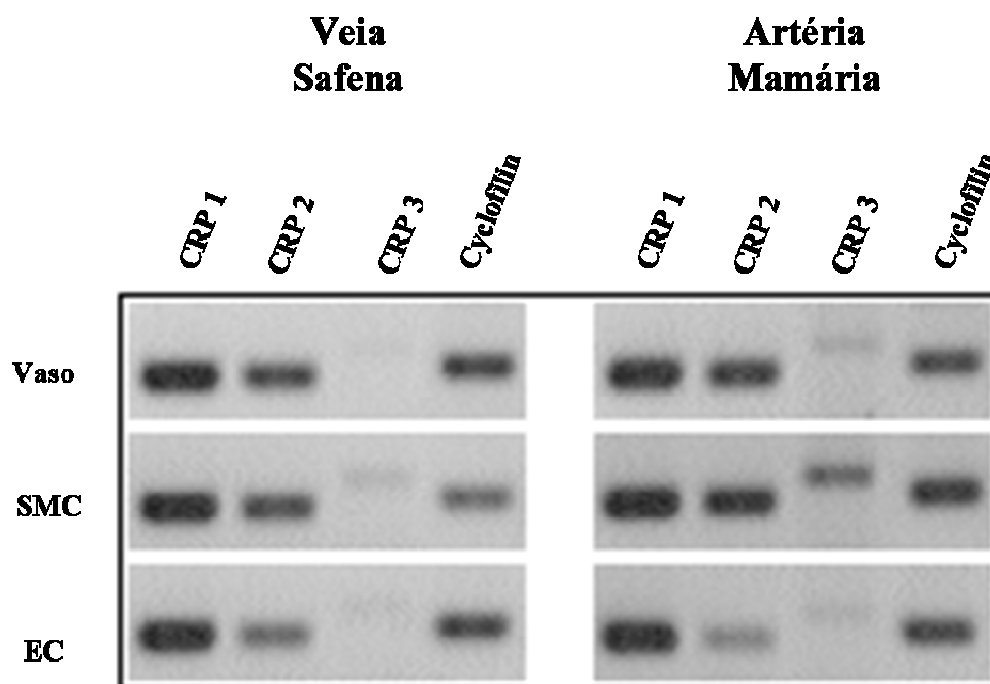


Figura 17: RT-PCR para os oligonucleotídeos iniciadores: CRP1, CRP2 e CRP3, utilizando cDNA de: veia safena humana (VS), artéria mamária humana (MA), cultura primária de células musculares lisas de veia safena humana (SVSMC), células musculares lisas de artéria mamária humana (MASMC), célula endotelial de veia safena humana (SVEC) e célula endotelial de artéria mamária humana (MAEC). Tamanho dos amplificadores – CRP1: 95 pb, CRP2: 95 pb, CRP3: 119 pb, ciclifilina: 101 pb.

Para melhor caracterizar o padrão de expressão do CRP3, as culturas primárias de células musculares lisas (SMCs) e endoteliais (ECs) de veia safena e artéria mamária de diferentes pacientes foram avaliadas através de metodologia mais quantitativa utilizando RT-PCR em tempo real. A expressão do CRP3 mostrou-se cerca de 6 vezes mais elevada em SMCs de artéria mamária em comparação com as de veia safena (em unidades arbitrárias, MASMC: 2.58 ± 1.06 - 6.27 vs. SVSMC: 0.39 ± 0.093 - 1.63 , N=8) (Figura 18). Na análise de

cultura primária de ECs não foi possível detectar a expressão do gene CRP3 nas condições realizadas neste estudo (figura 18).

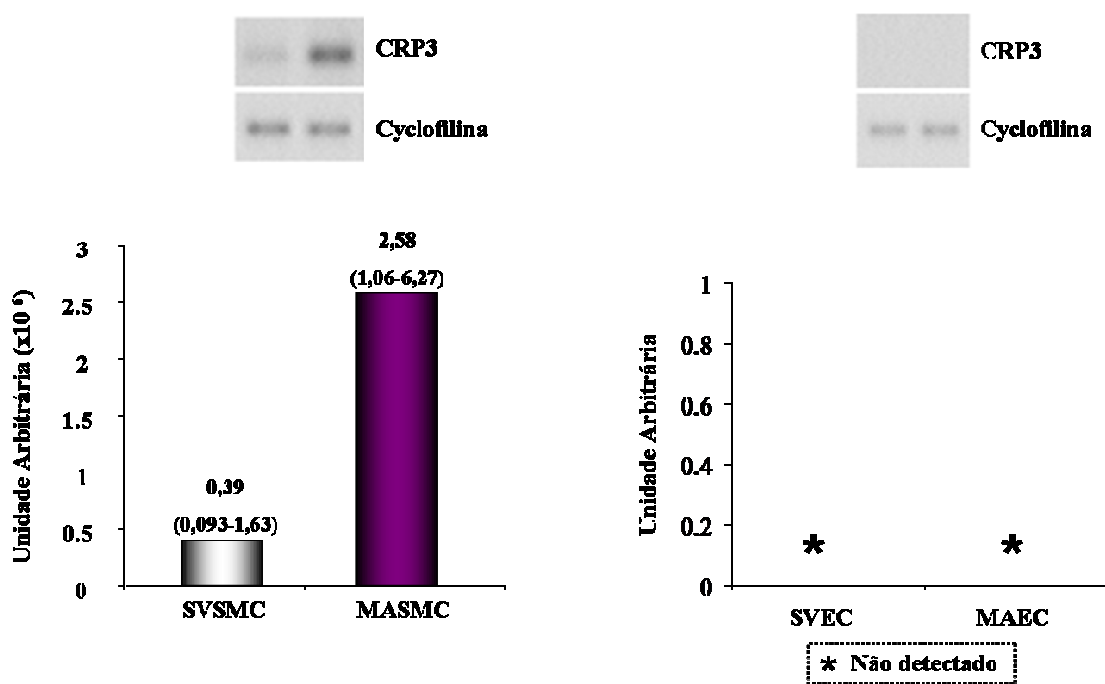


Figura 18: RT-PCR em tempo real para o gene CRP3. Avaliação da expressão em cultura primária de SMCs (esquerda) e em cultura primária de ECs (direita), de veia safena e artéria mamária de pacientes diferentes. Cada barra representa média da expressão de CRP3 de 8 experimentos. Entre parênteses está mostrado o intervalo de confiança. Os dados estão apresentados em expressão relativa à expressão do CRP3 no coração.

Considerando-se a diferença de expressão do CRP3 entre veia safena e artéria mamária, foi avaliado se a arterialização da veia safena induz a expressão de CRP3. Desta forma, segmentos de veia safena humana foram cultivados em regime hemodinâmico arterial em sistema *ex vivo* (figura 1). Curiosamente, foi observada uma indução da expressão do gene CRP3 em veia safena arterializada por 24 horas (em unidades arbitrárias SV arterializada: $8.37 \pm 4.6-17.3$ vs. SV: não detectado, N=19) (figura 19).

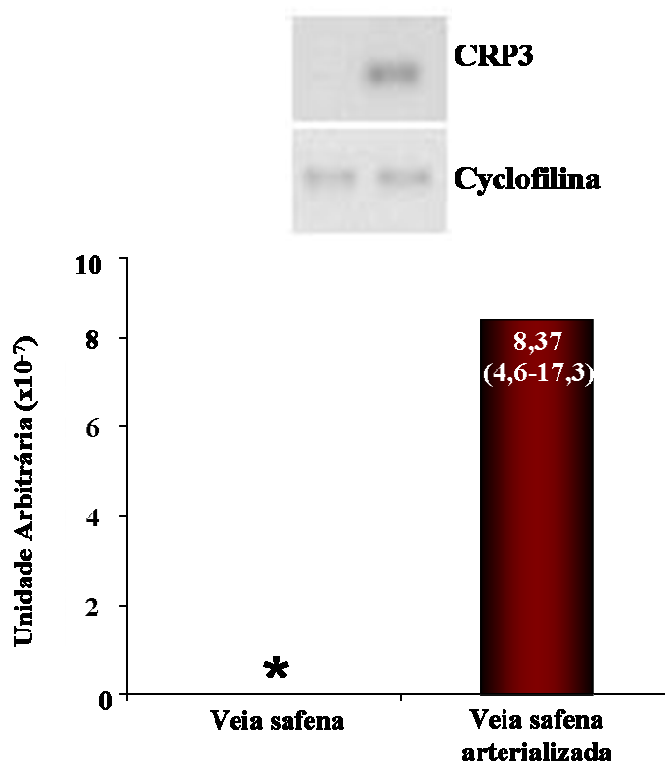


Figura 19: RT-PCR em tempo real para o gene CRP3. Avaliação da expressão em veia safena humana cultivada no sistema *ex vivo* por 24 horas sob regime hemodinâmico arterial (fluxo: 50mL/min e pressão: 80mmHg). Cada barra representa média da expressão de CRP3 de 19 experimentos. Entre parênteses está mostrado o intervalo de confiança. Os dados estão apresentados em expressão relativa à expressão do CRP3 no coração.

Sabe-se que durante o processo de arterialização da veia safena há um aumento de forças físicas de “shear stress” e estiramento. Para avaliar quais destes estímulos mecânicos são responsáveis pela regulação do gene CRP3, estudamos as duas forças individualmente em sistemas *in vitro*. Culturas primárias de células endoteliais de veia safena (SVEC) foram submetidas *in vitro* ao estímulo de “shear stress” de 15 dinas/cm², por um período de 24 horas. A análise de RT-PCR em tempo

real mostrou que o estímulo de “shear stress” não foi capaz de induzir a expressão de CRP3 em ECs de veia safena e de artéria mamária (figura 20).

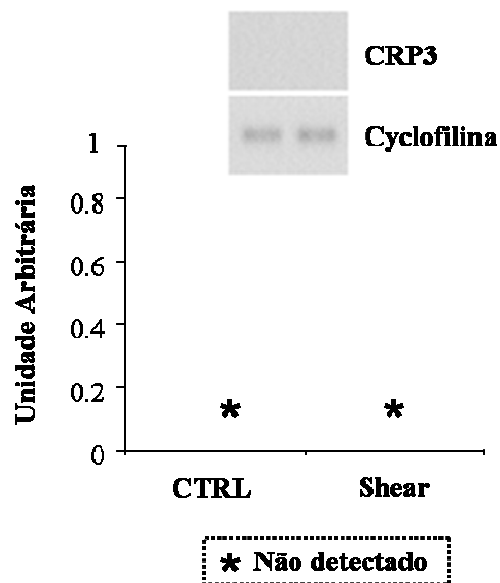


Figura 20: RT-PCR em tempo real para o gene CRP3. Avaliação da expressão em cultura primária de ECs de veia safena submetidas ao estímulo de “shear stress” de 15dinas /cm², por 24 horas utilizando o sistema de cone plate. O gráfico representa a média da expressão de CRP3 de 7 experimentos. Os dados estão apresentados em expressão relativa à expressão do CRP3 no coração.

Por outro lado, o estiramento de 10% por 24horas induziu a expressão de CRP3 na SMCs de veia safena (SVSMC estiradas: 0.96 ± 0.2 vs SVSMC: 0.5 ± 0.05 , N=9) (figura 21). Estes dados sugerem que o aumento da CRP3 parece ser primariamente dependente do estímulo de deformação (“stretch”) e não do aumento de “shear stress” associado à arterialização.

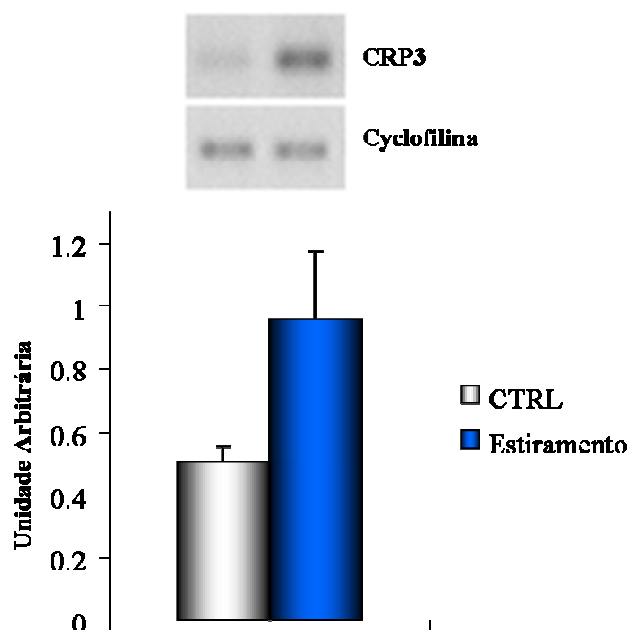


Figura 21: Quantificação do RT-PCR para o gene CRP3. A barra branca representa células musculares lisas de veia safena na condição estática e a azul, células musculares lisas de veia safena submetidas ao “stretch”. Cada barra representa média da expressão de CRP3 de 9 experimentos.

A avaliação temporal da expressão da CRP3 foi realizada em modelo animal de arterialização de segmento venoso. Neste modelo, a veia jugular de rato é conectada à artéria carótida. Para avaliar a regulação da expressão gênica do CRP3 em até 90 dias de arterialização do enxerto venoso *in vivo*, segmentos de veias jugulares de rato arterializadas foram analisados nos períodos de 1 dia (n=6), 3 dias (n=11), 7 dias (n=6), 14 dias (n=7), 28 dias (n=4) e 90 dias (n=3) após a cirurgia. Interessantemente foi observado um aumento na expressão da CRP3 com 3 dias de arterialização. Após 7 dias de cirurgia ainda a expressão da CRP3 diminuiu progressivamente, sendo praticamente indetectável com 90 dias de cirurgia (figura 22).

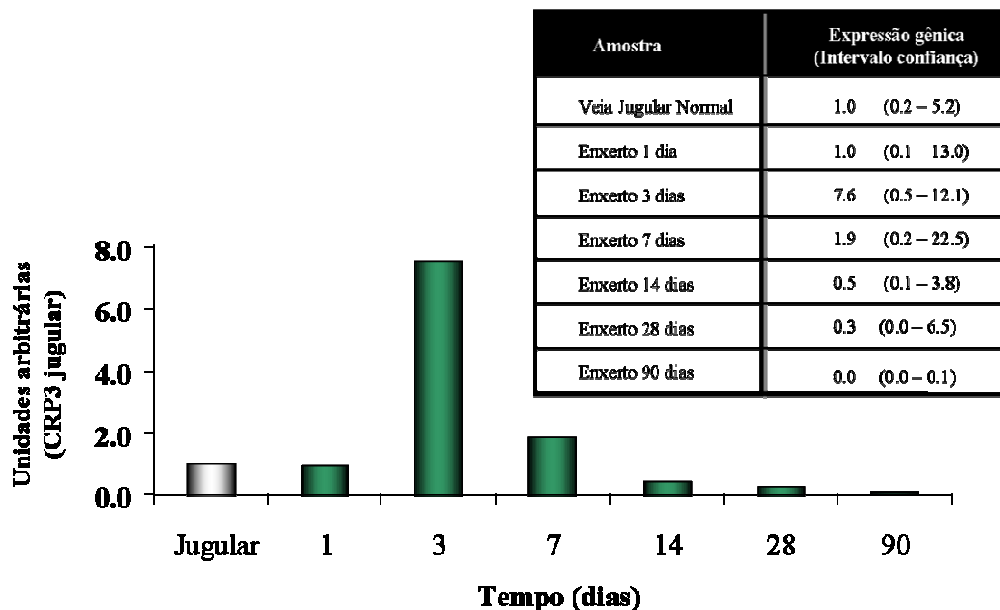
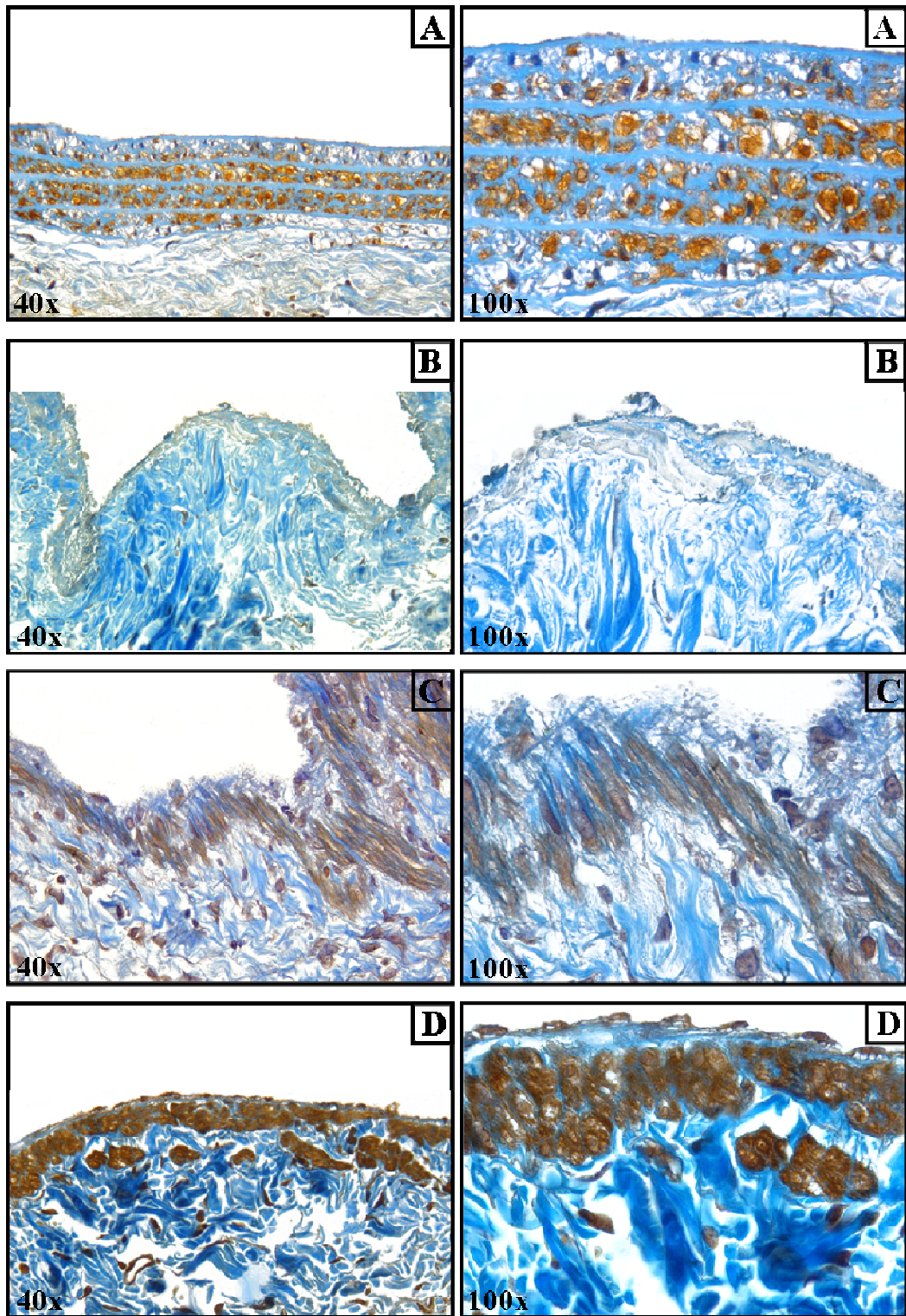


Figura 22: RT-PCR em tempo real para o gene CRP3. Avaliação da expressão em segmentos de veia jugular de rato arterializada nos períodos de 1, 3, 7, 14, 28 e 90 dias.

Uma análise qualitativa da imuno-histoquímica para CRP3 mostrou um padrão bastante interessante da produção da proteína. Enquanto que a artéria carótida apresenta expressão de CRP3, nenhuma marcação positiva foi observada na veia jugular. Após arterialização, observa-se aumento de expressão de CRP3 (1, 3, 7 e 14 dias após a cirurgia) com presença predominante na camada média dos vasos, um padrão bastante semelhante ao encontrado na artéria carótida (figura 22). Nos períodos mais tardios (28 e 90 dias após cirurgia) esta marcação está diminuída e ainda com distribuição concentrada na camada média vascular (figura 23).



(Figura 23. Continua na próxima página)

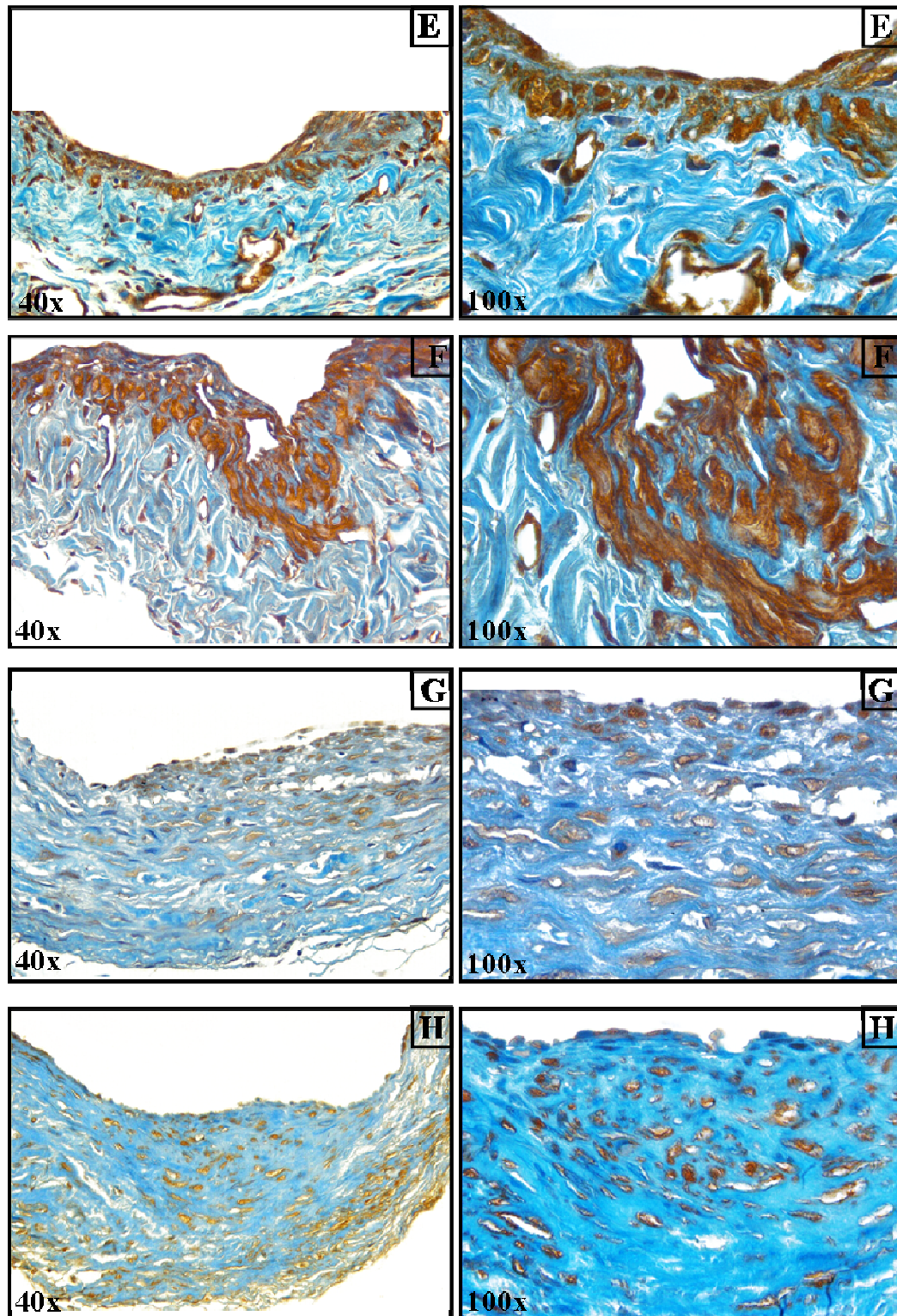


Figura 23: Fotos representativas de imuno-histoquímica para CRP3 corado em marrom, em veia jugular de rato arterializada. **A)** Artéria Carótida, **B)** Veia Jugular Normal, **C)** 1 dia, **D)** 3 dias, **E)** 7 dias, **F)** 14 dias, **G)** 28 dias e **H)** 90 dias após arterialização.

Da mesma forma que observado nas marcações por imuno-histoquímica, a análise quantitativa de CRP3 mostrou aumento da expressão nos períodos iniciais da arterialização da veia jugular de rato com aumento de aproximadamente 3,7 vezes após 3 dias de cirurgia (figura 24).

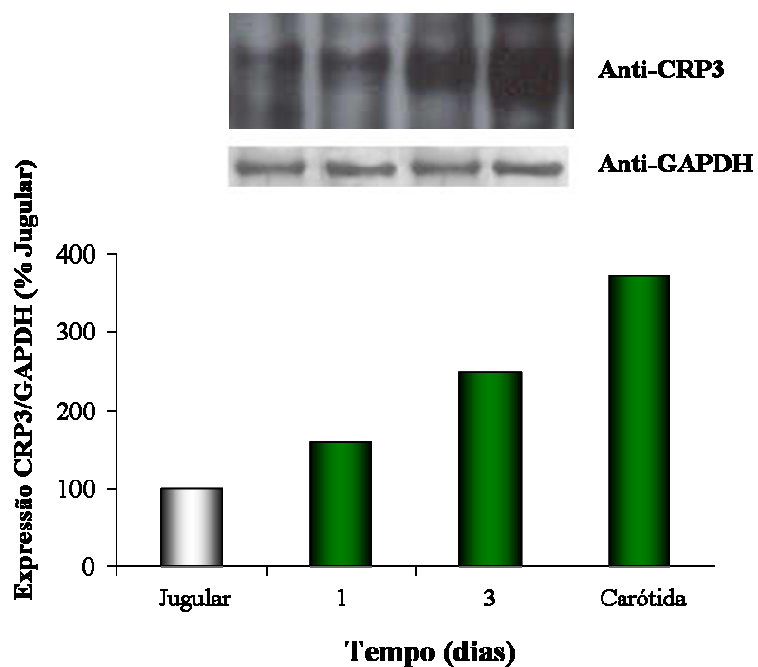


Figura 24: Immunoblotting para CRP3. Avaliação da expressão em segmentos de veia jugular de rato arterializada nos períodos de 1 e 3 dias.

Discussão

6. Discussão

A interposição de segmentos de veia safena na circulação coronariana é um procedimento muito utilizado para reestabelecer o fluxo do miocárdio. No entanto, quando a veia é colocada em uma circulação arterial, de alta pressão e fluxo pulsátil, torna-se necessário a sua adaptação ao novo ambiente, um processo denominado “arterialização” ou “adaptação” do enxerto venoso (Bush e cols., 1986 e Henderson e cols., 1986). Esta adaptação resulta em uma reorganização estrutural e funcional na parede da veia safena em resposta as novas condições biomecânicas locais (Garrett e cols., 1996, Kwei e cols., 2004, Gibbons e cols., 1994, Mavromatis e cols., 2000, Westerband e cols., 2001 e Abeles e cols., 2006).

Embora as mudanças morfológicas do processo de arterialização/adaptação do enxerto venoso estejam bem caracterizadas, os mecanismos moleculares do remodelamento vascular permanecem desconhecidos. Este remodelamento vascular envolve alterações na proliferação, morte e migração celular, e na degradação e/ou produção de componentes da matriz extracelular (Gibbons e cols., 1994). O conhecimento dos aspectos moleculares do processo de arterialização do enxerto venoso poderá fornecer abordagens terapêuticas para aumentar a patência destes enxertos. Por este motivo, neste trabalho foram utilizados dois tipos de análise proteômica que permitem, de forma exploratória, identificar as proteínas que estão sendo modificadas no processo de adaptação do enxerto venoso ao regime hemodinâmico arterial. A utilização do 2-D e do ICAT mostrou-se eficiente em identificar com sucesso as proteínas diferentemente expressas no processo de arterialização e, neste trabalho, foram selecionadas 2 proteínas para validação e caracterização funcional: a α -SMA e o CRP3.

6.1. α -SMA

As actinas são proteínas eucarióticas presentes em uma variedade de células e estão envolvidas em diversas funções celulares incluindo contração muscular, mobilidade celular, adesão celular, divisão celular e manutenção da forma da célula (Vandekerckhove e cols., 1978 e McHugh e cols., 1991). Geralmente é aceito que quatro isoformas de actina são tecido-específico: α actina esquelética (α -SKA), α actina cardíaca (α -CAA), α -actina de músculo liso (α -SMA), e γ -actina músculo liso (γ -SMA), respectivamente predominantes em músculo esquelético adulto, estriado cardíaco, músculo liso vascular e músculo liso entérico (Chaponnier e col., 2004). Enquanto que em adultos cada isoforma de actina é predominantemente vista em tecidos musculares (esquelético, cardíaco, vascular, e entérico), um padrão complexo de expressão é encontrado durante o desenvolvimento. Durante o desenvolvimento do músculo esquelético, α -SMA é a primeira isoforma muscular a aparecer no miotomo (Sawtell e cols, 1989). Quando a expressão de α -SMA é diminuída, a expressão de α -CAA é aumentada. Ao nascimento, a expressão de α -SKA é aumentada e permanece como isoforma principal em músculo esquelético adulto. Já durante o desenvolvimento cardíaco α -SMA é expressa transientemente durante as fases iniciais da miocardiogênese, sendo seguida da co-expressão de α -CAA e α -SKA. No coração adulto a α -CAA é a isoforma predominantemente expressa (Ruzicka e cols., 1988).

Em diversas patologias observa-se um processo de de-diferenciação celular onde proteínas de tecido adulto maduro são diminuídas enquanto que isoformas das fases iniciais do desenvolvimento passam a ser ressintetizadas. Isto pode ser

observado por exemplo, em tumores de musculatura esquelética como rabdomiossarcoma que deixam de expressar α -SKA e passam a expressar α -CAA e α -SMA, tumores de músculo liso como leiomiomas que expressam γ -SMA e doenças cardiovasculares como a hipertrofia cardíaca que expressa α -SMA e as SMCs presentes em lesões ateroscleróticas expressam α -CAA. O padrão das isoformas de actina permite descobrir o grau de de-diferenciação celular e representa um suplemento importante nas investigações morfológicas (Chaponnier e col., 2004). Pode-se observar também um fenômeno em que células indiferenciadas residentes passam a adquirir características diferenciadas em situações semelhantes. Um exemplo interessante é o miofibroblasto, uma célula mesenquimal que compartilha características de fibroblastos e células musculares lisas (SMCs). Em condição patológica, o miofibroblasto pode expressar marcadores de SMCs como cadeia pesada de SM-miosina (SM-MHC), desmina, SM22 e tropomiosina (Lazard e cols., 1993). Porém, não se observa “smoothelin” e caldesmon de alto peso molecular, que são marcadores exclusivos de SMCs (van der Loop e cols., 1996).

As isoformas de actina podem ser moduladas no processo de replicação e migração de SMC durante o desenvolvimento e evolução das placas ateromatosas e de restenose. Em SMCs com fenótipo contrátil a α -SMA é a isoforma que prevalece e encontra-se diminuída nas SMCs com fenótipo secretor (Ross e cols., 1973 e Schwartz e cols., 1997). Bea e cols., 2000 relataram que a isoforma de actina α -CAA pode ser encontrada em SMCs de lesões ateroscleróticas, mas não foi detectada em SMCs da artéria aorta ou coronária de adultos saudáveis. A distribuição de α -CAA freqüentemente aparece paralela as citoqueratinas 8 e 18, e proteínas de filamento intermediário de SMCs de-diferenciadas (Osborn e cols., 1987, Jahn e cols., 1989,

Jahn e cols., 1993). A indução de α -CAA em SMCs de restenoses e de lesões ateroscleróticas pode ser visto como uma resposta ao dano agudo e crônico à parede do vaso e recapitula o padrão de expressão das fases iniciais do desenvolvimento, embora a função de α -CAA nesta fase ainda é desconhecida (Chaponnier e col., 2004).

Ainda que não tenha sido possível validar a modulação da α -SMA em veia safena humana, devido à grande variabilidade encontrada entre os indivíduos, acreditamos que não se pode descartar a participação desta proteína no processo de arterialização de enxertos venosos. De maneira interessante, os dados obtidos no modelo de arterialização em rato, onde as condições são melhores controladas, mostramos uma diminuição de células marcadas para α -SMA durante os primeiros dias de arterialização da veia jugular de rato (1 e 3 dias após a cirurgia). Este dado pode sugerir uma perda de densidade celular, ou ainda, perda do fenótipo contrátil das células musculares passando a ter um fenótipo secretor quando submetidas ao regime hemodinâmico arterial.

Em diversos modelos de arterialização descritos na literatura, observa-se uma elevada taxa de apoptose nos períodos iniciais de arterialização, ocasionando perda de SMCs da camada média vascular (Rodriguez e cols., 2000, Hoch e cols., 1999, Moore e cols., 2001; Tomas e cols., 2003, O'Brien e cols. 1998, Mayr e cols., 2000, Kockx e cols., 1994, Liu e cols., 2000). O motivo da morte celular observada no primeiro dia de arterialização seguida da perda de expressão da α -SMA ainda é desconhecido, no entanto duas hipóteses são pertinentes: (1) uma significativa degeneração e morte das SMCs na camada média ou (2) uma modulação da expressão deste marcador, levando a diminuição de sua expressão e aumento de

outro marcador devido ao estresse. Chaponnier & Gabbiani (2004) mostraram que durante a aterogênese SMCs modulam a dediferenciação de células residentes ou circulantes, sintetizando β -actina citoplasmática (β -CYA) ou α -actina cardíaca (α -CAA). Já Bea e cols., 2000 relataram que a isoforma de actina α -CAA pode ser encontrada em SMCs de lesões ateroscleróticas, mas não em SMCs de artéria aorta ou coronária de adultos saudáveis.

No 7º dia de arterialização da veia jugular de rato a α -SMA começa a reaparecer de forma difusa, aumenta no 14º dia, apresentando-se de forma mais organizada após o 28º dia. Tem-se demonstrado que SMCs de lesões ateroscleróticas podem se diferenciar a partir de células de medula óssea (Han e cols., 2001, Saiura e cols., 2001, Shimizu e cols., 2001, Sata e cols., 2002 e Simper e cols., 2002) ou ainda a partir de progenitores residentes na adventícia que se trans-diferenciam em SMC (Li e cols. 2000 e Shi e cols., 1997). O aumento de marcação de α -SMA pode ser resultante da migração e diferenciação de células indiferenciadas residentes ou da proliferação de células musculares lisas vasculares.

Assim, a regulação da α -SMA pode representar um importante marcador biológico para o processo de arterialização de segmento venoso. A diminuição da α -SMA nos estágios iniciais e o aumento gradativo mais tardiamente parecem ocorrer devido às novas forças hemodinâmicas imposta a parede vascular venosa quando esta é interposta em leito arterial. Ainda que não tenha sido possível observar sua modulação em amostra de veia safena humana, não se pode descartar a participação da α -SMA no processo de arterialização.

6.2. Proteína Rica em Cisteínas (CRP)

Três membros da família CRP (CRP1, CRP2/SmLIM, e CRP3/MLP) foram caracterizados em vertebrados (Liebhaber e cols., 1990; Weiskirchen e cols., 1995; Arber e cols., 1994). As CRPs são proteínas altamente conservadas entre si e evolutivamente, caracterizadas pela presença de 2 seqüências em tandem de ligação de zinco (domínios LIM) seguidos de seqüências repetidas e conservadas de glicina (Weiskirchen & Günther, 2003, Louis e cols., 1997, Weiskirchen e cols., 1995, Liebhaber e cols., 1990, Sadler e cols., 1992, Arber e cols., 1994, Crawford e cols., 1994). Essa estrutura possibilita a interação proteína-proteína podendo estar envolvida nos processos de remodelamento do citoesqueleto, regulação transcricional, proliferação e diferenciação celular na miogênese e com domínios funcionais de quinase. (Kadmas & Beckerle, 2004).

Louis e cols., 1997 compararam os três membros da família CRP e revelaram uma conservação funcional, porém padrões divergentes de expressão gênica, ou seja, os três membros apresentam ter funções comparáveis em tipos de células diferentes. Em particular, um membro da família CRP (CRP3) tem se mostrado ser um regulador essencial do desenvolvimento do músculo esquelético e cardíaco. Todos os três membros da família CRP, quando expressos em fibroblastos aderentes, associam-se especificamente com o citoesqueleto de actina. Além disso, todos os três são capazes de interagir com as proteínas do citoesqueleto: α -actinina e zicina. Estas observações sugerem que a família CRP pode apresentar sobreposição de funções celulares.

A estrutura do N-terminal dos domínios LIM das CRPs são bastante semelhantes, já a estrutura do C-terminal dos domínios LIM apresentam uma

plasticidade conformacional que permitem um seletivo recrutamento de fatores e, assim, podem determinar a especificidade do subtipo muscular (Konrat et al., 1998). Desta forma, todos as três CRPs possuem afinidade de ligação similares com α -actinina e zicina através do seu domínio LIM N-terminal. Além disto, tanto os domínios LIM N- e C-terminal da CRP2 e CRP3 podem também interagir especificamente com fatores adicionais distintos (Louis et al., 1997). Flick e Konieczny (2000), demonstraram um modelo de interação da CRP3 com proteínas adicionais do citoesqueleto onde os domínios LIM N- e C-terminal da CRP3 se ligam a MyoD (Kong et al., 1997) e β -espectrina, respectivamente. Do mesmo modo, que os domínios LIM N- e C-terminal da CRP2 podem interagir especificamente com CRP2BP e PIAS1, respectivamente (Weiskirchen e Gressner, 2000; Weiskirchen et al., 2001). Essa sutil diferença na capacidade das CRPs para recrutar distintos fatores reguladores pode ser a base para distinguir as CRPs entre linhagens musculares e conferir especificidade ao subtipo muscular (Chang e cols., 2003).

Diferenças entre os três membros das CRPs são evidentes nos padrões de expressão de sua proteína. Utilizando embriões de galinha, a expressão de CRP1 foi detectada em uma variedade de organismos ricos em músculo liso, como artérias, estômago, moela, e intestino (Henderson, e cols., 1999), a expressão de CRP2 está principalmente em SMCs vasculares, esta restrita a artérias e fibroblastos, e tem sua expressão diminuída em células de-diferenciadas e em células em proliferação devido a um dano ou tensão, como acontece na aterosclerose (Jain e cols., 1996) e a expressão de CRP3/MLP é dominante em células de músculos estriados do coração e músculo esquelético (Arber e cols., 1997).

CRP3/MLP é um regulador positivo conservado da diferenciação miogênica associada com a actina do citoesqueleto. (Arber e cols., 1994; Arber and Caroni, 1996). No desenvolvimento do músculo esquelético, a expressão coincide com o aparecimento do fenótipo diferenciado, e CRP3 é acumulado durante a formação da fibra muscular. A expressão da CRP3 é diminuída em músculo esquelético adulto, onde é re-induzida por denervação. Em contraste, no coração, CRP3 é expresso em níveis elevados em miócitos atriais e ventriculares durante o desenvolvimento e no adulto (Arber e cols., 1997). Ratos CRP3 deficientes apresentam alterações significativas no citoesqueleto de actina e desenvolvem insuficiência cardíaca logo após o nascimento (Arber e cols., 1997). Além disso, foi demonstrado que uma mutação no gene CRP3 humano está associado com a cardiopatia dilatada (Geier e cols., 2003). Em conjunto, CRP3 parece desempenhar um papel crítico na remodelação do músculo estriado. Recentemente, foi demonstrado que a expressão de CRP3 é aumentada em resposta a lesão vascular por angioplastia de balão em modelos de rato e camundongo. A expressão da CRP3 estava 10 vezes maior na artéria carótida de rato, após 7 dias da injúria por balão, mostrando que CRP3 é significativamente modulada em resposta à lesão vascular (Wang e cols., 2006).

Interessantemente, nossos resultados mostram que o CRP3 é um gene com maior expressão em artéria mamária e com expressão baixa em veia safena. Quando a veia safena é cultivada em regime arterial, observa-se uma indução da expressão do CRP3 na veia safena arterializada por 24 horas. Além disso, demonstramos que o aumento da expressão do CRP3 é devido ao aumento do estiramento (“stretch”) das células musculares lisas e não do aumento do “shear stress” associado à arterialização do enxerto venoso. No modelo de arterialização *in*

vivo foi possível avaliar a regulação temporal da expressão do gene CRP3, estando aumentada nos períodos iniciais (1 e 3 dias) e localizada predominantemente na camada média vascular. Nos períodos tardios observamos uma expressão diminuída e desorganizada presente tanto na camada média como na adventícia dos enxertos venosos.

Desta forma a CRP3 representa um importante marcador do processo de arterialização do enxerto venoso. O aumento da CRP3 nos períodos iniciais demonstra a necessidade da célula muscular lisa reorganizar o citoesqueleto para que possa suportar os estímulos hemodinâmicos impostos no leito arterial. Sendo assim, a CRP3 parece desempenhar um papel de arcabouço para proteínas do citoesqueleto, permitindo que a célula se adapte ao estresse mecânico.

6.3. α -SMA e CRP3 atuando conjuntamente no processo de arterialização

Tanto a α -SMA como o CRP3 são proteínas que compõem o citoesqueleto celular. O fato de estas duas proteínas estarem sendo moduladas durante o processo de arterialização sugere uma ação conjunta da α -SMA e do CRP3 na reorganização estrutural celular para suportar a nova condição hemodinâmica imposta ao segmento venoso.

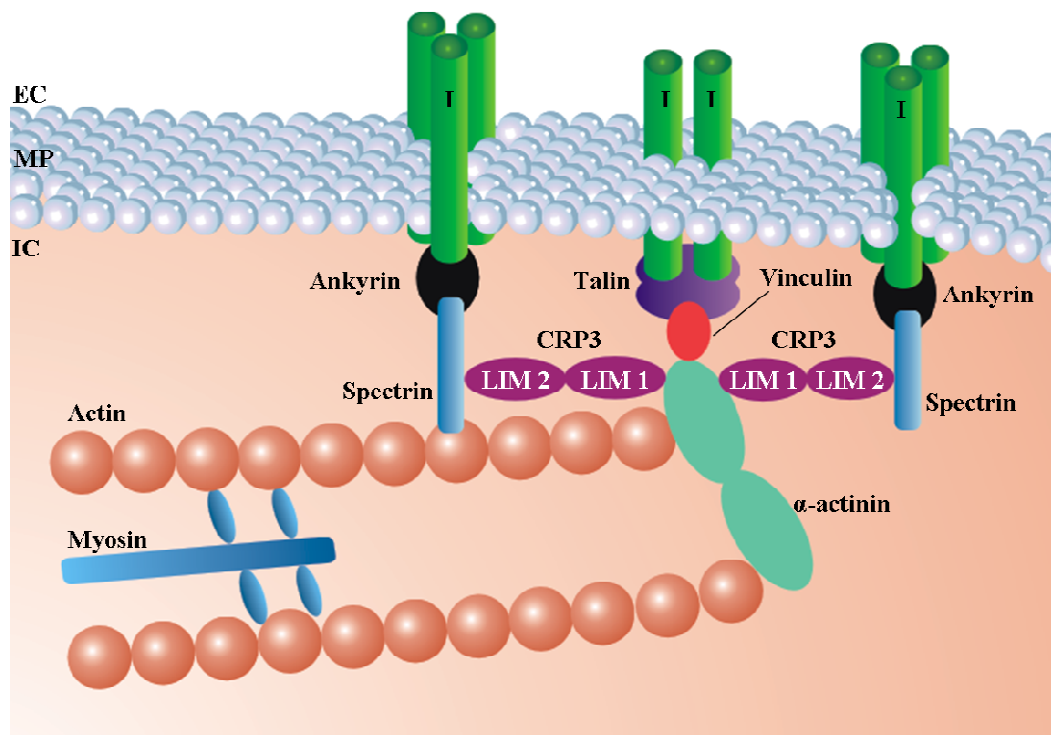


Figura 25: Modelo esquemático das interações da CRP3 e da organização do citoesqueleto de actina (Flick & Konieczny 2000).

Neste contexto, dois cenários devem ser contemplados na participação conjunta da α -SMA e da CRP3 durante o remodelamento do enxerto venoso. Na figura 25 pode-se observar a CRP3 ligando-se indiretamente com a α -actina através da interação do seu domínio LIM1 com a α -actinina e LIM2 com a β -espectrina. Isto sugere que a CRP3 funciona como um arcabouço do citoesqueleto de actina, ajudando na estabilização da citoarquitetura celular, como no modelo de organização de sarcolemas proposto por Flick & Konieczny (2000). Esta disposição do citoesqueleto celular permite que a célula suporte a forças físicas como o estiramento (“stretch”) exercido nas células musculares lisas, permitindo a sua adaptação e a reorganização das proteínas de citoesqueleto, como mostra a figura 26. Na ausência da CRP3 a integridade estrutural celular é perdida e quando as células são expostas a

estímulos físicos, a reorganização da citoarquitetura é prejudicada, o que impossibilita as células suportarem os novos estímulos (figura 26). Assim, a veia, quando exposta ao regime arterial, aumenta a expressão de CRP3 na tentativa de fortalecer as conexões do citoesqueleto e preparar as células para suportar a nova condição hemodinâmica.

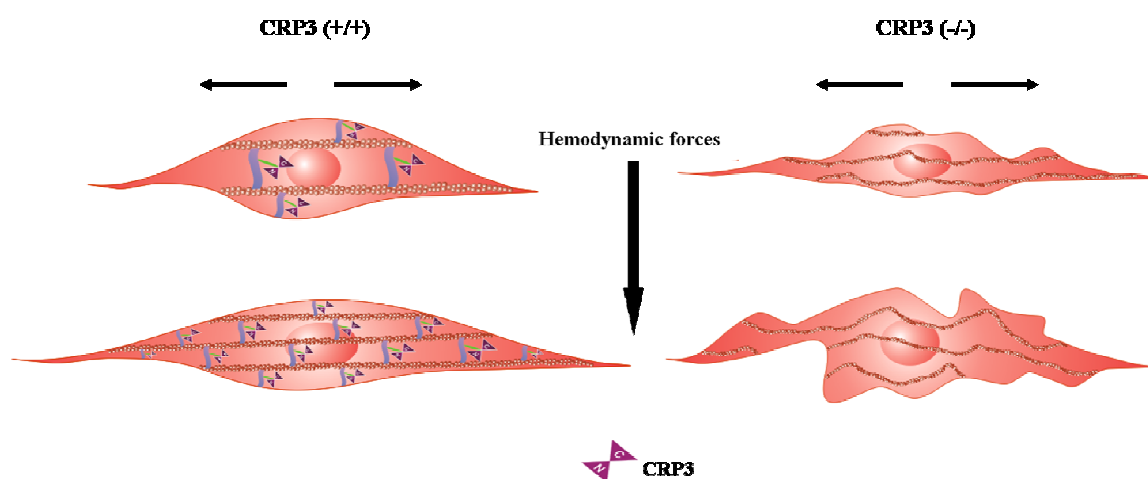


Figura 26: Modelo da citoarquitetura das SMCs na presença e ausência da CRP3 frente a estímulos mecânicos.

Um outro cenário seria a participação da α -SMA e do CRP3 no processo de diferenciação celular através da regulação da transcrição gênica na miogênese. Recentemente, Chang e cols., 2003 demonstraram que além da função de estruturação do citoesqueleto, CRP1 e CRP2 atuam no núcleo como cofator transcrricional e facilitam a diferenciação muscular lisa (figura 27). CRP1 e CRP2 podem funcionar como moléculas coadaptoras transcripcionais envolvidas na montagem de complexos multiprotéicos com os fatores nucleares SRF, fatores GATA (GATA6) e enzimas que remodelam a cromatina. Estes complexos se ligam ao DNA e coletivamente conferem uma forte ativação de promotores específicos

para diferenciação de SMC cardiovasculares. Da mesma forma que CRP1 e CRP2, a presença de CRP3 também tem sido demonstrada no núcleo (Arber e Caroni 1996; Jain et al., 1996). Kong et al., 1997, demonstraram a ação do CRP3 em potencializar a ligação do fator MyoD ao DNA, em seguida recrutar NKx2-5 e GATA4 pela SRF, e com isto reforçar a afinidade de ligação do SRF ao DNA. Este mecanismo induz a formação altamente ordenada de complexos que se ligam ao promotor da α -CAA, permitindo a diferenciação de células musculares cardíacas (Sepulveda et al., 2002).

Recentemente, Rando e cols., (2000) mostraram que existe actina localizada na matriz nuclear. Hipoteticamente, CRPs podem estar envolvidas no remodelamento da cromatina por estar fisicamente ligada a uma base nuclear de matriz de actina (Figura 27). Isoformas de actinas nucleares não musculares e/ou zicina podem servir como moléculas que recrutam para a matriz de actina, proteínas LIM- agregadas a complexos nucleares multiproteicos, aumentando assim a concentração local de fatores de transcrição. Pequenos oligômeros de actina podem levar à colocação de complexos nucleares multiproteicos ao longo de um filamento de actina curto. Estes complexos nucleares baseados na actina, podem constituir uma plataforma que poderiam auxiliar a cromatina dobrar ou torcer otimizando a atividade transcricional (Chang e cols., 2003).

Assim, o aumento na expressão de CRP3 e a diminuição da α -SMA na veia arterializada por 3 dias sugere que CRP3 possa estar mediando a transcrição de genes específicos de SMCs (figura 27). Sabe-se que durante os primeiros dias de arterialização de segmentos venosos, há uma grande taxa de apoptose (Rodriguez e cols., 2000 e Yamamura e cols., 1994) e concomitante presença de células indiferenciadas tentando repovoar a camada média vascular. Neste processo, o

aumento de CRP3 estaria atuando na transcrição de genes de SMC e contribuindo para a diferenciação de células indiferenciadas em SMCs especializadas.

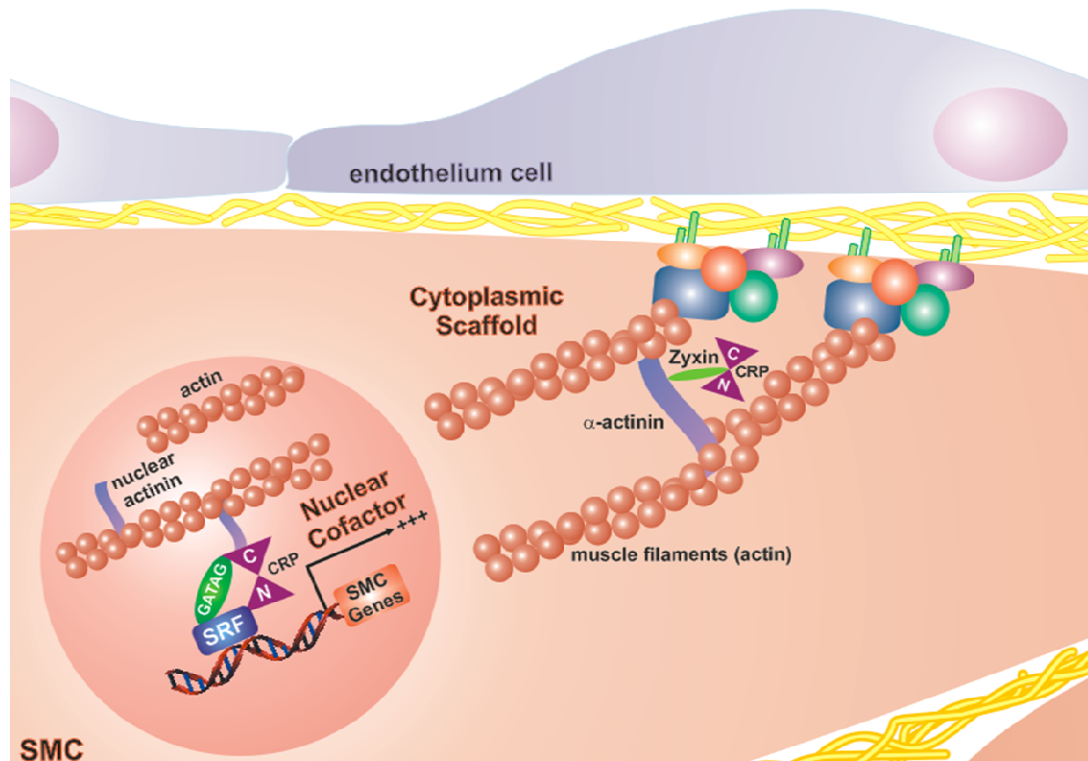


Figura 27: Representação esquemática da dupla função das CRPs. As proteínas de domínio LIM funcionando como “Scaffold” do citoesqueleto de actina e como cofator nuclear podendo se associar com a matriz de actina nuclear para ativar a transcrição de genes específicos de SMCs.

Seria razoável imaginar que durante a adaptação da veia à condição hemodinâmica arterial haveria a indução de marcadores específicos de fenótipo arterial. Durante o desenvolvimento embrionário os vasos primários diferenciam-se em veias e artérias e acredita-se que expressão de seus marcadores específicos ocorre primariamente pela própria genética celular e secundariamente pelas forças hemodinâmicas. No sistema vascular adulto, células endoteliais arteriais e venosas

apresentam diferentes marcadores fenotípicos, assim como diferenças na sua capacidade de produzir substâncias vasoativas para se adaptar às alterações hemodinâmicas, às respostas hemostáticas ou a respostas imunes aos estímulos inflamatórios. Acredita-se que as diferenças no fenótipo estão relacionadas à origem das células endoteliais dos diferentes compartimentos (Noble e cols., 2003), existindo predeterminantes genéticos do endotélio arterial e venoso e distinção molecular entre estes dois leitos vasculares (Torres-Vazquez e cols., 2003).

Marcadores específicos de artérias e veias foram descobertos e descritos como “etiquetas” das EC nas fases precoces do desenvolvimento, antes da estruturação de uma parede vascular. Para a vasculatura, estes incluem VEGF, VEGF-R2, VEGF-R3, Tie-1, Tie-2, Angiopietins - 1 e -2, ephrin-B2, Ef-B4, SCL, fli-1, Ets-1 (Durbin e cols. 1998, Fouquet e cols. 1997, Liang e cols. 1998, Liao e cols. 1998, Lyons e cols. 1998, Thompson e cols. 1998). A maior parte destes genes tem padrões de expressão temporal e espacial. Por exemplo, os marcadores VEGFR-2 (flk1), VEGFR3 (flt4), Tie-1, Tie-2, fli-1, e Ets-1 são todos especificamente expressos em células endoteliais de mamíferos e a sua expressão aparece e desaparece em diferentes fases do desenvolvimento. Para o sistema arterial, ephrinB2, neuropilin 1 (NRP1), e membros da sinalização de Notch, incluindo Notch 3, Dll4 foram descritos em zebrafish, embriões de galinha e camundongo (Herzog e cols., 2001; Lawson e cols., 2001; Moyon et e cols., 2001a; Moyon e cols., 2001b; Villa e cols., 2001; Wang e cols., 1998; Zhong e cols., 2001). Outras moléculas são expressas especificamente no sistema venoso, mais notavelmente EphB4, o receptor para a ephrinB2 arterial (Gerety e cols., 1999). O receptor neuropilin 2 (NRP2) é expresso em veias e, nas fases mais tardias do desenvolvimento torna-se restrita aos

vasos linfáticos em embriões de galinha e camundongo (Herzog e cols., 2001; Yuan e cols., 2002). Em embriões de galinha, o receptor Tie2 é expresso em níveis mais elevados em veias em comparação com artérias (Moyon e cols., 2001). Baseado nestes padrões de expressão específicos e de estudos com mutantes de zebrafish e camundongo, tem-se que a formação do sistema vascular assim como a diferenciação arterial-venosa durante a embriogênese é o resultado de uma complexa interação entre fatores genéticos e epigenéticos predeterminados, incluindo fatores hemodinâmicos (Wang e cols., 1998 e Jones e cols., 2006).

Assim, os marcadores moleculares e as forças hemodinâmicas parecem ser fatores determinantes para que um vaso seja diferenciado em artéria ou veia. Da mesma maneira, no processo de arterialização venosa marcadores moleculares podem ser modulados como sinalizadores adaptativos ao regime hemodinâmico arterial. No presente trabalho, caracterizamos duas proteínas: a α -SMA e o CRP3 que parecem discriminar fenótipos das células musculares lisas vasculares. Enquanto a α -SMA fornece indicativo do fenótipo contrátil ou secretor, o CRP3 parece ser um marcador do fenótipo venoso e arterial.

Conclusões

7. Conclusões

Os dados apresentados neste trabalho mostram que:

- ✚ As plataformas proteômicas de gel 2-D e ICAT foram eficientes em identificar proteínas modificadas em veias safenas humanas arterializadas no sistema *ex vivo*;
- ✚ A α -SMA é regulada no processo de arterialização de segmento venoso. Em modelo de arterialização de veia jugular de rato a α -SMA mostrou-se diminuída nos primeiros dias de arterialização (1-3 dias) aumentando gradativamente nos dias subseqüentes;
- ✚ O gene CRP3, da família das CRPs, apresenta uma maior expressão em células musculares lisas arteriais. A veia safena humana cultivada em regime hemodinâmico arterial induz aumento de CRP3, e este aumento é primariamente devido ao estímulo de estiramento e não do aumento de “shear stress” associado à arterialização.

Implicações Clínicas

8. Implicações Clínicas

Neste trabalho demonstramos a diminuição da α -SMA juntamente com o aumento da CRP3 nos períodos iniciais da arterialização de segmentos venosos. Estas duas proteínas representam importantes marcadores do fenótipo das células musculares lisas. Enquanto a α -SMA tem a capacidade de discriminar entre o fenótipo contrátil e secretor, a CRP3 diferencia o fenótipo venoso e arterial. A caracterização da α -SMA e da CRP3 no processo de arterialização do enxerto venoso poderá fornecer ferramentas de avaliação e acompanhamento do remodelamento venoso ao regime arterial. Futuramente, pode-se propor estratégias de intervenção para aumentar a expressão da CRP3 na veia safena e desta maneira 1) proporcionar uma arquitetura do citoesqueleto celular mais resistente para suportar o regime hemodinâmico arterial e/ou 2) promover a regulação da expressão gênica de fatores específicos de SMCs, que são as células especializadas da parede vascular capazes de suportar o estresse mecânico.

Referências Bibliográficas



9. Referências Bibliográficas

- Abeles D, Kwei S, Stavrakis G, Zhang Y, Wang ET, Garcia-Cardena G. Gene expression changes evoked in a venous segment exposed to arterial flow. *J Vasc Surg.* 2006;44:863– 870.
- Allaire E, Clowes A W.. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the intimal hyperplastic response. *Ann Thorac Surg.* 1997;63:582-591.
- Angell WW, Sywak A. The saphenous vein versus internal mammary artery as a coronary bypass graft. *Circulation.*1977; 56(3 Suppl):II22-5.
- Arber S, Caroni P. Specificity of single LIM motifs in targeting and LIM/LIM interactions in situ. *Genes Dev.* 1996 Feb 1;10(3):289-300.
- Arber, S., Halder, G., and Caroni, P. Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell* 1994; 79, 221–231.
- Arber, S., Hunter, J.J., Ross, J., Jr., Hongo, M., Sansig, G., Borg, J., Perriard, J.C., Chien, K.R., and Caroni, P. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* 1997; 88, 393–403.
- Avezum A, Cavalcanti AB, Farsky PS, Knobel M. Transferring the evidence from clinical research to cardiologic practice. *Rev Assoc Med Bras.* 2001;47(2):165-8. Review.

- Bea F, Bar H, Watson L, *et al.* Cardiac alpha-actin in smooth muscle cells: detection in umbilical cord vessels and in atherosclerotic lesions. *Basic Res Cardiol.* 2000;95: 106–113.
- Bourassa M G. Fate of venous grafts: the past, the present and the future. *J. Am. Coll. Cardiol.*1991; 5:1081-1083
- Boyle E M Jr, e cols. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: atherosclerosis. *Ann Thorac Surg.*1997; 63:885-894.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:248-254.
- Bulkley, B. H. & Hutchins, G. M. Accelerated “Atherosclerosis”: A morphologic study of 97 saphenous vein coronary artery bypass grafts. *Circulation.* 1977; 55:163-69.
- Bush HL Jr, Jakubowski JA, Curl GR, Deykin D, Nabseth DC. The natural history of endothelial structure and function in arterialized vein grafts. *J Vasc Surg.* 1986;3:204 –215.
- Campeau, L., Enjalbert, M., Lespérance, J., Bourassa, M. G., Kwiterovich, P., Wacholder, S., Sniderman, A. The relation of risk factors to the development of atherosclerosis in saphenous vein bypass grafts and the progression of disease in the native circulation. *N. Engl. J. Med.* 1984; 311:1329-32.
- Campeau, L., Enjalbert, M., Lespérance, J., Vaislic, C., Grondin, C. M., Bourassa, M. G. Atherosclerosis and late closure of aortocoronary saphenous vein

grafts: sequential angiographic studies at 2 weeks, 1 year, 5 to 7 years, and 10 to 12 years after surgery. *Circulation*. 1983; 68(suppl II):II1-7.

Canver CC. Conduit options in coronary artery bypass surgery. *Chest*. 1995, 108(4):1150-5.

Chang DF, Belaguli NS, Iyer D, Roberts WB, Wu SP, Dong XR, Marx JG, Moore MS, Beckerle MC, Majesky MW, Schwartz RJ. Cysteine-rich LIM-only proteins CRP1 and CRP2 are potent smooth muscle differentiation cofactors. *Developmental Cell*. 2003;4, 107–118.

Chaponnier C, Gabbiani G. Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *J Pathol*. 2004 Nov;204(4):386-95.

Crawford AW, Pino JD, Beckerle MC. Biochemical and Molecular Characterization of the Chicken Cysteine-lqch Protein, a Developmentally Regulated LIM-Domain Protein That Is Associated with the Actin Cytoskeleton. *J Cell Biol*. 1994 Jan;124(1-2):117-27.

Cook J M, Cook C D, Marlar R, Solis M M, Fink L, Eidt J F. Thrombomodulin activity in human saphenous vein grafts prepared for coronary artery bypass. *J Vasc Surg*.1991; 14:147-151.

Cox J L, Chiasson D A, Gotlieb A L. Stranger in a strange land: the patogenesis of saphemous vein graft stenosis with emphasis on structural and functional differences between veins and arteries. *Prog Cardiovasc Dis*.1991; 34:45-68.

- Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2001 May;107(10):1255-62.
- Dilley R J, McGeachie J K, Tennant M. Vein to artery grafts: a morphological and histochemical study of the histogenesis of intimal hyperplasia. *Aust N Z J Surg.*1992; 62: 297-303.
- Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1998 Jul 1;102(1):145-52.
- Durbin L, Brennan C, Shiomi K, Cooke J, Barrios A, Shanmugalingam S, Guthrie B, Lindberg R, Holder N. Eph signaling is required for segmentation and differentiation of the somites. *Genes Dev.* 1998, 12:3096–3109.
- Eldon A, Hoover EL, Pett SB, Weksler BB. Prostacyclin production by arterialized autogenous grafts in dogs. *Prostaglandins* 1981;27: 485-98.
- Favoloro,R.G., . Saphenous vein graft in the surgical treatment of coronary artery disease: operative technique. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*1969; 58:178-185.
- Fitzgibbon G M, Kafka H P, Leach A J, e cols. . Coronary bypass graft fate and patient outcome: angiographic follow-up of 5,065 grafts related to survival and reoperation in 1,388 patients during 25 years. *J. Am. Coll. Cardiol.*1996; 28: 616-626.

- Flick MJ, Konieczny SF. The muscle regulatory and structural protein MLP is a cytoskeletal binding partner of bI-spectrin. *J Cell Sci.* 2000 May;113 (Pt 9):1553-64.
- Fouquet B, Weinstein BM, Serluca FC, Fishman MC: Vessel patterning in the embryo of the zebrafish: guidance by notochord. *Dev Biol.* 1997, 183:37–48.
- Garret,H.E., Dennis,E.W., DeBakey,M.E. Aortocoronary bypass with saphenous vein graft: seven-year follow-up. *JAMA* 1973; 223:792-794. Comment in: *JAMA.* 1996 Nov 13;276(18):1521, 1523-5.
- Geier C, Perrot A, Ozcelik C, Binner P, Counsell D, Hoffmann K, Pilz B, Martiniak Y, Gehmlich K, van der Ven PF, Fürst DO, Vornwald A, von Hodenberg E, Nürnberg P, Scheffold T, Dietz R, Osterziel KJ. Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 2003 Mar 18;107(10):1390-5.
- Gerety SS, Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol Cell.* 1999 Sep;4(3):403-14.
- Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med.* 1994;330:1431–1438
- Golledge,J., Turner,R.J., Harley,S.L., Springall,D.R., Powell,J.T. Circuferencial deformation and shear stress induce differential responses in saphenous vein endothelium exposed to arterial flow. *J. Clin. Invest.*1997; 99:2719-2726.

- Gosling,M., Golledge,J., Turner,R.J., Powell,J.T. Arterial flow conditions downregulate thrombomodulin on saphenous vein endothelium. *Circulation* 1999; 99:1047-1053.
- Grondin, C. M., Campeau, L., Lespérance, J., Enjalbert, M., Bourassa, M. G. Comparison of late changes in internal mammary artery and saphenous vein grafts in two consecutive series of patients 10 years after operation. *Circulation*. 1984; 70 (suppl I):I-208-12.
- Groves H M, Kinlough-Rathbone R L and Mustard J F. Development of non-thombogenicity of injured rabbit aortas despite inhibition of platelet adherence. *Arteriosclerosis* 1986; 6:189-195.
- Han CI, Campbell GR, Campbell JH. Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation. *J Vasc Res* 2001; 38: 113–119.
- Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jul;6(7):508-19.
- Harper B.D., Beckerle M.C., Pomies P. Fine mapping of the alpha-actinin binding site within cysteine-rich protein. *Biochem. J*. 2000;1:269-274.
- Henderson, J.R., Macalma, T., Brown, D., Richardson, J.A., Olson, E.N., and Beckerle, M.C. The LIM protein, CRP1, is a smooth muscle marker. *Dev. Dyn*. 1999;214, 229–238.

- Henderson VJ, Cohen RG, Mitchell RS, Kosek JC, Miller DC. Biochemical (functional) adaptation of “arterialized” vein grafts. *Ann Surg.* 1986;203:339–345.
- Herzog Y, Kalcheim C, Kahane N, Reshef R, Neufeld G. Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 in arteries and veins. *Mech Dev.* 2001 Nov;109(1):115-9.
- Hoch, J. R., Stark, V. K., Rooijen, N. V., Kim, J. L., Nutt, M. P., Warner, T. F. Macrophage depletion alters vein graft intimal hyperplasia. *Surgery.* 1999; 126:428-37.
- Hoch, J.R., Stark,V.K., Turnipseed,W.D. The temporal relationship between the development of vein graft intimal hyperplasia and growth factor gene expression. *J. Vasc. Surg.* 1995; 22:51-58.
- Jahn L, Franke WW. High frequency of cytokeratin-producing smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Differentiation* 1989; 40: 55–62.
- Jahn L, Kreuzer J, von Hodenberg E, *et al.* Cytokeratins 8 and 18 in smooth muscle cells. Detection in human coronary artery, peripheral vascular, and vein graft disease and in transplantation-associated arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 1631–1639.
- Jain, M.K., Fujita, K.P., Hsieh, C.M., Endege, W.O., Sibinga, N.E., Yet, S.F., Kashiki, S., Lee, W.S., Perrella, M.A., Haber, E., and Lee, M.E. Molecular cloning and characterization of SmLIM, a developmentally regulated LIM

protein preferentially expressed in aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1996;271, 10194–10199.

Jones EA, le Noble F, Eichmann A. What determines blood vessel structure? Genetic prespecification vs. hemodynamics. *Physiology (Bethesda)*. 2006 Dec;21:388-95.

Joris I, Zand T, Nunnari J J, Krolikowski F J and Majno G. Studies on the pathogenesis of atherosclerosis I. Adhesion and emigration of mononuclear cells in the aorta of hypercholesterolemic rats. *Am J Pathol.*1983; 113: 341-358.

Kadmas JL, Beckerle MC. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Nov;5(11):920-31.

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

Kong, Y., Flick, M.J., Kudla, A.J., and Konieczny, S.F. Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. *Mol. Cell. Biol.* 1997, 17, 4750–4760.

Konrat R, Kräutler B, Weiskirchen R, Bister K. Structure of cysteine- and glycine-rich protein CRP2. Backbone dynamics reveal motional freedom and independent spatial orientation of the lim domains. *J Biol Chem.* 1998 Sep 4;273(36):23233-40.

- Kubota K, Wakabayashi K, Matsuoka T. Proteome analysis of secreted proteins during osteoclast differentiation using two different methods: two-dimensional electrophoresis and isotope-coded affinity tags analysis with two-dimensional chromatography. *Proteomics*.2003; 3(5):616-26.
- Kwei S, Stavrakis G, Takahas M, Taylor G, Folkman MJ, Gimbrone MA Jr, Garcia-Cardena G. Early adaptive responses of the vascular wall during venous arterialization in mice. *Am J Pathol*. 2004;164:81– 89.
- Lawrie GM, Morris GC, Chapmon DW, Lie JT. Patterns of patency of 596 vein grafts up to seven years after aorto coronary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1977; 73:443-48.
- Lawson ND, Scheer N, Pham VN, Kim CH, Chitnis AB, Campos-Ortega JA, Weinstein BM. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development*. 2001 Oct;128(19):3675-83.
- Lazard D, Sastre X, Frid MG, Glukhova MA, Thiery JP, Koteliansky VE. Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Feb 1;90(3):999-1003.
- Leville, C. D., Dason, M. S., Seabrook, G. R., Jean-Claude, J. M., Towne, J. B., Cambria, R. A. All-trans-retinoic acid decreases vein graft intimal hyperplasia and matrix metalloproteinase activity *in vivo*. *J. Surg. Res*. 2000; 90:183-190.

- Li G, Chen SJ, Oparil S, Chen YF, Thompson JA. Direct in vivo evidence demonstrating neointimal migration of adventitial fibroblasts after balloon injury of rat carotid arteries. *Circulation*. 2000 Mar 28;101(12):1362-5.
- Liang D, Xu X, Chin AJ, Balasubramaniyan NV, Teo MA, Lam TJ, Weinberg ES, Ge R. Cloning and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) from zebrafish, *Danio rerio*. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Apr 1;1397(1):14-20.
- Liao EC, Paw BH, Oates AC, Pratt SJ, Postlethwait JH, Zon LI. SCL/Tal-1 transcription factor acts downstream of cloche to specify hematopoietic and vascular progenitors in zebrafish. *Genes Dev*. 1998 Mar 1;12(5):621-6.
- Liebhaber, S.A., Emery, J.G., Urbanek, M., Wang, X.K., and Cooke, N.E. Characterization of a human cDNA encoding a widely expressed and highly conserved cysteine-rich protein with an unusual zinc-finger motif. *Nucleic Acids Res*. 1990;18, 3871–3879.
- Linder V, e cols. Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. *Circ. Res*.1991; 68:106-113.
- Liu, S.Q., Moore, M.M., Yap, C. Prevention of mechanical stretch-induced endothelial and smooth muscle cell injury in experimental vein grafts. *J Biomech Eng*.2000;122(1):31-8.
- LoGerfo F W, Quist W C, Cantelmo N L and Haudenschild C C. Integrity of vein grafts as a function of initial intimal and medial preservation. *Circulation*.1983; 68:II117-II124.

- Loop F D, Lytle B W, Gill C C, Golding LAR, Cosgrove DM, Taylor PC. Trends in selection an results of coronary artery reoperations. *Ann Thorac Surg* 1983; 36:380.
- Loop FD, Cosgrove DM, Kramer JR, Lytle BW, Taylor PC, Golding LA, Groves LK. Late clinical and arteriographic results in 500 coronary artery reoperations. *J. Thorac Cardiovasc Surg* 1981; 81:675-85.
- Lotufo, P. A. Doenças cardiovasculares no Brasil. In: *Tratado de Cardiologia – SOCESP*. Ed. Manole Ltda. São Paulo. 2005. c.1. 8-41.
- Louis HA, Pino JD, Schmeichel KL, Pomiès P, Beckerle MC. Comparison of three members of the cysteine-rich protein family reveals functional conservation and divergent patterns of gene expression. *J Biol Chem*. 1997 Oct 24;272(43):27484-91.
- Lyons MS, Bell B, Stainier D, Peters KG. Isolation of the zebrafish homologues for the tie-1 and tie-2 endothelium-specific receptor tyrosine kinases. *Dev Dyn*. 1998 May;212(1):133-40.
- Lytle, B. W., Loop, F. D., Cosgrove, D. M., Ratliff, N. B., Easley, K., Taylor, P. C. Long-term (5 to 12 years) serial studies of internal mammary artery and saphenous vein coronary bypass grafts. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 1985; 89:248-58.
- Lytle,B.W. The clinical impact of atherosclerosis saphenous vein to coronary artery bypass grafts. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg*.1994; 6:81-86.

- Mavromatis K, Fukai T, Tate M, Chesler N, Ku DN, Galis ZS. Early effects of arterial hemodynamic conditions on human saphenous veins perfused ex vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1889–1895.
- Mann, M. J., Whittemore, A. D., Donaldson, M. C., Belkin, M., Conte, M. S., Polak, J. F., Orav, E. J., Ehsan, A., Dell'Acqua, G., Dzau, V. J. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet.* 1999; 354:1493-1498.
- Mayr, M., Li, C., Zou, Y., Huemer, U., Hu, Y., Xu, Q. Biomechanical stress-induced apoptosis in vein grafts involves p38 mitogen-activated protein kinases. *FASEB J.* 2000; 15:261-270.
- McHugh KM, Crawford K, Lessard JL. A comprehensive analysis of the developmental and tissue-specific expression of the isoactin multigene family in the rat. *Dev Biol.* 1991 Dec;148(2):442-58.
- Mehta, D., Izzat, M.B., Bryan, A. J., Angelini, G. D. Towards the prevention of vein graft failure. *Inter. J. Cardiol.*1997; 62(suppl. 1):S55-S63.
- Mitra, A. K., Gangahar, D. M., Agrawal, D. K. Cellular, molecular and immunological mechanisms in the pathophysiology of vein graft intimal hyperplasia. *Immunol. Cell. Biol.* 2006; 84:115-24.
- Miyakawa, A. A., Lacchini, S., Borin, T. F., Dallan, L. A., Krieger, J. E. Characterization of human saphenous vein culture in ex vivo perfusion system. (em preparação).

- Moore, M.M., Goldman, J., Patel, A.R., Chien, S., Liu, S.Q. Role of tensile stress and strain in the induction of cell death in experimental vein grafts. *J. Biomechanics* 2001; 34:289-297.
- Morgan D O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and micorprocessors. *Annu Rev Cell Div Biol.* 1997; 13:261-291.
- Moyon D, Pardanaud L, Yuan L, Bréant C, Eichmann A. Plasticity of endothelial cells during arterial-venous differentiation in the avian embryo. *Development.* 2001a Sep;128(17):3359-70.
- Moyon D, Pardanaud L, Yuan L, Bréant C, Eichmann A. Selective expression of angiopoietin 1 and 2 in mesenchymal cells surrounding veins and arteries of the avian embryo. *Mech Dev.* 2001b Aug;106(1-2):133-6.
- Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 1997 May 17;349(9063):1436-42.
- Neitzel G F, Barboriak J J, Pintar K, Qureshi I. Atherosclerosis in aortocoronary bypass grafts: morphologic study and risk factor analysis 6 to 12 years after sugery. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 594-600.
- Noble F, Moyon D, Pardanaud L, Yuan L, Djonov V, Matthijsen R, Bréant C, Fleury V, Eichmann A. Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. *Development.* 2004 Jan;131(2):361-75.

- Nguyen H C., Grossi E A, LeBoutillier M III, Steinberg B M, e cols. Mammary artery versus saphenous vein grafts: assessment of basic fibroblast growth factor receptors. *Ann Thorac Surg.*1994; 58:308-311.
- O'Brien, J. E., Ormont, M. L., Shi, Y., Wang, D., Zalewski, A., Mannion, J. D. Early injury to the media after saphenous vein grafting. *Ann. Thorac. Surg.* 1998; 65:1273-8.
- Oliveira, S. A., Dallan, L. A. O., Lisboa, L. A. F. Intervenções cirúrgicas na doença arterial coronária crônica. In: *Tratado de Cardiologia – SOCESP*. Guanabara Koogan, 10. ed. c.7. 2005;615-23.
- Osborn M, Caselitz J, Puschel K, Weber K. Intermediate filament expression in human vascular smooth muscle and in arteriosclerotic plaques. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1987; 411: 449–458.
- Patton WF, Schulenberg B, Steinberg TH. Two-dimensional gel electrophoresis; better than a poke in the ICAT? *Curr Opin Biotechnol* 2002; 13(4):321-8.
- Pennington, S.R.; Wilkins, M.R.; Hochstrasser, D.F.; Dunn, M.J. Proteome analysis: From protein characterization to biological function. *Trends in Cell Biology*. 1997 v. 7, p. 168-173.
- Price D T and Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med.*1999; 107:85-97.
- Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and

macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature*. 1990 Mar 15;344(6263):254-7.

Rando, O.J., Zhao, K., and Crabtree, G.R. (2000). Searching for a function for nuclear actin. *Trends Cell Biol.* 10, 92–97.

Rasband, W., *ImageJ: Image Processing and Analysis in Java*. Disponível em: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. (2004).

Ratliff N B, Myles J L. Rapidly progressive atherosclerosis in aortocoronary saphenous vein grafts: possible immune-mediated disease. *Arch Pathol Lab Med*.1989;113:772-776.

Redmond,E.M., Cahill,P.A., Sitzmann,J.V. Perfused transcapillary smooth muscle and endothelial cell co-culture - a novel in vitro model. *In Vitro Cell. Dev. Biol*.1995; 31:601-609.

Rodriguez E., Lambert E.H., Magno, M.G., Mannion J.D. Contractile smooth muscle cell apoptosis early after saphenous vein grafting. *Ann Thorac Surg*.2000;70(4):1145-53.

Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*. 1973 Jun 29;180(93):1332-9.

Roth JA, Brown BG, Carey JS. Factors influencing patency of saphenous vein grafts. *Ann Thorac Surg* 1979; 28: 176-83.

- Roubos N, Rosenfeldt F L, Richards SM, Conyers R A J, Davis B B. Improved preservation of saphenous vein grafts by the use of glyceryl trinitrate – verapamil solution during harvesting. *Circulation*.1995; 92 (suppl II):II-31-II-36.
- Ruzicka DL, Schwartz RJ. Sequential activation of alpha-actin genes during avian cardiogenesis: vascular smooth muscle alpha-actin gene transcripts mark the onset of cardiomyocyte differentiation. *J Cell Biol*. 1988 Dec;107(6 Pt 2):2575-86.
- Ryan TJ, Anderson JL, Antman EM, Braniff BA, Brooks NH, Califf RM et al. ACC/AHA. Guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 1328-1428.
- Sadler I, Crawford AW, Michelsen JW, Beckerle MC. Zyxin and cCRP: Two Interactive LIM Domain Proteins Associated with the Cytoskeleton. *J Cell Biol*. 1992 Dec;119(6):1573-87.
- Saiura A, Sata M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M. Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis. *Nature Med* 2001; 7: 382–383.
- Sata M, Saiura A, Kunisato A, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nature Med* 2002; 8: 403–409.

- Sawtell NM, Lessard JL. Cellular distribution of smooth muscle actins during mammalian embryogenesis: expression of the alpha-vascular but not the gamma-enteric isoform in differentiating striated myocytes. *J Cell Biol.* 1989 Dec;109(6 Pt 1):2929-37.
- Sepulveda, J.L., Belaguli, N., Nigam, V., Chen, C.Y., Nemer, M., and Schwartz, R.J. (1998). GATA-4 and Nkx-2.5 coactivate Nkx-2 DNA binding targets: role for regulating early cardiac gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3405–3415.
- Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res.* 1995, 77(3):445-65.
- Schwartz SM. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest.* 1997, 1;100(11 Suppl):S87-9. Review.
- Sherr C J. Cancer cell cycles. *Science.*1996; 274:1672-1677.
- Sherr C J. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell.*1994; 79:551-555.
- Shi Y, O'Brien JE, Mannion JD, *et al.* Remodeling of autologous saphenous vein grafts: the role of perivascular myofibroblasts. *Circulation* 1997; 95: 2684–2693.
- Shimizu K, Sugiyama S, Aikawa M, *et al.* Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nature Med* 2001; 7:738–741.

- Shuhaiber J H, Evans A N, Massad M G, Geha A S. Mechanisms and future directions for prevention of vein graft failure in coronary bypass surgery. *Eur J Cardiothorac Surg.*2002; 22(3): 387-96.
- Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation* 2002; 106: 1199–1204.
- Smith EB. Transport, interactions and retention of plasma proteins in the intima: the barrier function of the internal elastic lamina. *Eur Heart J.* 1990 Aug;11 Suppl E:72-81.
- Spray,T.L., Roberts,W.C. Changes in saphenous vein used as aorto-coronary bypass graft. *Am. Heart. J.*1977; 94:500-516.
- Terkeltaub R, Boisvert WA, Curtiss LK. Chemokines and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 1998 Oct;9(5):397-405.
- Théroux P, Waters D. Diagnosis and Management of Patients With Unstable Angina, In: Alexander RW, Schlant RC, Fuster V: *Hurst's The Heart Arteries and Veins*, Mc Graw-Hill, New York, 1998; 9th edition, pp. 1307-1343.
- Thompson MA, Ransom DG, Pratt SJ, MacLennan H, Kieran MW, Detrich HW 3rd, Vail B, Huber TL, Paw B, Brownlie AJ, Oates AC, Fritz A, Gates MA, Amores A, Bahary N, Talbot WS, Her H, Beier DR, Postlethwait JH, Zon LI. The cloche and spadetail genes differentially affect hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol.* 1998 May 15;197(2):248-69.

- Tomas, J. J., Stark, V. E., Kim, J. L., Wolff, R. A., Hullett, D. A., Warner, T. F., Hoch, J. R. Beta-galactosidase-tagged adventitial myofibroblasts tracked to the neointima in healing rat vein grafts. *J. Vasc Res.* 2003; 40(3):266-75.
- Torres-Vazquez J, Kamei M, Weinstein BM. Molecular distinction between arteries and veins. *Cell Tissue Res.* 2003;314:43–59.
- van der Loop FT, Schaart G, Timmer ED, Ramaekers FC, van Eys GJ. Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells. *J Cell Biol.* 1996 Jul;134(2):401-11.
- Vandekerckhove J, Weber K. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol.* 1978 Dec 25;126(4):783-802.
- van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation.* 1994 Jan;89(1):36-44.
- Verrier E D, Boyle E M Jr. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery. *Ann. Thorac Surg.* 1996; 62:915-922.
- Villa N, Walker L, Lindsell CE, Gasson J, Iruela-Arispe ML, Weinmaster G. Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mech Dev.* 2001 Oct;108(1-2):161-4.

- Wallner, K., Li, C., Fishbein, M. C., Shah, P. K., Sharifi, B. G. Arterialization of human grafts is associated with tenascin-c expression. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1999; 34:871-875.
- Wang X, Li Q, Adhikari N, Hall JL. A role for muscle LIM protein (MLP) in vascular remodeling. *J Mol Cell Cardiol.* 2006 Apr;40(4):503-9.
- Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell.* 1998 May 29;93(5):741-53.
- Weiskirchen R, Günther K. The CRP/MLP/TLP family of LIM domain proteins: acting by connecting. *Bioessays.* 2003 Feb;25(2):152-62.
- Weiskirchen, R., and Gressner, A.M. The cysteine- and gly cine-rich LIM domain protein CRP2 specifically interacts with a novel human protein (CRP2BP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 274, 655–663.
- Weiskirchen, R., Moser, M., Weiskirchen, S., Erdel, M., Dahmen, S., Buettner, R., and Gressner, A.M. LIM-domain protein cysteine- and glycine-rich protein 2 (CRP2) is a novel marker of hepatic stellate cells and binding partner of the protein inhibitor of activated STAT1. *Biochem. J.* 2001, 359, 485–496.
- Weiskirchen, R., Pino, J.D., Macalma, T., Bister, K., and Beckerle, M.C. The cysteine-rich protein family of highly related LIM domain proteins. *J. Biol. Chem.* 1995; 270, 28946–28954

- Westerband A, Crouse D, Richter LC, Aguirre ML, Wixon CC, James DC, Mills JL, Hunter GC, Heimark RL. Vein adaptation to arterialization in an experimental model. *J Vasc Surg.* 2001;33:561–569.
- Wilkins, M.R.; Pasquali, C.; Appel, R.D.; Ou, K., Golaz, O.; Sanchez, J.-C; Yan, J.X., Gooley, A.A.; Hughes, G.; Humphrey-Smith, I.; Willians, K.L.; Hochstrasser, D.F. From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology*, 1996; v. 14, p. 61-65.
- Yamamura,S., Okadome,K., Onohara,T., Komori,K., Gugimachi,K. Blood flow and kinetics of smooth muscle cell proliferation in canine autogenous vein grafts: in vivo BrdU incorporation. *J. Surg. Res.*1994; 56:155-161.
- Yang Z, e cols. Different effects of thrombin receptor activation on endothelium and smooth muscle cells of human coronary bypass vessels: implications for venous bypass graft failure. *Circulation*1997; 95:1870-1876.
- Yuan, L., Moyon, D., Pardanaud, L., Breant, C., Karkkainen, M. J., Alitalo, K. and Eichmann, A. (2002). Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* 129, 4797-4806.
- Zeff, R. H., Kongtahworn, C., Iannone, L. A., Gordon, D. F., Brown, T. M., Phillips, S. J., Skinner, J. R., Spector, M. Internal mammary artery versus saphenous vein graft to the left anterior descending coronary artery: prospective randomized study with 10-year follow-up. *Ann. Thorac. Surg.* 1988; 45:533-36.

Zhong TP, Childs S, Leu JP, Fishman MC. Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature*. 2001 Nov 8;414(6860):216-20.

Anexos





Luciene Cristina Gastalho Campos
Curriculum Vitae

Julho/2008

Luciene Cristina Gastalho Campos

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Luciene Cristina Gastalho Campos
Filiação Luiz Carlos Natareli Campos e Rita de Cássia Gastalho Campos
Nascimento 15/11/1982 - São Paulo/SP - Brasil
Carteira de Identidade 29205807X SSP/SP - SP - 16/03/2001
CPF 30241098890

Endereço residencial Rua Pedro de Lucena Pereira - 221
Vila Guedes - Sao Paulo
05136-310, SP - Brasil
Telefone: 011 39047788

Endereço profissional Instituto do Coração, Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular
Av. Dr. Enéas de Carvalho, 44 Bloco II 10º andar
Cerqueira Cesar - Sao Paulo
05403-000, SP - Brasil
Telefone: 11 30695069

Endereço eletrônico

e-mail para contato : luciene.campos@incor.usp.br
e-mail alternativo : luciene.campos@gmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

- 2004 - 2008** Doutorado em Ciências pelo Programa de Cardiologia.
Universidade de São Paulo – USP, Instituto do Coração - InCOR
Título: Identificação e Caracterização de Proteínas Modificadas em Enxertos de Veias Safenas Humanas Arterializadas no sistema *ex vivo*..
Orientador: José Eduardo Krieger
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2002 - 2003** Iniciação Científica.
Laboratório de Genética e cardiologia Molecular, Instituto do Coração - InCOR
Título: Identificação de Proteínas Modificadas em Veias Safena Submetida ao Regime Arterial
Orientador: José Eduardo Krieger
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2000 - 2003** Graduação em Biomedicina.
Universidade das Faculdades Metropolitanas Unidas, UNIFMU, Brasil

Atuação profissional

1. Instituto do Coração - InCor -

Vínculo institucional

2004 - Atual Vínculo: Pós-Graduanda , Enquadramento funcional: Pesquisador, Regime: Dedicção Exclusiva

Linhas de pesquisa

1. Biologia Vasculuar, Molecular e Proteoma

Objetivos: Identificação e caracterização de proteínas modificadas em veia safena arterializada utilizando a plataforma de análise proteômica e investigação do potencial terapêutico das proteínas que se mostrarem importantes no processo de arterialização do enxerto venoso.

Projetos

2002 - 2008 Identificação de proteínas modificadas em veia safena submetidas ao regime arterial,

Descrição: A revascularização cardíaca utilizando a ponte de safena é um procedimento bastante comum usado para restabelecer o fluxo coronariano. O sucesso do implante depende da adaptação do vaso que estava em um regime venoso, de baixa pressão, e passa para um regime arterial, de alta pressão e fluxo pulsátil. Quando a veia safena é implantada no coração ela é imediatamente submetida a uma nova condição hemodinâmica, onde o "shear stress" aumentado pode estar interferindo na função endotelial e conseqüentemente na função vascular. Já é demonstrado que quando uma veia é interposta em leito arterial, ocorre proliferação celular na parede do vaso, levando ao processo conhecido como arterialização do enxerto. Este processo adaptativo é fundamental para o vaso desempenhar a sua nova função, entretanto, um número significativo de enxertos sofre um processo excessivo de remodelação prejudicando ou inviabilizando totalmente a sua função. Este processo envolve a participação de diversas proteínas e o estudo de como elas participam conjuntamente é uma importante abordagem para entender as alterações fisiológicas e patológicas que ocorrem no enxerto vascular. Neste trabalho, será utilizado a tecnologia do proteoma para identificar as proteínas modificadas quando a safena é submetida ao regime arterial. Este estudo vem complementar um trabalho em andamento no Laboratório que utiliza o "cDNA microarray" para identificar genes importantes para esta resposta e que possam ser utilizados como novos alvos terapêuticos. Desta maneira, alterações pós-transcricionais que ocorrem na veia safena cultivada em regime hemodinâmico arterial poderão ser identificadas e avaliadas em sistemas in vitro e in vivo já desenvolvidos no laboratório.

Situação: Em Andamento Natureza: Extensão

Alunos envolvidos: Doutorado (1);

Integrantes: Luciene Cristina Gastalho Campos (Responsável); Ayumi Aurea Miyakawa; Luis Alberto O Dallan; Fábio Cesar Gozzo, Jose Eduardo Krieger;

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

2003 - 2006 NFkappaB E A ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I (ECA) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS SUBMETIDAS AO "SHEAR STRESS"

Descrição: Evidências recentes mostram que forças físicas como o "shear stress" têm participação importante na expressão de genes que participam do controle da homeostasia do sistema cardiovascular. Além disto, observa-se que o aparecimento de

disfunções cardiovasculares, como a aterosclerose, é mais freqüente em regiões de bifurcações vasculares, onde há diminuição do "shear stress" associada à transição de regime de fluxo laminar para turbulento. A enzima conversora de angiotensina I (ECA) é uma ectoproteína ancorada à membrana da célula endotelial, e por esta razão é um alvo natural para sofrer influência do "shear stress". Em concordância com esta idéia, recentemente em nosso laboratório foi demonstrado que o "shear stress" diminui a atividade e a expressão da ECA "in vitro" e "in vivo". Esta resposta é acompanhada pela redução da atividade da função do fragmento de 1274 pb do promotor da ECA de rato, que contém seqüência idêntica ao elemento responsivo ao "shear stress" (SSRE) descrito inicialmente no gene do PDGF. No presente estudo estamos avaliando a participação do NFkappaB na regulação do fragmento de 57pb correspondente a seqüência regulatória responsiva ao "shear stress" no promotor da ECA em células endoteliais. Análise funcional da construção contendo o elemento responsivo ao "shear stress" do promotor da ECA mostrou uma resposta bifásica da atividade da ECA com um aumento na fase aguda e uma diminuição na fase crônica. A análise da ativação do NFkappaB apresentou o mesmo perfil de ativação da ECA, avaliado através de estudos com gene repórter e por análise de retardo de migração do DNA em gel de acrilamida. Os resultados mostram que tanto a ECA como o NFB apresentam resposta bifásica em células endoteliais estimuladas pelo "shear stress".

Situação: Em Andamento Natureza: Extensão

Alunos envolvidos: Doutorado (1);

Integrantes: Luciene Cristina Gastalho Campos (Responsável); Ayumi Aurea Miyakawa; Jose Eduardo Krieger

Áreas de atuação

1. Proteoma
2. Fisiologia Cardiovascular
3. Citologia e Biologia Celular
4. Biologia Molecular
5. Genética Molecular e de Microorganismos

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem

Prêmios e títulos

- 2008** Finalista do Prêmio Pesquisa Básica, Socesp
- 2005** Honra ao Mérito pela apresentação na XX Reunião Anual FesBe, Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FesBe)
- 2002** Prêmio Acadêmico 2002, Universidade das Faculdades Metropolitanas Unidas (UniFMU)

Produção em C, T & A**Produção Bibliográfica****Artigos completos publicados em periódicos**

1. DALLAN, L. A. O., MIYAKAWA, A. A., LISBOA, L. A., BORIN, T. F., ABREU FILHO, C. A. C., **CAMPOS, L. C. G.**, KRIEGER, J. E., OLIVEIRA, S. A.

Ação inibitória da Interleucina 1 beta sobre a proliferação de células musculares lisas cultivadas a partir de veias safenas humanas. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery.* , v.20, p.111/44205-740 - 116, 2005.

2. DALLAN, L. A. O., MIYAKAWA, A. A., LISBOA, L. A., ABREU FILHO, C. A. C., BORIN, T. F., **CAMPOS, L. C. G.**, KRIEGER, J. E., OLIVEIRA, S. A.

Alterações estruturais e moleculares (cDNA) precoces em veias safenas humanas cultivadas sob regime pressórico arterial. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular.* , v.19, p.126 - 135, 2004.

Capítulos de livros publicados

1. **CAMPOS, L. C. G.** COSTA-JUNIOR, H. M., MIYAKAWA, A. A., SCHECHTMAN, D., KRIEGER, J. E.

Capítulo: A Proteômica e sua Aplicação na Detecção de Novos Alvos Terapêuticos em Doenças Cardiovasculares. Título: Bases Moleculares das Doenças Cardiovasculares a integração entre a pesquisa básica e a prática clínica. 1 ed. São Paulo : Atheneu, 2008, v.1, p. 47-65.

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (completo)

1. **CAMPOS, L. C. G.** , MIYAKAWA, A. A., BORIN, T. F, CARDOSO, L., DALLAN, L. A. O., GOZZO, F. C., KRIEGER, J. E. CRP3/MLP Expression is Induced Human Saphenous Vein Graft Arterialization.

Apresentação de Poster / Painel no(a) **FASEB Experimental Biology Meeting**, San Diego 2008. (Congresso)

2. **CAMPOS, L. C. G.** , MIYAKAWA, A. A., BORIN, T. F, CARDOSO, L., DALLAN, L. A. O., GOZZO, F. C., KRIEGER, J. E. Identificação e Caracterização de Proteínas Modificadas em Enxertos de Veias Safenas Humanas Arterializadas no modelo ex vivo - Avaliação da actina de músculo liso e da CRP3/MLP.

.Apresentação Oral no(a) **XXIX Congresso da SOCESP**, São Paulo 2008. (Congresso)

3. **CAMPOS, L. C. G.** , MIYAKAWA, A. A., GOZZO, F. C., DALLAN, L. A. O., KRIEGER, J. E. IDENTIFICATION OF POTENTIAL MOLECULAR TARGETS DURING ARTERIALIZATION OF HUMAN SAPHENOUS VEIN: A PROTEOMICS APPROACH.

Apresentação de Poster / Painel no(a) **Reunião Anual da Fesbe**, Águas de Lindóia 2007. (Congresso)

4. **CAMPOS, L. C. G.**, MIYAKAWA, A. A., GOZZO, F. C., DALLAN, L. A. O., KRIEGER, J. E. IDENTIFICATION OF POTENTIAL MOLECULAR TARGETS DURING ARTERIALIZATION OF HUMAN SAPHENOUS VEIN: A PROTEOMICS APPROACH

Apresentação de Poster / Painel no(a) **SBFis (Sociedade Brasileira de Fisiologia)**, Ribeirão Preto 2006.

5. **CAMPOS, L. C. G.**, MIYAKAWA, A. A., BORIN, T. F., KRIEGER, J. E.

NFkB e a Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) em Células Endoteliais Submetidas

ao "Shear Stress". Apresentação de Poster / Paineis no(a) Fesbe (Federação das Sociedades de Biologia Experimental), Águas de Lindóia, 2005.

6. BORIN, T. F., MIYAKAWA, A. A., DALLAN, L. A. O., **CAMPOS, L. C. G.**, KRIEGER, J. E. Seleção e Caracterização de Genes Candidatos que Possam Interferir no Processo Inicial de Degeneração de Veia Safena Humana Arterializada: Gene da Interleucina-1 Beta (IL-1b). Apresentação de Poster / Paineis no(a) Fesbe (Federação das Sociedades de Biologia Experimental), Águas de Lindóia, 2005.

7. DALLAN, L. A. O., MIYAKAWA, A. A., LISBOA, L. A., **CAMPOS, L. C. G.**, ABREU FILHO, C. A., BORIN, T. F., KRIEGER, J. E., OLIVEIRA, S. A. Ação Inibitória da Interleucina 1 beta sobre a Proliferação de Células Musculares Lisas Cultivadas a partir de Veias Safenas Humanas. 32º Congresso da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular e 1º Encontro Latino-Americano de Cirurgia Cardiovascular, Vitória – ES 2005

Produção Técnica

1. KRIEGER, J. E., **CAMPOS, L. C. G.**, BORIN, T. F. AZAMBUJA, A., SAMPAIO, A. C., AMBAR, G., CRAVO, R., PAVAM, M., PEREIRA JR, J., MENDES-LANA, A., SOARES, R. B. S., PIMENTEL, F., GOMES, K. M., SIMÕES-COSTA, M. **II Curso de Atualização em Biologia Molecular**, 2006. (Desenvolvimento de material didático/ Organização e Palestrante)

Participação em eventos

1. **FASEB - Experimental Biology Meeting 2008**, San Diego, CA – USA, 2008.
2. **XXIX Congresso da SOCESP**, São Paulo 2008.
3. **Reunião Anual da Fesbe**, Águas de Lindóia 2007.
4. **41st Congress of the Brazilian Physiological Society & Joint Meeting with the Physiological Society**, Ribeirão Preto – SP, 2006.
5. **International Symposium - Biological Cardiac Repair: A Critical Appraisal**, São Paulo – SP, 2006.
6. **II International Workshop of Vascular Biology**, São Paulo – SP, 2006.
7. **XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE**, Águas de Lindóia – SP, 2005.
8. **Satellite Symposium: Functional Genomics in Hypertension Heart Institute**, São Paulo – SP, 2004.

1. Aprovação CAPPesq – Identificação e caracterização de proteínas modificadas em veias safenas arterializadas.



DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

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

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

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

CAPPesq, 23 de Setembro de 2004.

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

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

2. Aprovação CAPPesq – Genes diferentemente expressos em modelo de arterialização de enxerto venoso no rato.



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

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

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

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

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

CAPPesq, 26 de Junho de 2003.

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

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

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

1. NOME DO PACIENTE :
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :SEXO : .M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇONº APTO:
- BAIRRO:CIDADE
- CEP:.....TELEFONE:DDD (.....)
- 2.RESPONSÁVEL LEGAL.....
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO:.....Nº APTO:
- BAIRRO:..... CIDADE:
- CEP:.....TELEFONE: DDD (.....).....
-

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

Identificação e Caracterização de Proteínas Modificadas em Enxertos de Veias Safenas humanas Arterializadas no modelo *ex vivo*.

PESQUISADOR: **José Eduardo Krieger**

CARGO/FUNÇÃO: **Diretor** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **61539**

UNIDADE DO HCFMUSP: **Incor - Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular.**

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO () RISCO MÍNIMO () RISCO MÉDIO ()

RISCO BAIXO () RISCO MAIOR ()

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

3.DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos

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

1. justificativa e os objetivos da pesquisa: o objetivo deste estudo é compreender porque a “ponte de safena” entope após um certo período. quando a mesma é colocada para substituir uma artéria coronária que estava “entupida” e que por isso provocou um infarto no indivíduo. Este estudo pode ser justificado pelo motivo que muitos dos indivíduos que passam pela cirurgia de revascularização cardíaca, precisam retornar após algum tempo ao hospital para trocar suas “pontes de safena”, pois estas estão “entupidas”.

2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: **você participará deste estudo após ser submetido a cirurgia de revascularização cardíaca.**

3. desconfortos e riscos esperados: **não haverá nenhum risco e desconforto devido a pesquisa, pois não será realizado nada além do que a cirurgia necessite. Apenas os segmentos de veias safenas que não serão utilizados para construir a “ponte de safena” será utilizada para a pesquisa, ou seja, utilizaremos a veia que sobrar e que seria descartada.**

4. benefícios que poderão ser obtidos: este estudo contribuirá para a descoberta de novas terapias para implantação da veia safena no coração, beneficiando o paciente a não ter que passar pelo desconforto de uma nova cirurgia após de algum tempo.

5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:

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

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas: você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessária antes de participar do estudo

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência: a sua participação no estudo é voluntária, mas você tem plena liberdade para não aceitar participar da pesquisa, sem incorrer em nenhuma penalidade. O seu atendimento médico não será prejudicado caso você decida não participar.

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade:

4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

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

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

Dr. Alexandre Miguel Benjó Idem

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, de de 200 .

Assinatura do sujeito da pesquisa ou
responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Proteoma

Proteoma é a análise global das proteínas expressas por um organismo ou tecido e consiste no resultado da expressão de um conjunto de genes e das modificações pós-traducionais das proteínas produzidas em resposta a condições ambientais definidas. A análise Proteômica busca a identificação do maior número de proteínas possível através de tecnologias como, por exemplo, a Eletroforese Bidimensional (2-D).

Gel 2-D

A técnica de gel bidimensional ou gel 2-D, descrita em 1975 por O'Farrel, constitui em uma poderosa ferramenta para separação e análise qualitativa e quantitativa de misturas protéicas complexas. A grande vantagem desta técnica é que ela possibilita a separação de um grande número de proteínas que correm como *spots* (mancha) no gel, pois dificilmente encontraremos duas proteínas que possuam o mesmo peso molecular e carga elétrica.

A tecnologia de gel 2-D utiliza a característica anfotérica dos aminoácidos que constitui a sua capacidade de se comportar como receptores e doadores de prótons, reagindo mediante ao pH do meio. Assim, todos os aminoácidos possuem cargas elétricas finais que variam de acordo com o pH do meio onde estão solúveis. Cada aminoácido possui um determinado ponto isoelétrico (pI) característico, que consiste em um valor de pH onde a carga final do aminoácido é zero ou neutra. Para valores de pH menores que o pI do aminoácido, este encontrará se com carga positiva e migrando para o cátodo do campo elétrico, e o inverso é verdadeiro, para valores de pH acima do pI a carga final será negativa migrando para o ânodo. Desta

forma é correto dizer que a carga final ou o pI de uma proteína consiste no somatório total de todas as cargas de seus aminoácido. Cada proteína possui um pI específico e único e esta é a principal característica utilizada na primeira dimensão de um gel 2-D para a separação de misturas protéicas complexas.

A primeira dimensão do gel 2-D consiste na focalização isoeletrica (FIE) de cada proteína, onde a mistura protéica é aplicada a um gel preparado com um gradiente imobilizado de anfóteros e submetido a altas voltagens. Este gradiente é crítico para a separação das proteínas, pois estas irão se deslocar neste gradiente impulsionadas por suas cargas elétricas até encontrarem uma região de pH que se iguale com seu pI, onde deixam de se movimentar pelo gel. Para a FIE correta é importante que as proteínas se encontrem em estados conformacionais homogêneos, sem estarem agregadas ou em interações diversas. Para tal, alguns cuidados são importantes na hora da preparação das misturas protéicas. Utilizam-se agentes caotrópicos que causam a ruptura de complexos moleculares e desfazem ligações tipo ponte de hidrogênio, Van der Waals e interações hidrofóbicas; detergentes não-iônicos, que solubilizam as proteínas e desfazem interações hidrofóbicas sem interferir com suas cargas finais; e agentes redutores para a quebra de pontes dissulfetos. Após a FIE das proteínas na primeira dimensão, as proteínas são novamente reduzidas, pela ação de agentes redutores como DTT ou análogos, e os grupamentos tióis expostos são alcalinizados para evitar a reoxidação. As proteínas são desnaturadas pela ação de detergentes iônicos e corre-se a segunda dimensão.

A segunda dimensão de um gel 2-D consiste na separação das proteínas apenas por seu peso molecular relativo em um gel de SDS-PAGE (do inglês: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). O SDS é um detergente aniônico muito

utilizado na bioquímica clássica para desnaturar e solubilizar proteínas, formando micelas globulares em meio aquoso. Estas micelas são capazes de interagir com proteínas criando uma estrutura tipo cordão, mascarando, desta forma, a carga total da proteína e conferindo-lhe uma carga negativa igual por unidade de massa. A resolução da separação das proteínas na segunda dimensão irá depender do tamanho do gel e da malha formada pela poliacrilamida polimerizada. Uma vez aplicadas em um gel SDS-PAGE, as proteínas irão migrar, quando aplicado uma voltagem, do pólo negativo para o positivo apenas por sua massa ou peso relativo, esta é a chamada mobilidade eletroforética.

Ao final do gel 2-D, com a separação promovida pela primeira e segunda dimensão, o passo seguinte consiste da forma mais adequada para a detecção dos “spots” (proteínas). A detecção é feita corando o gel com reagentes de acordo com o objetivo desejado.

Padronização da técnica de extração de Proteína de Veia Safena

Para otimizar a extração de proteínas da veia safena, três protocolos diferentes foram testados.

Métodos

1. Extração de Proteína

Extração A

As veias safenas foram homogeneizadas em tampão de extração, 50mM Tris-HCl pH= 7,5, 250mM NaCl, 2mM EDTA, 10% glicerol, 0,1% NP-40, 0,5mM PMSF e 1mM DTT. Em seguida as amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) utilizando o *kit Bio-Rad assay dye Reagent Concentrad* (Bio-Rad Laboratories).

Extração B

As veias safenas foram trituradas através da pulverização de nitrogênio líquido e utilização de gral e pistilo. Em seguida foram lisadas em tampão de extração, 2% NP-40, 9M urea, 40mM DTT e 0,5mM PMSF. As proteínas foram obtidas no sobrenadante após duas centrifugações de 13.000 rpm por 30 minutos. Em seguida as amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) utilizando o *kit Bio-Rad assay dye Reagent Concentrad* (Bio-Rad Laboratories).

Extração C

As veias safenas foram trituradas através da pulverização de nitrogênio líquido e utilização de gral e pistilo. Em seguida foram lisadas em tampão de extração, 2% triton X-100, 9M urea, 40mM DTT e 0,5mM PMSF. As proteínas

foram obtidas no sobrenadante após duas centrifugações de 13.000rpm por 30 minutos. Em seguida as amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) utilizando o *kit Bio-Rad assay dye Reagent Concentrad* (Bio-Rad Laboratories).

Para concentrar as proteínas em um menor volume foi utilizado o kit Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices (Millipore) de acordo com instruções do fabricante.

2. Eletroforese de Gel de Poliacrilamida

Géis de poliacrilamida (30% acrilamida 1% bis-acrilamida, 1,5M Tris pH 8,8, 10% SDS, 10% APS, TEMED) foram utilizados na concentração de 12,5% para o gel de resolução e gel de poliacrilamida 5% (acrilamida, 1M Tris pH 6,8, 10% SDS, 10% APS, TEMED) para o gel “stacking”. O gel submergido em tampão de eletroforese (25mM Tris, 1,9M glicina, 1%SDS) foi submetido a corrente constante de 25mA por 2 horas. Após a migração, as proteínas foram visualizadas através da coloração por Coomassie Blue R-250 (sigma).

Resultados

3. Extração de Proteínas de Veias Safenas cultivadas no sistema *ex vivo*.

Para otimizar a extração de proteínas de veia safena, a eficiência de 3 protocolos foram testados. Primeiramente foi utilizado o protocolo de extração A, para obtenção de proteínas do fragmento de veia safena. A eletroforese das

amostras de proteína de veia safena foi realizada em gel 2D e pouquíssimas proteínas foram detectadas no gel corado com prata (Figura 28).

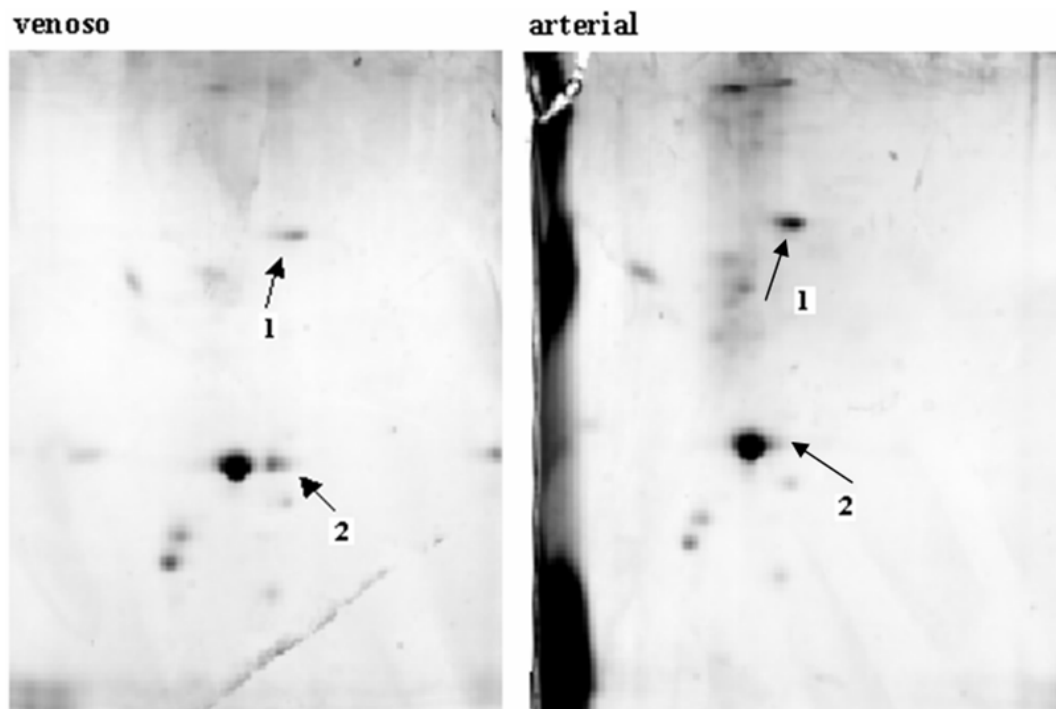


Figura 28: Gel 2D, corado com prata, de veia safena cultivada por 24 horas em regime venoso (5 mL/min.) (esquerda) e arterial (50 mL/min. - 80 mmHg) (direita). A seta 1 mostra aumento da proteína e a seta 2 mostra diminuição da proteína na veia safena cultivada em regime hemodinâmico arterial.

Ainda assim, foi observado aumento da proteína 1 e diminuição da proteína 2 quando a veia safena foi cultivada em regime hemodinâmico arterial. O número reduzido de proteínas visualizadas no gel 2D sugere uma quantificação inadequada das amostras aplicadas no gel ou uma ineficiência do método de extração das proteínas. A quantificação das amostras foi certificada, o que nos levou a procurar outros métodos de extração de proteína.

Desta maneira, foi testado o protocolo de extração B e C. Estes dois protocolos são bastante semelhantes, diferindo apenas no detergente utilizado, NP-40 em B e Triton X-100 em C. A eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% unidimensional corada com Coomassie Brilliant Blue foi realizada para analisar a eficiência de extração. A Figura 29 mostra que o tampão C possui maior eficiência que o tampão B, pois parece apresentar maior número de proteínas extraídas. Assim utilizamos o extrato protéico de veia safena, extraído pelo tampão C.

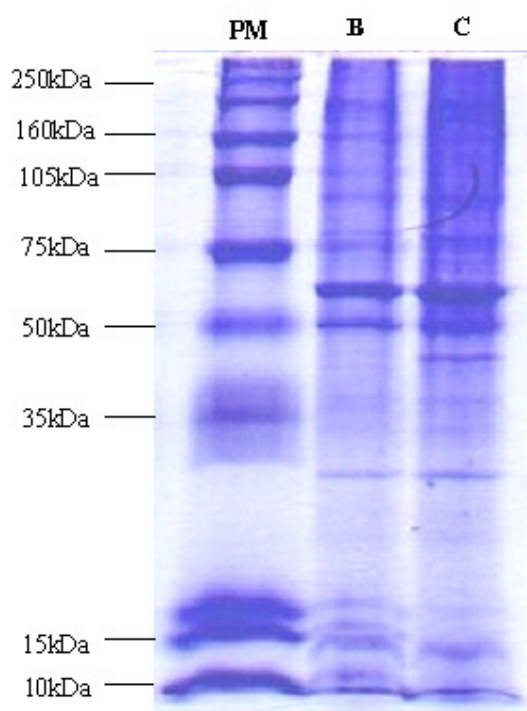


Figura 29: Gel de poliacrilamida 12,5%, mostrando a qualidade da extração de proteínas de veia safena com o tampão de extração B e C.

Padronização da técnica de Processamento do gel (extração da proteína de interesse do gel, digestão triptíca e extração dos Peptídeos).

Após análise pelo programa Image Master 2-D Elite (GE Healthcare), a retirada das proteínas de interesse foi realizada manualmente.

Métodos

Para otimizar o processamento manual das proteínas de interesse do gel 2-D, cinco protocolos diferentes foram testados, e ficou determinada a utilização do protocolo E.

Protocolo A:

As proteínas de interesse foram recortadas do gel com o auxílio de um bisturi estéril. Cada proteína foi colocada em tubo eppendorf, contendo solução 50% acetonitrila e 25mM bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) pH 8 e incubado por 15 minutos. Este procedimento foi repetido até total descoloração do gel, o que exigiu 20 repetições para pedaços levemente corados e 30 repetições para géis corados mais intensamente.

Para desidratação, os fragmentos foram incubados por 5 minutos na solução 100% acetonitrila e em seguida os géis foram secados em sistema de centrifugação à vácuo por 25 minutos. Na etapa de digestão enzimática, os géis foram reidratados com solução contendo 10mg/ml tripsina (Trypsin – GE healthcare) diluída em 25mM

NH_4HCO_3 que foi incubada em estufa 37°C durante 20 horas sob agitação. Para extração dos peptídeos foi adicionado água milliQ autoclavada ao produto da digestão, em quantidade suficiente para cobrir completamente os pedaços de géis e incubado à 37°C por 15 minutos sob agitação. Em seguida, foi acrescentado 2 vezes o volume do gel de 100% acetonitrila e incubado por mais 15 minutos à 37°C sob agitação. O sobrenadante foi coletado e reservado. A solução 50% ácido fórmico foi adicionada aos fragmentos de gel e incubados por 15 minutos à 37°C sob agitação. Após centrifugação foi acrescentado o mesmo volume de 100% acetonitrila e incubado por 15 minutos à 37°C sob agitação. O sobrenadante foi novamente coletado, combinado com o sobrenadante anterior, e em seguida o volume total foi reduzido em sistema de centrifugação à vácuo. As amostras foram ressuspensas em solução 50% acetonitrila e 0,5% TFA.

Protocolo B:

As proteínas de interesse foram recortadas do gel com o auxílio de um bisturi estéril e colocados em tubos eppendorf individualmente. Para remoção dos corantes os pedaços de gel contendo as proteínas foram incubados com solução 50% acetonitrila e 50mM NH_4HCO_3 e incubadas por 20 minutos. Este procedimento foi repetido até total descoloração do gel, o que exigiu 10 repetições para pedaços levemente corados e 12 repetições para géis corados mais intensamente.

Para desidratar os fragmentos de géis foi realizado uma lavagem com 100% acetonitrila e em seguida os géis foram secados em sistema de centrifugação a vácuo durante 25 minutos. Na etapa de digestão enzimática os géis foram reidratados com solução contendo 0,3 μg tripsina (Trypsin – GE healthcare) diluída em 50mM

NH_4HCO_3 . A solução enzimática foi adicionada fria (4°C) e as amostras permaneceram em banho de gelo durante 30 minutos, em seguida foi adicionado 200mM NH_4HCO_3 e a reação foi mantida à 37°C por 24 horas. Após este período o sobrenadante do tubo de digestão foi coletado e reservado.

Para extração dos peptídeos, foi adicionada a solução 50% acetonitrila e 2,5% TFA em quantidade suficiente para cobrir completamente os pedaços de géis que foram incubados “over night” à 4°C . O procedimento de extração foi repetido com solução 50% acetonitrila e 0,1% TFA e incubado uma vez por 3 horas e duas vezes por 30 minutos. Os sobrenadantes das quatro extrações foram combinados. O volume foi concentrado, em sistema de centrifugação à vácuo, até 5 μl e ressuspensão em mais 5 μl de solução 50% acetonitrila e 2,5% TFA.

Protocolo C:

As proteínas de interesse foram recortadas e fragmentadas com o auxílio de um bisturi estéril. Para remoção dos corantes os fragmentos de gel contendo as proteínas foram incubados, individualmente, com solução de lavagem (50% metanol e 5% ácido acético) “over night” temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido mais uma vez e incubada por 3 horas ou até a total descoloração do gel.

Para desidratar os fragmentos de géis, foi realizado uma lavagem com 100% acetonitrila e em seguida os géis foram secados em sistema de centrifugação a vácuo durante 25 minutos. Após a secagem completa, foi adicionado 100mM Ditioneitol (DTT) e incubado por 30 minutos temperatura ambiente. A solução foi descartada e 100mM iodoacetamida (IAA) foi adicionado aos pedaços de géis, e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Esta solução foi descartada e os fragmentos de géis,

contendo as proteínas de interesse, foram desidratados novamente com acetonitrila 100%, e incubados por 5 minutos temperatura ambiente. 100mM NH_4HCO_3 foi adicionado ao gel e incubado por 10 minutos temperatura ambiente. Os fragmentos foram novamente desidratados com 100% acetonitrila, temperatura ambiente e a solução foi evaporada em sistema de evaporação à vácuo.

Na etapa de digestão enzimática os géis foram reidratados com solução contendo 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tripsina (Trypsin - Amersham bioscience) diluída em 50mM NH_4HCO_3 . As amostras permaneceram em banho de gelo durante 10 minutos, em seguida o excesso de solução foi removido e adicionado 50mM NH_4HCO_3 . O tubo de digestão foi incubado “over night” à 37°C.

Para extração dos peptídeos, foi adicionado à solução de digestão 50mM NH_4HCO_3 e incubado por 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e foi adicionado sobre os fragmentos de gel o tampão de extração (50% acetonitrila e 5% ácido fórmico) e incubado por 10 minutos, temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado novamente seguido de nova adição do tampão de extração sobre os fragmentos e incubados por mais 10 minutos temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram combinados e o volume reduzido, em sistema de centrifugação à vácuo, para 10 μl e ajustado para 20 μl com 1% ácido acético.

Protocolo D:

As proteínas de interesse foram recortadas com o auxílio de um bisturi estéril, e colocadas em tubos individualmente. Em seguida, foram incubados por 10 minutos com 100% acetonitrila e homogeneizados sob agitação vigorosa por 3 minutos. Os

pedaços de géis foram lavados com H₂O milli Q por 5 minutos e fragmentados em pedaços de até 1mm cúbico.

Para desidratar os fragmentos de géis foi realizada uma lavagem de 10 minutos com 100% acetonitrila seguidos de homogeneização sob agitação vigorosa por 3 minutos. O sobrenadante foi evaporado em sistema de centrifugação a vácuo durante 25 minutos.

Na etapa de digestão enzimática os géis foram reidratados com solução contendo 10µg/ml tripsina (Trypsin, Porcine - Promega) diluída em 50mM NH₄HCO₃. As amostras permaneceram em banho de gelo durante 30 minutos, incubadas em estufa 37°C, “over night”.

Para extração dos peptídeos, foi adicionado 20mM NH₄HCO₃ à solução de digestão e incubados por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e a solução de extração foi adicionada (50% acetonitrila e 5% ácido fórmico) e incubada por 10 minutos. Este processo foi repetido duas vezes e os sobrenadantes foram combinados e o volume final foi reduzido, em sistema de centrifugação à vácuo, até 15 µl. As amostras foram purificadas em microcolunas C18 (ZIP TIPS Millipore) de acordo com instruções do fabricante.

Protocolo E:

As proteínas de interesse foram recortadas e fragmentadas com o auxílio de um bisturi estéril sobre uma placa de vidro limpa com acetona e etanol e foram colocados em tubos eppendorfs lavados duas vezes com metanol e uma vez com H₂O milliQ. Para remoção dos corantes os pedaços de gel contendo as proteínas foram

incubados com solução 50% acetonitrila e 25mM NH_4HCO_3 , pH 8. A suspensão foi incubada sob agitação vigorosa por 10 minutos e deixada em repouso durante 15 minutos. Este procedimento foi repetido até total descoloração do gel, o que exigiu 8 repetições para pedaços levemente corados e 15 repetições para géis corados mais intensamente.

Para desidratar os fragmentos de géis foi realizado uma lavagem com 100% acetonitrila e em seguida os géis foram secados em sistema de centrifugação a vácuo durante 25 minutos.

Na etapa de digestão enzimática os géis foram reidratados com solução contendo 10-15 $\mu\text{g/ml}$ tripsina (Trypsin, Porcine - Promega) diluída em 25mM NH_4HCO_3 . A solução enzimática foi aplicada fria (4°C), as amostras permaneceram em banho de gelo durante 10 minutos, em seguida foi adicionado 25mM NH_4HCO_3 e foram colocadas em estufa 37°C durante 20 horas. Após este período o sobrenadante do tubo de digestão foi transferido para um novo tubo eppendorf tratado com metanol.

Para extração dos peptídeos, foi adicionada solução 50% acetonitrila, 5% TFA, em quantidade suficiente para cobrir completamente os pedaços de géis, e agitados suavemente durante 30 minutos. Este processo de extração foi repetido mais uma vez e os sobrenadantes foram combinados e reduzidos, em sistema de centrifugação à vácuo, ao volume de 5 μl . As amostras foram purificadas em microcolunas C18 (ZIP TIPS Millipore) de acordo com instruções do fabricante. Em seguida, as amostras foram analisadas no espectrômetro de massa do tipo MALDI-Tof

Retirada manual seguida de processamento automatizado

Para o processamento automatizado, a retirada manual dos spots de interesse do gel foi realizada com o auxílio de um bisturi, colocadas individualmente em tubos contendo água milliQ. Estas amostras foram enviadas a “Core Facility” no Schepens Eye Research Institute, processadas no equipamento automatizado Multiprobe II liquid handling workstation utilizing Millipore zip plate technology.

Resultados**Identificação de proteínas modificadas pela técnica de gel 2-D.**

Com a técnica de extração de proteínas de veias safenas padronizada (anexo III), foi iniciada a padronização do gel 2D, cujo resultado está apresentado na Figura 30. Pode-se notar um grande número de proteínas detectadas com a coloração de prata, mostrando uma melhor eficiência de extração protéica da veia safena e modificações das proteínas representadas pela seta 1 e 3, que estão presentes apenas na veia cultivada em regime hemodinâmico arterial. Já a seta 2 mostra uma proteína presente em pequena quantidade na veia cultivada em regime venoso, e que passa a ter maior quantidade na amostra de veia safena cultivada em regime arterial.

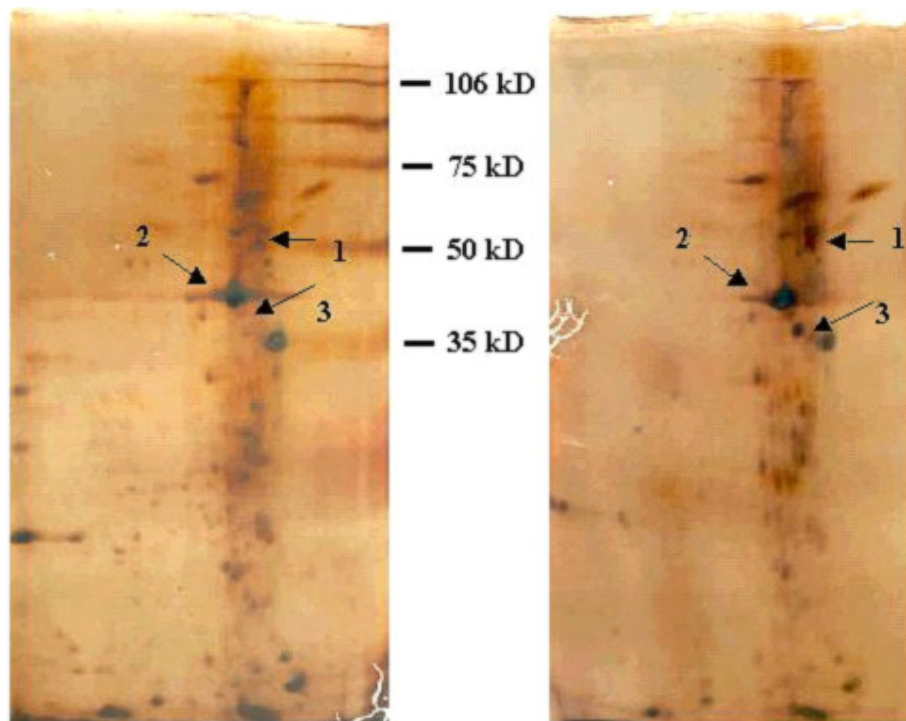


Figura 30: Gel 2D, corado com prata, de veia safena cultivada em regime hemodinâmico venoso (5 mL/min.) (esquerda) e arterial (50 mL/min. - 80 mmHg) (direita) por 24 horas. As setas 1 e 3 mostram proteínas ausentes na veia cultivada em regime venoso e presente na veia cultivada em regime arterial. A seta 2 mostra proteína presente na situação de regime venoso, porém que passou a ser mais sintetizada em regime arterial. Neste experimento a primeira dimensão foi realizada em tiras de 7cm.

Uma vez estabelecido o método de extração de proteínas da veia safena e padronizado a realização do gel 2D, ficou decidido que a melhor estratégia de estudo seria a realização de “pools” protéicos obtidos da safena de diferentes pacientes. Esta abordagem visa à detecção de proteínas alteradas pelo estresse mecânico que podem estar contribuindo para a arterialização do enxerto e a diminuição da variabilidade individual de cada paciente que pode influenciar no resultado.

Apesar das técnicas de extração de proteína e realização do gel 2-D estarem padronizadas, as técnicas automatizadas utilizadas para processamento das proteínas

de interesse de gel 2-D não foram satisfatórias, pois não conseguimos identificar picos correspondentes a peptídeos nos cromatogramas das amostras analisadas, devido ao fato da intensidade dos picos ser semelhante ao ruído produzido pelo aparelho. Desta maneira, houve a necessidade de padronização do processamento manual destes géis para que as proteínas de interesse pudessem ser identificadas. A eficiência de cinco protocolos de descoloração, digestão e extração de peptídeos foram testados, utilizando concentrações conhecidas de BSA (“bovine serum albumin” - Sigma) (100, 200 e 500ng e 1, 10 e 20 μ g). Primeiramente foram testados os protocolos A e B e analisados no espectrômetro de massa “Ettan MALDI-ToF/Pro” (GE Healthcare) por PMF. Ambos os protocolos mostraram-se ineficientes nesta análise, pois os cromatogramas das amostras não apresentaram picos com intensidades diferentes ao ruído produzido pelo aparelho, indicando que o protocolo não foi capaz de extrair os peptídeos. Novamente, foram realizados testes com os protocolos A, B e C e analisados em espectrômetros de massa do tipo Q-TOF (Waters-Micromass) por análise de LC/MS e MALDI-TOF (Applied Biosystems) que apresentam sensibilidade maior que o “Ettan MALDI-ToF/Pro”. Os três protocolos não se mostraram eficientes, pois não foi visualizado padrão isotópico de peptídeos, ou seja, a cromatografia não estava composta por peptídeos com carga (Z) ≥ 2 (figura 31). Este padrão isotópico é esperado porque todo peptídeo digerido com tripsina torna-se protonado na sua extremidade N-terminal fazendo com que possua mais de uma carga. Foram realizados novos testes utilizando os protocolos C e D, mas os dois também foram insatisfatórios.

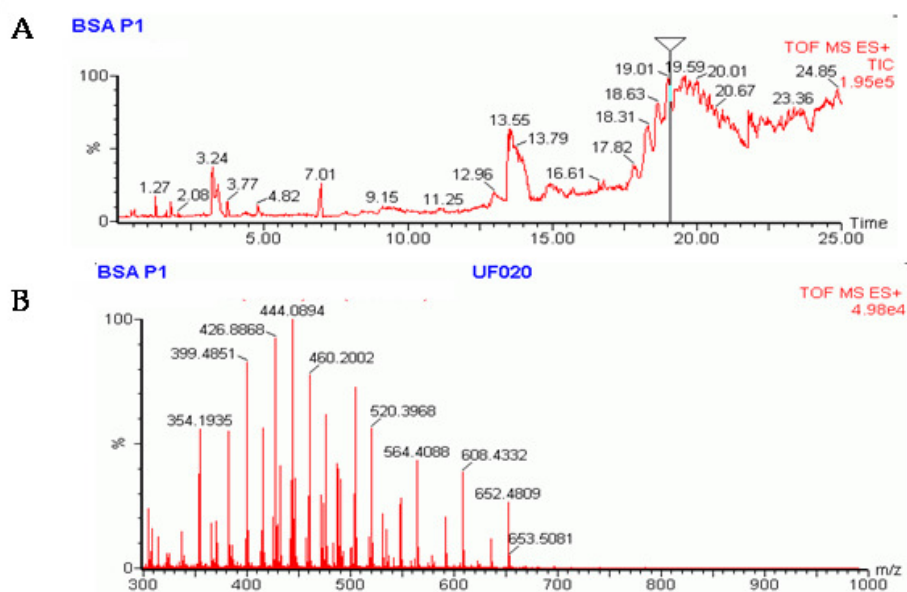


Figura 31: (A) Cromatograma da amostra de BSA analisado pelo Q-ToF (Waters-Micromass) por LC/MS. (B) Visualização ampliada do cromatograma evidenciando a ausência do padrão isotópico de peptídeos.

Um novo teste foi realizado utilizando o Protocolo E que também foi analisado pelos dois espectrômetros de massas citados acima. Ao contrário dos outros protocolos, este se mostrou bastante eficiente em todas as concentrações de BSA utilizadas. Na Figura 32 podemos observar o cromatograma junto ao espectro da amostra de BSA (1 μ g) onde podemos visualizar o padrão isotópico dos peptídeos pela presença de peptídeos com $Z \geq 2$.

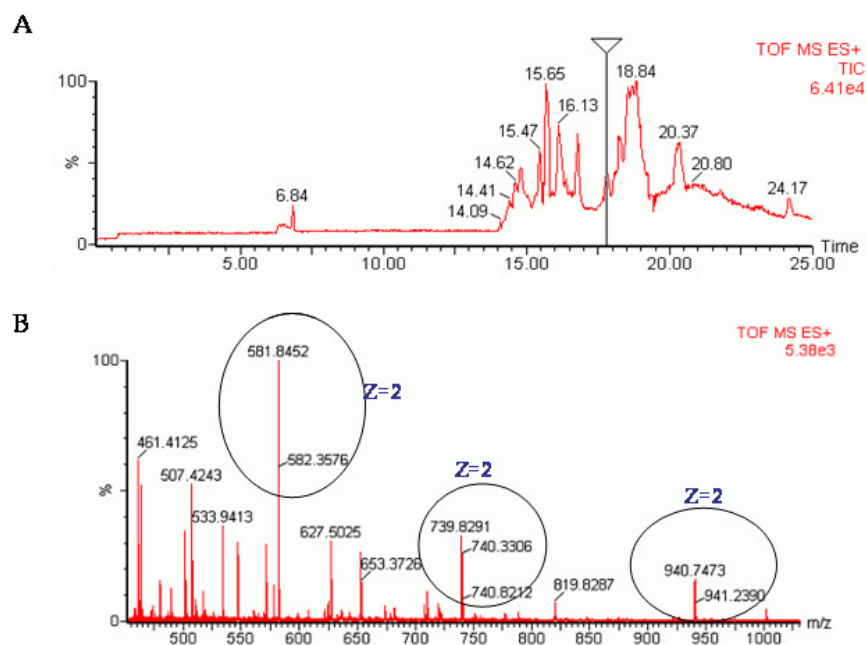


Figura 32: (A) Cromatograma da amostra de BSA (1mg) analisado pelo Q-ToF (Waters-Micromass) por LC/M. (B) Visualização ampliada do cromatograma podendo ser observado o padrão isotópico de peptídeos representados pelos picos de massa/carga (regiões circundadas).

Com o objetivo de aumentar a visualização de proteínas nos géis, encontramos uma necessidade de buscar corantes mais sensíveis. Existem vários corantes que possibilitam a visualização de proteínas em gel, porém até muito pouco tempo atrás apenas o Coomassie Brilliant Blue R-250 e o Colloidal Coomassie Blue eram os que apresentavam compatibilidade com espectrometria de massa. Isto fazia com que proteínas de baixa expressão não pudessem ser detectadas, sendo este limite de detecção em torno de 200ng de proteína. Apesar da baixa sensibilidade, a coloração com azul de coomassie permite uma boa quantificação da abundância relativa de cada proteína (devido a uma linearidade entre intensidade da proteína no gel e a concentração de proteína) além de garantir a existência de quantidade

suficiente de proteína para a sua subsequente identificação. Na tentativa de aumentar a sensibilidade de detecção, novos corantes compatíveis com a espectrometria de massa têm sido desenvolvidos. Um exemplo disto é o corante nitrato de prata que permite visualizar proteínas que estão presentes em quantidades de pg, porém não apresenta linearidade de quantificação e pode gerar coloração negativa em regiões com altas concentrações de proteínas, devido à saturação (DUNN, 2003). Tradicionalmente o nitrato de prata é um corante não compatível ao espectrômetro de massa, por provocar modificações na proteína que dificultam a sua identificação. No entanto, atualmente encontra-se disponível o kit “SilverQuest™ Silver Staining Kit”(Invitrogen), que foi formulado excepcionalmente para fornecer uma sensibilidade máxima de coloração por prata com modificação mínima da proteína, onde os reagentes utilizados não modificam as cadeias laterais das proteínas e não interferem na digestão triptíca, tornando a coloração compatível com os espectrômetros de massa. Para testar a eficácia da coloração por nitrato de prata em detectar e identificar uma proteína foram realizados duplicatas de géis unidirecionais (1-D), utilizando concentrações conhecidas de albumina sérica bovina - Sigma (BSA) (0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500ng e 1µg), sendo um corado com Coomassie brilhant Blue R-250 e outro com “SilverQuest™ Silver Staining Kit” (figura 33). Como esperado, a prata mostrou-se muito mais sensível permitindo a visualização a partir de 10ng de BSA, enquanto que o coomassie permitiu a visualização a partir de 150ng de BSA. As bandas de BSA foram retiradas dos géis, processadas com o protocolo E e analisadas no espectrômetro de massa MALDI-ToF (Applied Biosystems) onde verificamos a incompatibilidade de identificação de proteínas corados com “SilverQuest™ Silver Staining Kit” devido a

existência de quantidade insuficiente de proteína para a sua subsequente identificação. Apesar desta técnica detectar quantidades mínimas de proteína, ela pode apresentar problema na identificação da proteína, ou seja, apesar do spot estar sendo bem visualizado no gel ocorre a existência de quantidade insuficiente de proteína para a sua subsequente identificação por espectrometria de massa e por isso continuamos nossos experimentos com o corante coomassie coloidal já que este se encontra bastante padronizado nas análises nos espectrômetros.

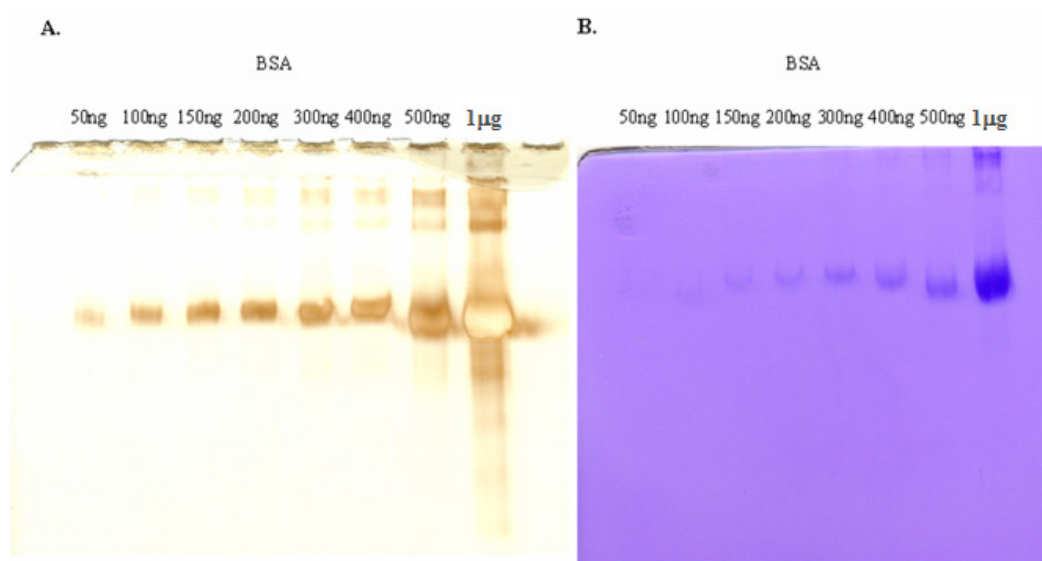


Figura 33: Gel 1D utilizando concentrações de 50, 100, 150, 200, 300, 400 e 500 ng e 1µg de BSA corado com (A) “SilverQuest™ Silver Staining Kit” ou com (B) Coomassie Brillant Blue R-250.

Considerando todas as técnicas de gel 2-D padronizadas, proteínas de veias safenas de 12 pacientes, cultivadas no sistema *ex vivo*, foram extraídas. Dois “pools” protéicos diferentes foram preparados cada um contendo 7.200µg de proteínas totais,

resultantes de 1.200 μ g de proteína de 6 pacientes distintos. Três experimentos de gel 2-D foram realizados utilizando: 1.200 μ g de proteína do “pool” 1 de pacientes em “IPG-Strip” de 24cm com faixa de pH 4-7 e 1.200 μ g de proteína do “pool” 2 de pacientes, em “IPG-Strip” de 24cm com faixa de pH 3-10 e 4-7. Após a segunda dimensão o gel foi corado com Coomassie Colloidal. Devido a dificuldade encontrada para análise das proteínas de gel 2-D por espectrometria de massa, decidimos enviar as amostras para uma “Proteomics Core Facility” no Instituto de Pesquisas Schepens Eye, Boston, MA. Os géis obtidos estão mostrados nas figuras 34 e 35 indicando as proteínas retiradas para análise. A apresentação dos dados encontra-se no corpo de resultados desta Tese.

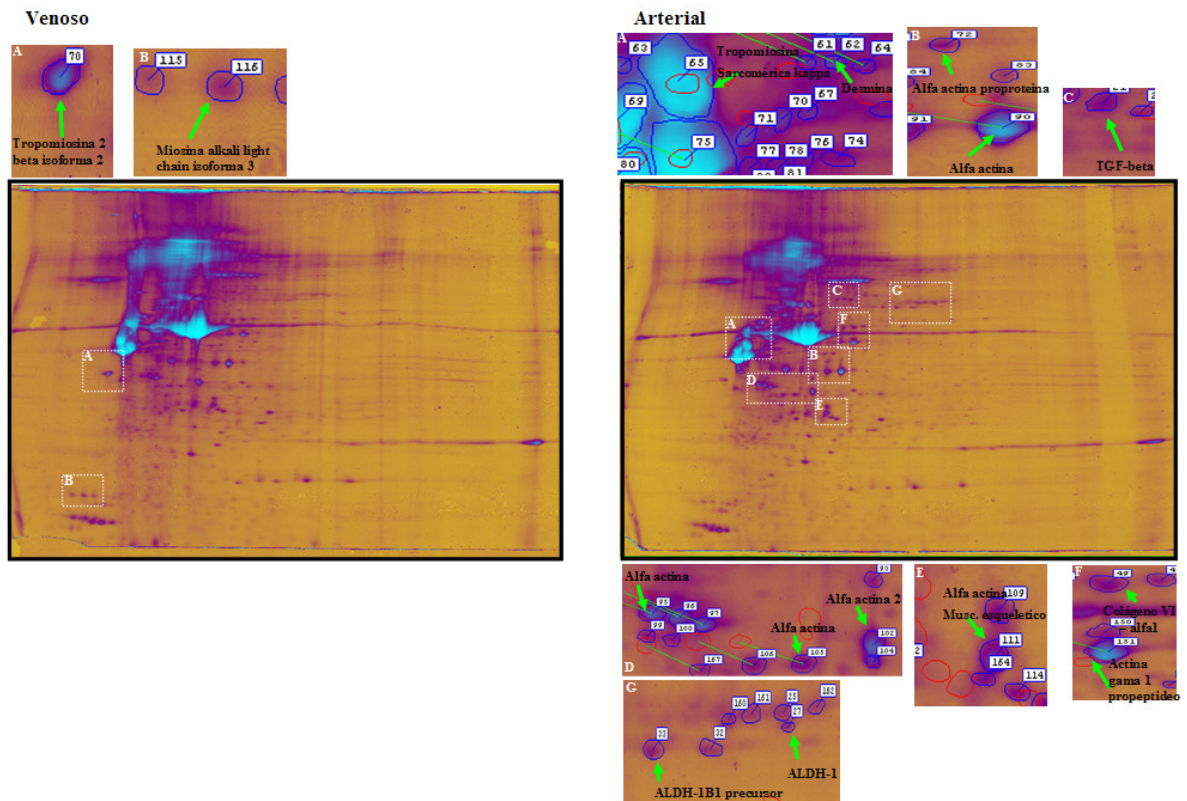


Figura 34: Gel 2D utilizando “IPG-strip” 24cm pH 3-10, corado com Coomassie Colloidal Blue, “Pool” 2 de veia safena cultivada em regime hemodinâmico venoso (5mL/min.) (esquerda) e arterial (50mL/min. - 80mmHg) (direita). As setas indicam proteínas que apresentaram diferença de expressão entre as duas condições de cultura de veia safena e foram isoladas e identificadas pela análise por espectrometria de massa.

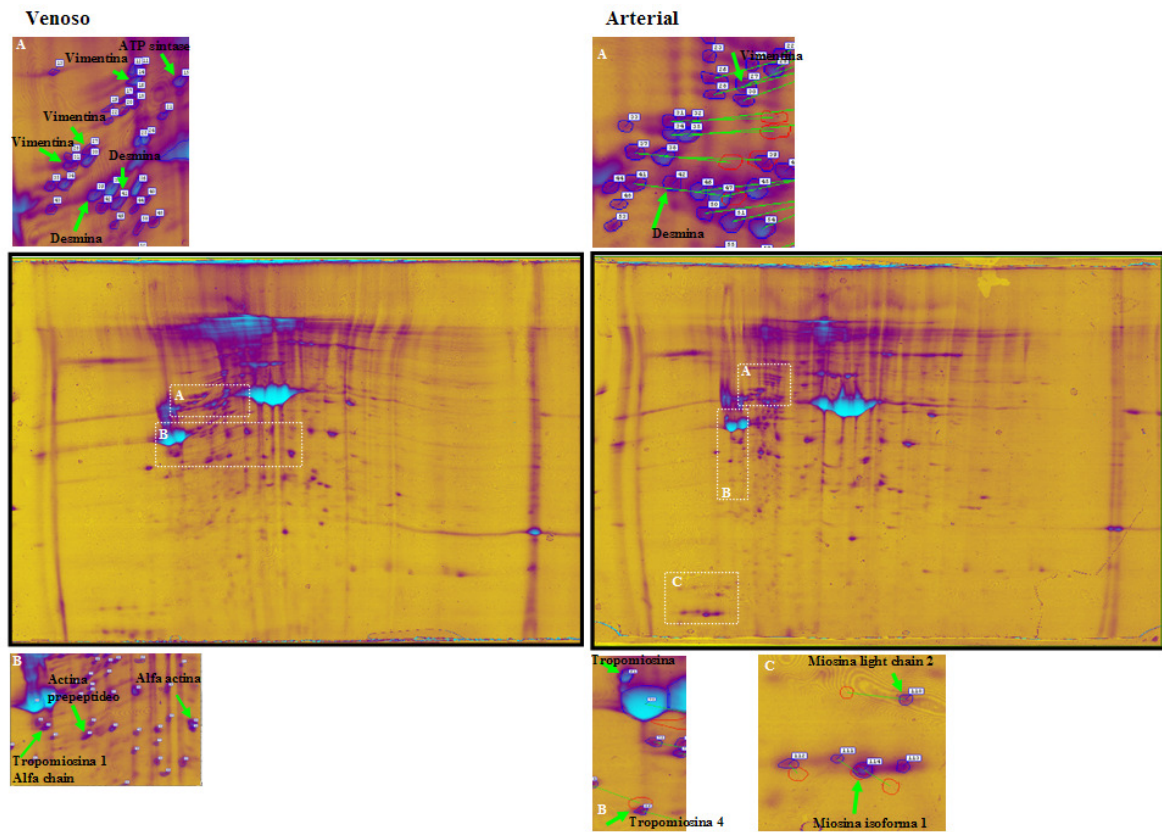


Figura 35: Gel 2D utilizando “IPG-strip” 24cm pH 4-7, corado com Coomassie Colloidal Blue, “Pool” 2 de veia safena cultivada em regime hemodinâmico venoso (5mL/min.) (esquerda) e arterial (50mL/min. - 80mmHg) (direita). As setas indicam proteínas que apresentaram diferença de expressão entre as duas condições de cultura de veia safena e foram isoladas e identificadas pela análise por espectrometria de massa.

A análise quantitativa da expressão protéica pode ser decisiva tanto em proteômica comparativa como na análise das vias de transdução e sinalização. A alternativa das análises quantitativas utilizando os métodos convencionais de espectrometria de massas é prejudicada pelo fato de que em qualquer uma das metodologias a eficiência na produção de íons é variável, pois depende da seqüência específica de cada peptídeo. Um método inovador que vem ganhando cada vez mais importância na análise quantitativa utiliza o LC-MS para análise de misturas marcadas com isótopos estáveis. O método envolve a combinação de amostras quimicamente idênticas, mas marcadas com padrões internos isotopicamente estáveis (por exemplo, usando 2H , 13C , 15N , etc.). Devido à eficiência de ionização ser altamente variável para diferentes peptídeos, o único padrão interno satisfatório para um peptídeo candidato é aquele mesmo peptídeo marcado com isótopos estáveis. A análise quantitativa de proteína é realizada quando uma mistura da proteína marcada isotopicamente (amostra de referência) é comparada com uma segunda amostra que contém as mesmas proteínas em abundâncias diferentes e marcadas com os isótopos estáveis mais pesados. Teoricamente, todos os peptídeos com seqüências idênticas das amostras combinadas encontram-se em pares, porém devido a marcação isotópica encontram-se com massas diferentes. Este pareamento deve-se ao fato dos peptídeos apresentarem as mesmas propriedades físico-químicas e por isso é esperado que eles se comportem de maneira idêntica quando isoladas, separadas e ionizadas. Desta forma, a razão das intensidades dos componentes de massas mais baixas e mais altas fornece uma medida precisa da abundância relativa dos peptídeos (e conseqüentemente da proteína) presentes nas misturas originais (Julka e cols., 2004, Niwayama e cols., 2001). Diferentes grupos têm relatado, independentemente,

a utilização da análise quantitativa de proteínas baseado na técnica de marcação com isótopos estáveis. As técnicas descritas por estes grupos diferem no método de incorporação do isótopo pesado e nos procedimentos analíticos utilizados (Adamczyk e cols., 1999, Goodlett e cols., 2000, Gronborg e cols., 2006, Guina e cols., 2003, Han e cols., 2001, De Leenheer e cols., 1992, Liang e cols., 2006, LiWang e cols., 2007). A seguir será discutida de forma sucinta a metodologia empregada para o desenvolvimento deste trabalho.

ICAT (do inglês: “isotope-coded affinity tags”)

O método de análise quantitativa de proteína baseado na marcação com ICAT foi descrito por Gygi e cols. 1999. Neste método, o reagente ICAT inicial utilizava como marcador isotópico o deutério ($2H$) sendo que o reagente leve não possuía o $2H$. As amostras controle e experimental são, separadamente, alquiladas utilizando as isoformas: leve e pesada do reagente, respectivamente (Sechi e cols., 1998, Sechi e cols., 2002). As amostras diferentemente codificadas (marcadas) são misturadas. Neste momento, qualquer técnica opcional de fracionamento pode ser utilizada para enriquecer proteínas presentes em baixa abundância ou para reduzir a complexidade da mistura, ao mesmo tempo em que as quantidades relativas são estritamente mantidas. Antes da análise, a mistura de proteína é digerida com tripsina, submetida a uma cromatografia de troca catiônica para remover reagente de ICAT não incorporados e, em seguida, os peptídeos etiquetados com biotina são selecionados em uma coluna monomérica de agarose-avidina (isto porque conforme descrito acima o reagente do ICAT contém a informação do isótopo estável como também uma “etiqueta” de biotina). Após a separação na coluna de avidina, os peptídeos

(com cisteína) isolados são então fracionados por cromatografia em coluna de fase reversa para a análise por LC-ESI-MS/MS. A relação das intensidades do íon “etiquetado” com ICAT co-eluído aos pares permitem a quantificação enquanto um subsequente MS/MS fornece a identificação da proteína (figura 3) (Smolka e cols., 2001, Von Haller e cols., 2003, Gygi e cols., 2002).

Os reagentes de ICAT comerciais iniciais eram compostos por etiquetas com ausência de átomos ^2H (D0) ou contendo 8 átomos ^2H (D8). Os problemas relacionados com este reagente estavam no fato de que as isoformas diferenciais dos peptídeos eram parcialmente resolvidas durante a cromatografia de fase-reversa, e na fragmentação da biotina utilizada para selecionar os peptídeos “etiquetados”. Isto comprometia a quantificação e prejudicando a interpretação dos espectros de MS/MS. Estes problemas foram resolvidos pela substituição do reagente inicial ^2H pelo reagente codificador ^{13}C , que eliminou o efeito cromatográfico do isótopo inicial, e a introdução de um sítio de clivagem ácida na seqüência entre a biotina e a iodoacetamida, o que permite a remoção da biotina antes da análise de MS/MS (Figura 2). O número de proteínas detectado com esta segunda geração foi bem maior do que as detectadas com a primeira geração do reagente, o que demonstra o sucesso desta nova técnica (Hansen e cols., 2003).

Metodologia

Para iniciar os testes de padronização e familiarização da nova técnica de análise proteômica, um primeiro teste foi realizado utilizando a Laminina que é um peptídeo simples que contém apenas 1 cisteína, com o propósito de testar a reação de marcação e as colunas de cátion e avidina. O espectro observado na figura 36 mostra

a presença de dois picos muito intensos de massa/carga (m/z) que correspondem, respectivamente, a biotina (1) e a Laminina (2). Este padrão era esperado, pois após a purificação do peptídeo em cromatografia de afinidade em coluna de avidina, a biotina que serviu para selecionar os peptídeos contendo cisteínas marcados com ICAT foi removida através de uma clivagem. Esta remoção, além de reduzir a massa total do reagente ICAT nos peptídeos, melhora a eficiência total de fragmentação dos mesmos.

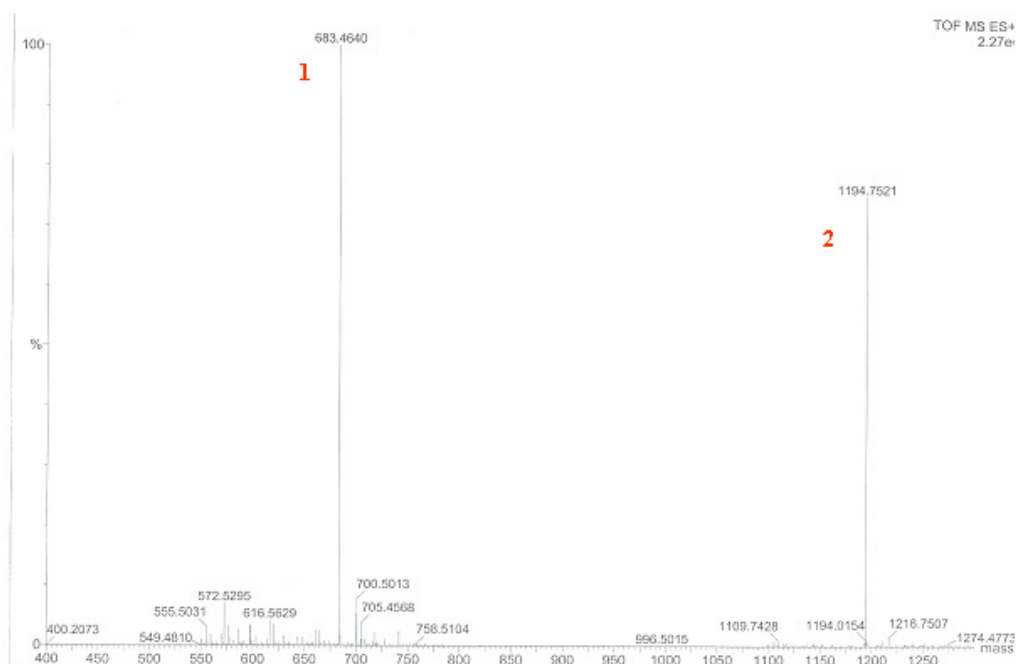


Figura 36: Peptídeo Laminina marcado com ICAT isotopicamente leve analisado pelo Q-ToF (Waters-Micromass) por LC/MS. Neste espectro observamos dois picos de massa/carga (m/z) que correspondem, respectivamente, a biotina (1) e a Laminina (2).

Um segundo teste realizado, de acordo com instruções do fabricante, foi a análise de uma proteína conhecida e bem caracterizada (25 μ g de BSA) que contém múltiplas cisteínas. Este teste serviu para qualificar o protocolo com uma amostra mais complexa do que o peptídeo Laminina e verificar a utilização do protocolo quantitativo através de misturas marcadas com ICAT nas proporções 1:1 (Leve: Pesado) e 1:2 (Leve: Pesado). Na Figura 37 podemos observar (A) o cromatograma da amostra de BSA marcado com ICAT nas proporções 1:1 (Leve: Pesado), (B) o espectro de um peptídeo marcado com o par de ICAT 1:1 (leve:pesado) e (C) a exemplificação da análise do padrão isotópico deste peptídeo e a obtenção das informações necessárias para a análise do experimento ICAT.

Na natureza geralmente é encontrado o C_{12} e o C_{13} , fazendo com que picos de um mesmo peptídeo possa ser observado no espectro com diferença de massa de 1 Da. Observando o peptídeo em questão verifica-se que a sua diferença isotópica (m/z) é 0,3, ou seja a diferença entre os valores de m/z é 0,3 (figura 37B). Como a diferença de massa entre os picos é sempre 1 Da, a carga do peptídeo que está sendo analisado é +3 (figura 37C). Verifica-se também que a distância entre os peptídeos marcados com reagente leve e pesado é de $3m/z$, como a carga do peptídeo é 3+ conclui-se que há a presença de apenas uma cisteína marcada pois a diferença de massa entre os dois peptídeos é 9Da (ver exemplo na figura 37C e na Tabela 12). As áreas dos picos dos peptídeos marcados com reagente leve e pesado foram calculadas pelo programa ProteinLynx 2.0 - Waters, e apresentaram valores bastante semelhantes entre si. Isto mostra a eficiência de quantificação dos peptídeos uma vez que a uma mesma quantidade de BSA foi marcado com o par de ICAT. Na figura 38 pode-se observar mais um exemplo da amostra de BSA marcado com ICAT na proporção 1:1 (Leve: Pesado), onde está sendo mostrado (A) o espectro de um peptídeo marcado com o par de ICAT e (B) a exemplificação da análise do padrão isotópico deste peptídeo e a obtenção das informações necessárias para a análise do experimento ICAT. Assim como o peptídeo analisado anteriormente (figura 37) a sua diferença isotópica (m/z) é 0,3, e desta maneira a sua carga é +3. Porém, neste caso a distância entre os peptídeos marcados com reagente leve e pesado é de $6m/z$, e como a carga do peptídeo é 3+, conclui-se que há a presença de duas cisteínas marcadas pois a diferença de massa entre os dois peptídeos é 18Da (ver exemplo na figura 38B e na Tabela 12). As áreas dos picos dos peptídeos marcados com reagente leve e

pesado foram calculadas pelo programa ProteinLynx 2.0 - Waters, e também apresentaram valores bastante semelhantes entre si.

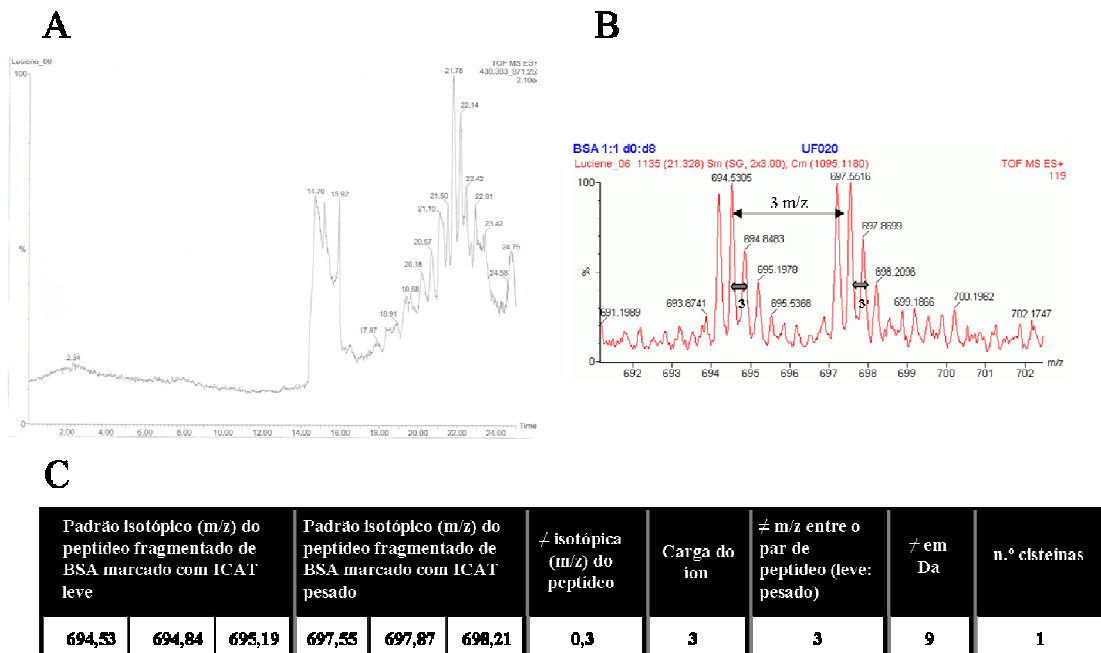
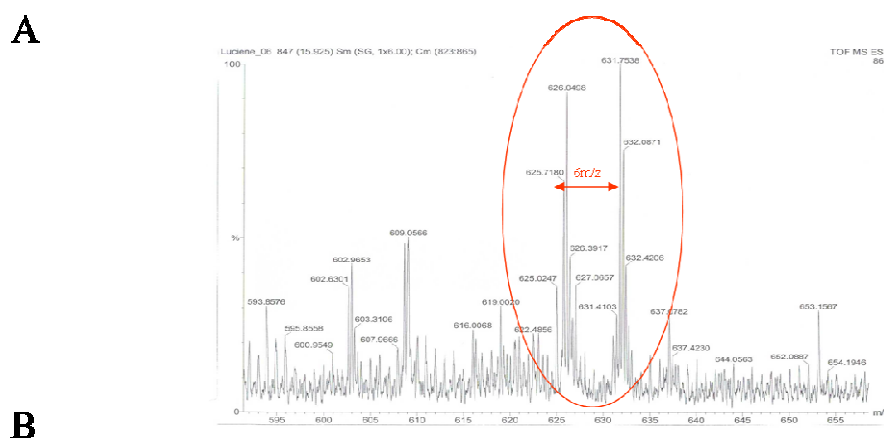


Figura 37: Cromatograma da amostra de BSA marcado com ICAT nas proporções 1:1 (Leve: Pesado), analisado pelo Q-ToF (Waters-Micromass) por LC/MS (A), espectro de um peptídeo marcado com o par de ICAT (B), e exemplificação da análise do par de peptídeo (marcado com reagente leve e pesado) quanto seu padrão isotópico (C). Os picos dos peptídeos marcados com reagente leve e pesado possuem a mesma área mostrando que estão presentes em mesma quantidade.

Tabela 12. Análise de experimento ICAT. Relação entre a diferença isotópica de um peptídeo para determinar sua carga e a diferença de m/z entre o par de peptídeo marcado com reagente leve e pesado mostra o seu n.º de cisteínas.

≠ isotópica do peptídeo	Íon Carga	≠ m/z entre o par de peptídeo	≠ em Da	n.º cisteínas
0,5	2	4,5	9	1
0,3	3	3	9	1
0,25	4	2,25	9	1
0,5	2	9	18	2
0,3	3	6	18	2
0,25	4	4,5	18	2



Padrão isotópico (m/z) do peptídeo fragmentado de BSA marcado com ICAT leve			Padrão isotópico (m/z) do peptídeo fragmentado de BSA marcado com ICAT pesado			≠ isotópica (m/z) do peptídeo	Carga do ion	≠ m/z entre o par de peptídeo (leve: pesado)	≠ em Da	n.º cisteínas
625,71	626,04	626,39	631,75	632,08	632,42	0,3	3	6	18	2

Figura 38: (A) Espectro da amostra de BSA marcado com ICAT nas proporções 1:1 (Leve: Pesado), analisado pelo Q-ToF (Waters-Micromass) por LC/MS. Observamos na região circundada um peptídeo marcado com o par de ICAT e (B) exemplificação da análise do par de peptídeo (marcado com reagente leve e pesado) quanto seu padrão isotópico. Os pico dos peptídeos marcados com reagente leve e pesado possuem a mesma área mostrando que estão presentes em mesma quantidade.

Em seguida foi analisado uma amostra de BSA marcado com ICAT nas proporções 1:2 (Leve: Pesado) (figuras 39 e 40). Na figura 40 (A), a região circundada exemplifica um par de peptídeo marcado com o par ICAT lado a lado e (B) a exemplificação da análise do padrão isotópico deste peptídeo e a obtenção das informações necessárias para a análise do experimento ICAT. Note que a diferença isotópica é 0,3 e distância m/z do par peptídico é 3. Isto indica que a carga do peptídeo é +3 e uma diferença de massa entre o par é 9 Da, ou seja, presença de apenas uma cisteína. Observa-se ainda que os pares de peptídeos apresentam picos com tamanhos diferentes, sendo um com o dobro da área do outro. Esta relação era esperada, uma vez que a marcação do BSA com ICAT leve foi realizada em quantidade duas vezes menor em relação ao marcado com ICAT pesado. Esta última análise mostrou a eficiência de marcação e quantificação da metodologia ICAT para análise proteômica diferencial.

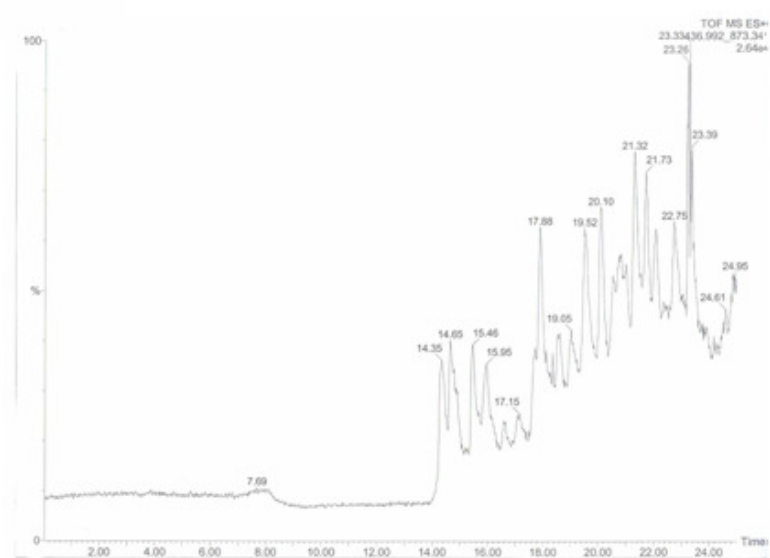
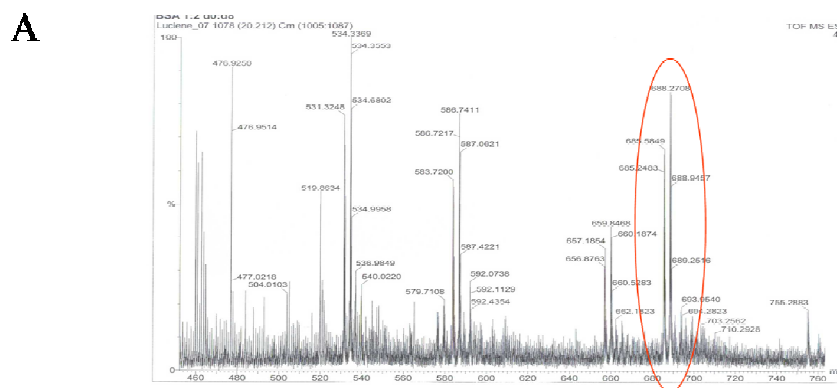


Figura 39: Cromatograma da amostra de BSA marcado com ICAT nas proporções 1:2 (Leve: Pesado), analisado pelo Q-ToF (Waters-Micromass) por LC/MS.



B

Padrão Isotópico (m/z) do peptídeo fragmentado de BSA marcado com ICAT leve			Padrão Isotópico (m/z) do peptídeo fragmentado de BSA marcado com ICAT pesado			≠ Isotópica (m/z) do peptídeo	Carga do ion	≠ m/z entre o par de peptídeo (leve: pesado)	≠ em Da	n.º cisteínas
685,58	685,24	685,57	688,27	688,60	688,94	0,3	3	3	9	1

Figura 40: (A) Espectro da amostra de BSA marcado com ICAT nas proporções 1:2 (Leve: Pesado), analisado pelo Q-ToF (Waters-Micromass) por LC/MS. Observamos na região circundada um peptídeo marcado com o par de ICAT e (B) exemplificação da análise do par de peptídeo (marcado com reagente leve e pesado) quanto seu padrão isotópico. Os picos dos peptídeos marcados com reagente leve possui área duas vezes menor do que a área dos picos dos peptídeos marcados com reagente pesado.

Desta maneira, o passo seguinte foi verificar a complexidade da amostra de veia safena que foi utilizada no experimento. Amostras altamente complexa podem não apresentar resultados satisfatórios, havendo a necessidade da utilização de técnica de fracionamento durante a cromatografia líquida em coluna de troca iônica, para obter amostras individuais contendo um número menor de peptídeos e melhorar a sensibilidade da análise de espectrometria de massa. Portanto, foi realizada uma digestão em solução, com tripsina, de 500µg de extrato protéico de veia safena e a sua complexidade foi analisada no Q-ToF (Waters-Micromass) por LC/MS. Os resultados estão apresentados na Figura 41, onde pode ser observado o

cromatograma da amostra de veia safena (A) e seu espectro (B). Apesar da presença de muitos peptídeos, que correspondem aos picos multicarregados, há uma boa visualização destes peptídeos dentro do espectro, o que torna desnecessário o fracionamento da amostra.

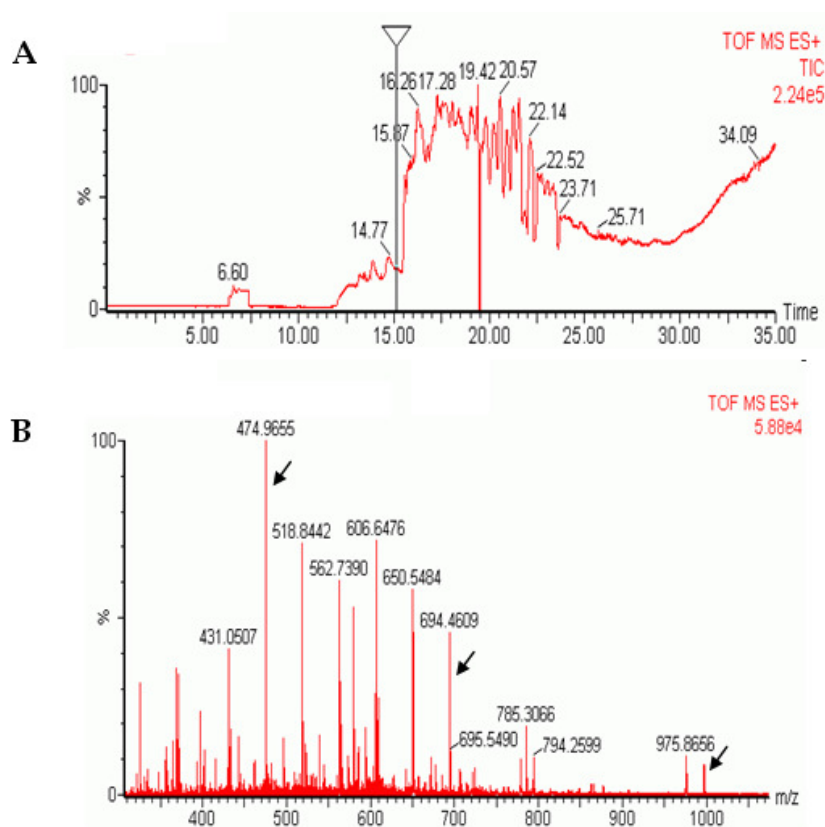


Figura 41: Cromatograma da amostra de veia safena (A) e seu espectro (B) analisado pelo Q-ToF (Waters-Micromass) por LC/MS. Note a presença de grande quantidade de peptídeos apresentando picos multicarregados (como nos exemplos indicados pelas setas), e a boa visualização desses peptídeos dentro do espectro.

Com a metodologia experimental padronizada, foi realizado um experimento com 150 μg de proteínas (25 μg de proteína de 6 pacientes) de veias safenas cultivadas em regime venoso e arterial que foram marcadas com ICAT isotopicamente leve (C_{12}) e pesado (C_{13}), respectivamente. Para determinar o tempo

de migração total da amostra foi necessário a análise pelo Q-ToF (Waters-Micromass) em tempos variados entre 30 - 120 minutos, para obtenção de gradiente de eluição dos peptídeos com espectros satisfatórios. Os resultados desta padronização estão representados na figura 42 onde pode-se notar que após 80 minutos de migração, a intensidade de fragmentação de peptídeos ainda apresenta-se elevada, sugerindo ainda a existência de material para ser analisado.

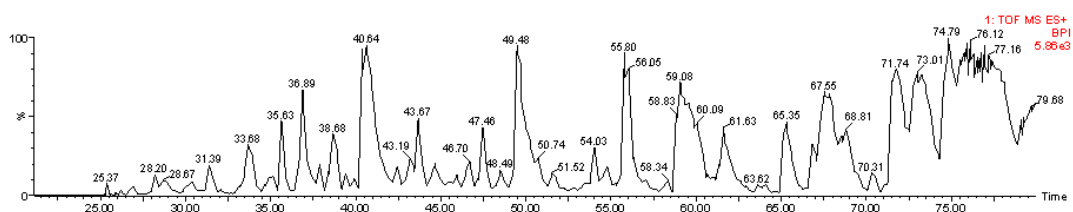


Figura 42: Cromatograma obtido pela análise no Q-ToF (Waters-Micromass) por LC/MS de amostras de veia safena cultivadas em regime venoso e arterial marcadas com ICAT isotopicamente leve e pesado, respectivamente. Após 80 minutos de corrida, a intensidade de fragmentação de peptídeos ainda apresenta-se elevada (seta 1 valor da intensidade e seta 2 intensidade no cromatograma), o que indica a necessidade de tempo maior de corrida para análise completa da amostra.

Os tempos subsequentes foram testados mostrando uma maior eficiência de análise para o tempo de 120 minutos de migração.



Espectrometria de Massa

As aplicações da espectrometria de massas para o estudo das biomoléculas se iniciaram no final da década de 80 do século XX. Na década de 90 aumentou-se o uso da espectrometria de massa aplicada à biologia e esta vêm tendo um papel cada vez mais significativo nas ciências biológicas (Pandey e cols., 2000, Pasa-Tolic e cols., 1999, Ross e cols., 2004). Entre as técnicas analíticas, a espectrometria de massa (MS) consiste em uma técnica de separação sofisticada capaz de medir com alta sensibilidade a massa e a propriedade intrínseca de uma molécula (Gygi e cols., 2000, le Coutre e cols., 2000, Link e cols., 1999, Mann e cols., 2001, Nyman e cols., 2001, Oda e cols., 2003). Os últimos anos acompanharam grandes melhorias na instrumentação dos espectrômetros de massa. Eles possuem pelo menos três componentes: um dispositivo de ionização, um separador de massa, e um detector. O dispositivo de ionização pode ser do tipo MALDI (dessorção de íons em matriz induzida por laser) ou ESI (ionização por eletrodispersão), e ambos possibilitam a ionização de moléculas no estado gasoso. Três princípios diferentes podem ser aplicados para conseguir a separação da massa: separação baseada no tempo de voo das partículas (TOF MS), separação através de campos elétricos quadrupolos gerado por hastes de metais (Q MS), ou separação por expulsão seletiva de íons aprisionados sob o efeito de um campo elétrico tridimensional (armadilha de íons MS). Para a análise estrutural, como por exemplo seqüenciamento de peptídeos, duas etapas de MS são executadas sucessivamente e este processo é denominado MS seqüencial ou MS/MS. Pode-se empregar duas vezes o mesmo princípio de separação, ou combinar dois princípios diferentes de separação de MS. Tanto o MALDI como o ESI pode

acoplar qualquer um dos três métodos de separação citados acima, onde o MALDI produz estouros curtos de íons no vácuo e o ESI produz um feixe contínuo de íons na atmosfera. Tipicamente o MALDI é o acoplamento duplo de TOF MS enquanto que o ESI é acoplado com Q MS e armadilhas de íon MS. A seguir serão discutidas os equipamentos utilizados neste trabalho e as duas formas de MS mais utilizadas associadas a proteômica: MALDI-TOF e ESI-Q-TOF.

1. LC-ESI-Q-TOF

O espectrômetro de massa híbrido - quadrupolo e tempo de voo - de aceleração ortogonal, ou simplesmente Q-TOF Ultima (Waters-Micromass) consiste em um aparelho integrado de cromatografia líquida (LC) e espectrometria de massa (MS), baseado em ionização elétrica por “electrospray”.

A cromatografia tem como objetivo separar, fracionar as proteínas contidas em amostras complexas (contendo diversas proteínas) (Neverova e cols., 2005). O processo de cromatografia consiste em uma matriz porosa e sólida que vai interagir com uma solução complexa de proteínas. O processo de retenção e separação das proteínas por cromatografia vai depender do tipo de matriz utilizada, que são baseadas nas características físico químicas das proteínas. Desta forma temos matrizes que vão separar as proteínas de acordo com sua carga (cromatografia de troca-iônica), hidrofobicidade (cromatografia de fase-reversa), tamanho (cromatografia de gel-filtração), ou habilidade de interagir com determinadas partículas ou moléculas (cromatografia de afinidade). Após a digestão proteolítica de amostras complexas de proteína, há um grande número de peptídeos (milhares) que excedem a capacidade da maioria das colunas. Assim, têm-se empregado técnicas de

separação multidimensional para diminuir a complexidade e aumentar a resolução do procedimento. Por exemplo, cromatografia líquida bidimensional (2-D LC), que utiliza uma combinação de duas colunas com diferentes propriedades de retenção. Como as amostras são, em seguida, resolvidas por espectrometria de massa, a segunda dimensão é preferencialmente a cromatografia de fase-reversa, pois as amostras são eluídas em condições mais apropriadas para a espectrometria. Geralmente a primeira separação cromatográfica é a de troca iônica ou exclusão por tamanho.

A ionização por eletrodispersão (ESI) foi desenvolvida por Fenn e cols. no final da década de 80. Neste tipo de análise, os íons são formados a partir de uma fase líquida. A amostra é bombeada lentamente utilizando um fluxo constante, na ordem de um microlitro-por-minuto, através de uma agulha hipodérmica, para uma câmara submetida à alta voltagem (1000 a 5000 volts). Nesta câmara, o líquido introduzido é vaporizado eletrostaticamente, produzindo uma nuvem de pequenas gotas altamente carregadas (“spray”). Este processo de ionização ocorre em ambiente atmosférico sendo então um processo muito suave (sem fragmentação de íons na fase gasosa) (Figura 43A). Desta forma, as moléculas são transferidas para o espectrômetro de massa com alta eficiência para análise. Uma gama extensiva de combinações pode ser analisada por ESI-MS; a única exigência é que a molécula seja suficientemente polar para permitir o ganho de uma carga.

O modo de infusão no ESI é tipicamente feito por nanoeletrodispersão, e freqüentemente acoplado à cromatografia líquida de alto desempenho, por isto recebe o nome de nano-LC-ESI-MS. No modo de infusão, a amostra é introduzida por uma válvula de injeção em um fluxo líquido contínuo da ordem de nanolitros por minuto.

A amostra deve estar substancialmente livre de sal e detergente e por isto é purificada em uma coluna de fase reversa antes de passar para a válvula injetora. Assim, a limpeza, separação e concentração da amostra são obtidas dentro de uma única etapa. Em geral, o ESI é freqüentemente acoplado ao Q MS, que é uma radiofrequência sobreposta a um campo elétrico, gerados por quatro hastes posicionadas paralelamente ao tubo analisador. Dependendo da amplitude do campo aplicado, somente alguns íons com determinada razão m/z atravessam a câmara, sendo os demais desviados da trajetória que conduz ao detector (Figura 43B).

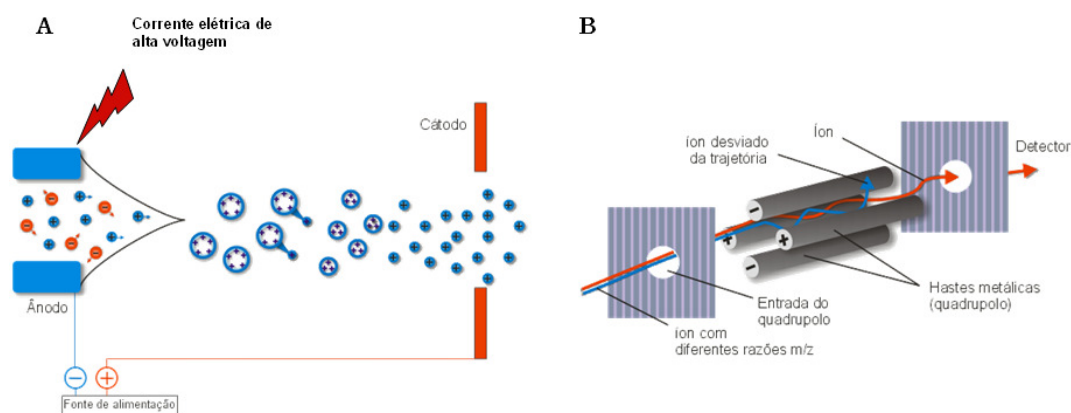


Figura 43: (A) esquema de uma ionização por eletrodispersão (ESI), onde uma alta voltagem (de carga +) é aplicada na ponta do capilar metálico por onde passa amostra que será analisada. Os ânions são neutralizados e há um acúmulo de cátions na ponta do capilar. Essas cargas positivas se repelem formando gotículas multicarregadas que entram em uma região aquecida e de alto vácuo dentro do espectrômetro de massa. O solvente evapora e somente os cátions na fase gasosa ficam livres no vácuo. (B) Exemplo de um filtro de massa quadrupolo, onde somente íons com determinada m/z carga conseguem alcançar o detector, íons diferentes desviam a trajetória, colidem com as barras e se neutralizam.

No ESI-Q-TOF o seqüenciamento de peptídeos submetidos ao ESI ocorre em três etapas: na primeira etapa, um peptídeo é selecionado usando um analisador quadrupolo (Q MS); na segunda é parcialmente confinado e fragmentado através da

introdução de um gás inerte (argônio ou nitrogênio); e na terceira etapa, os produtos resultantes da fragmentação são ejetados do tubo de vôo mantido em alto vácuo (TOF MS). Esta estratégia de selecionar e analisar os resultados da fragmentação em uma combinação sucessiva de medidas de massa em um único equipamento (MS/MS) permite o seqüenciamento das cadeias peptídicas (Gatlin e cols., 2000). Devido às baixas energias envolvidas, a colisão de um peptídeo pré-selecionado com um gás inerte leva à sua fragmentação seletiva, rompendo, em geral, uma única ligação covalente do esqueleto polipeptídico, sendo rara a fragmentação das cadeias laterais (Figura 44). Para cada peptídeo selecionado, tem-se então após a colisão um espectro completo de fragmentos contendo as partes C e N terminais correspondentes a cada ligação rompida. O uso de métodos computacionais conjuntamente com os dados disponíveis em bancos protéicos possibilita a análise dos espectros com alto grau de confiabilidade para determinar a seqüência peptídica.

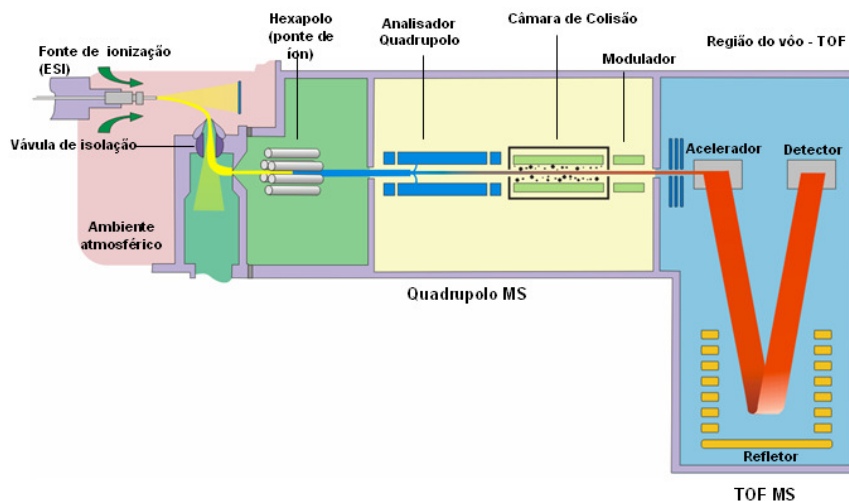


Figura 44: esquema de um equipamento ESI-Q-TOF. Os íons são produzidos por eletrodispersão em um ambiente atmosférico. Após o processo de ionização, os íons são conduzidos a um ambiente de alto vácuo através de um orifício. Os peptídeos são selecionados pelo analisador quadrupolo e fragmentados na câmara de colisão. Os fragmentos são, então, introduzidos no analisador de tempo de voo.

2. MALDI-TOF

Os aparelhos, 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems), prO-TOF 2000 MALDI-TOF MS (PerkinElmer) e Ettan MALDI-ToF/Pro (GE healthcare), são baseados na ionização por MALDI-TOF (“*matrix assisted laser desorption ionization time of flight*”).

A técnica de dessorção de íons induzida por laser (MALDI – do inglês: *matrix-assisted laser desorption/ionization*) foi desenvolvida por Karas e Hillenkamp na década de 80. Consiste na co-precipitação da molécula que será analisada com uma matriz seca, cristalina e orgânica, que ajuda na ionização e dessorção dos íons

presentes na amostra (Figura 45A). Esta combinação é aplicada na superfície de uma placa metálica e submetida ao bombardeamento por pulsos de laser, de duração de nanossegundos. Após o bombardeamento, os peptídeos da amostra são ionizados e volatilizados, gerando um gás de moléculas de alto peso molecular, eletricamente carregadas e intactas. Estes íons são acelerados a uma quantidade fixa de energia cinética e são lançados para dentro do tubo de vôo, mantido em alto vácuo, percorrendo uma trajetória até atingir o detector (Gehanne e cols., 2002). Os íons pequenos têm uma velocidade mais elevada e são registrados em um detector antes dos maiores, produzindo o espectro do tempo de vôo (TOF) (Figura 45B).

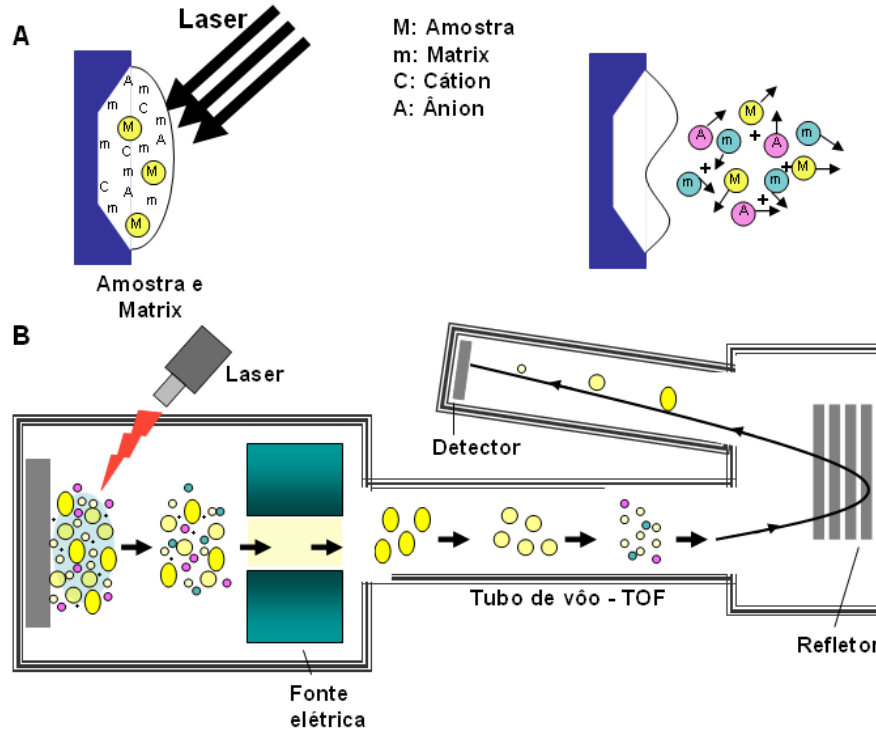


Figura 45: (A) Esquema de ionização do tipo MALDI. As moléculas da amostra são co-precipitadas matriz que ajuda na ionização e dessorção dos íons presentes na amostra. Esta combinação é aplicada na superfície de uma placa metálica e submetida ao bombardeamento por pulsos de laser, de duração de nanossegundos. Os íons a serem analisados são extraídos da matriz com um pulso de laser. (B) Esquema de funcionamento de um equipamento MALDI-TOF. Os íons a serem analisados são extraídos da matriz com um pulso de laser. Após o bombardeamento, os peptídeos da amostra são ionizados e volatilizados, gerando um gás de moléculas de alto peso molecular, eletricamente carregadas e intactas. Estes íons são acelerados a uma quantidade fixa de energia cinética e são lançados para dentro do tubo de voo, mantido em alto vácuo, e percorrem uma trajetória até atingir o detector. Os íons pequenos têm uma velocidade mais elevada e são registrados em um detector antes dos maiores, produzindo o espectro do tempo de voo.

A matriz é constituída tipicamente por pequenas moléculas orgânicas que absorvem o laser no comprimento de onda utilizado. Os materiais mais utilizados no

estudo das biomoléculas são o ácido alfa-ciano-4-hidroxinâmico e o ácido diidrobencóico (DHB). As matrizes diferem na quantidade de energia que podem transferir para a biomolécula durante os processos de ionização e dessorção, e portanto interferir na fragmentação e no grau de danos provocados à molécula analisada.

A alta resolução e o processamento atingido pela combinação da técnica MALDI-TOF faz deste instrumento um dos mais importantes na identificação de proteínas pelo método de impressão digital por massa de peptídeos (PMF – *peptide mass fingerprinting*). Neste método, a digestão de uma proteína com enzimas proteolíticas que reconhecem seqüências específicas gera um espectro de massas dos peptídeos característico para esta proteína, possibilitando sua identificação em bancos de dados específicos. Diversos pacotes de software estão disponíveis para comparar a impressão digital de massas experimentais com a impressão digital de massas teóricas de proteínas depositadas em bancos de dados públicos. A comparação do espectro com os espectros depositados em bancos de dados leva a identificação da proteína em estudo. As desvantagens do PMF são que a seqüência da proteína deve ser conhecida e que mudanças na massa de uma proteína específica (por exemplo, modificações pós-traducionais) podem prejudicar a sua identificação.

Quando a identificação por PMF é inconclusiva, a informação estrutural dos peptídeos é suficiente para permitir a identificação da proteína. Isto pode ser obtido pela fragmentação seqüencial no espectrômetro de massa (MS/MS). Em MS/MS, um peptídeo ionizado com um valor específico de m/z é selecionado, colidido com as moléculas do gás inerte e os íons do fragmento que resultam destas colisões são detectados após a passagem através de um segundo analisador de massa. Este

processo produz os íons do fragmento que são representativos para a seqüência de aminoácidos do peptídeo, permitindo a determinação de uma parcela da seqüência do peptídeo usada para a identificação no banco de dados.

Métodos

1. Q-TOF

A amostra foi injetada no espectrômetro de massa Q-ToF (Waters-Micromass) com um fluxo de 0,5µl/min., separada por cromatografia de fase-reversa, onde os peptídeos são separados de acordo com sua hidrofobicidade, utilizando um gradiente de acetonitrila de 0% à 70% por um período de 120 minutos.

2. MALDI-TOF

A amostra misturada com a uma matriz inorgânica solubilizada em um solvente bifásico foi aplicada em uma placa de metal e, após a evaporação do solvente, as moléculas da amostra cristalizaram junto com a matriz. Esses cristais foram então bombardeados por um feixe de raio laser para promover a ionização das moléculas posterior identificação.

Uma alíquota de 0,6 µL do produto da digestão trípica foi colocado sobre uma lâmina (Figura 46) e acrescido de 0,3 µL de 5 mg/mL alpha-cyano-4-hydroxy Cinnamic Acid (ACH). As amostras foram então analisadas no espectrômetro de massa MALDI-ToF. As identificações das proteínas foram realizadas utilizando a técnica “Peptide Mass Fingerprint” (PMF), ou seja, impressão digital de peptídeos. O resultado obtido foi uma lista de valores que correspondem à massa/carga (m/z) de cada peptídeo presente na amostra. Como no método de ionização utilizado os

peptídeos recebem um único íon H^+ , portanto podemos considerar os valores obtidos como o peso molecular de cada fragmento acrescido de um íon H^+ . A lista de pesos moleculares dos peptídeos obtidos para cada proteína digerida com tripsina é característica única de cada proteína, o que permite sua identificação. Esta análise foi realizada por comparação dos valores de PMF das amostras de gel 2-D com valores de PMF resultantes da digestão teórica de uma série de proteínas que estão depositadas no banco de dados, SwissProt. Para tal utilizamos a ferramenta Mascot disponível na internet (www.matrixscience.com).

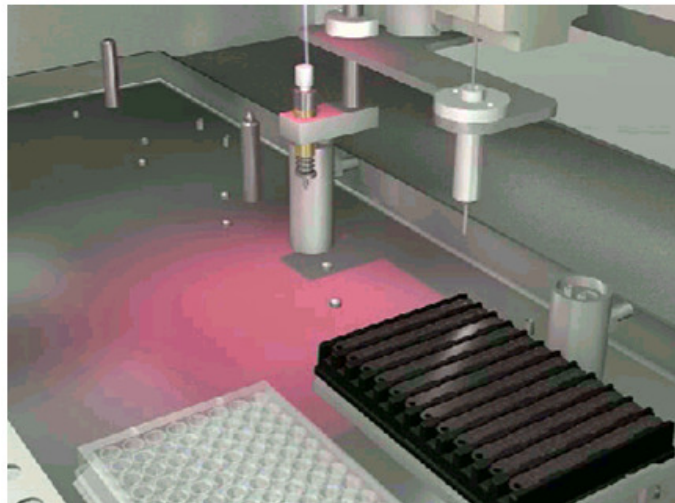


Figura 46: Sistema robotizado aplicando a matriz e as amostras que foram digeridas com tripsina na lâmina que será lida pelo MALDI-ToF.

A utilização dos equipamentos com diferentes tipos de ionização (ESI ou MALDI) podem ajudar na identificação de diferentes peptídeos, visto que alguns possuem propriedades individuais, como por exemplo, facilidade de fragmentação

quando ionizado junto com a matriz inorgânica do que quando ionizados eletricamente ou vice versa.

Referências Bibliográficas - Anexos

Referências Bibliográficas – Anexos

Adamczyk, N.; Gebler, J. C.; Wu, J. A simple method to identify cysteine residues by isotopic labeling and ion trap mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 1999, 13, 1813-817

De Leenheer AP, Thienpont LM. Application of isotope dilution mass spectrometry in clinical chemistry, pharmacokinetics, and toxicology. *Mass spectrom Rev* 1992, 11:249-307

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* 1989; 6;246(4926):64-71. Review.

Gatlin CL, Eng JK, Cross ST, Detter JC, Yates JR 3rd. Automated identification of amino acid sequence variations in proteins by HPLC/microspray tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2000; 15;72(4):757-63.

Gehanne, S.; Cecconi, D.; Carboni, L.; Righetti, P. G.; Domenici.E.; Hamdan, M. Quantitative analysis of two-dimensional gel-separated proteins using isotopically marked alkylating agents and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002; 16, 1692-1698.

Goodlett, D. R.; Bruce, J. E. Anderson, G. A. Rist, B.; Pasa-Tolic, L.; Fiehn, O.; Smith, R. D.; Aebersold, R. Protein identification with a single accurate mass of a cysteine-containing peptide and constrained database searching. *Anal. Chem.* 2000, 72,1112-1118.

Gronborg M, Kristiansen TZ, Iwahori A, Chang R, Reddy R, Sato N, Molina H, Jensen ON, Hruban RH, Goggins MG, Maitra A, Pandey A. Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach. *Mol Cell Proteomics*. 2006;5(1):157-71

Guina, T.; Purvine, S. O.; Yi, E. C.; Eng, J.; Goodlett, D. R.; Aebersold, R.; Miller, S. I. Quantitative proteomic analysis indicates increased synthesis of a quinolone by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003, 100,2771-2776.

Gygi SP, Aebersold R. Mass spectrometry and proteomics. *Chemical Biology* 2000, 4:489–494

Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*. 1999;17(10):994-9.

Gygi, S. P.; Rist, B.; Griffin, T. J.; Eng, J.; Aebersold, R. J. Proteome analysis of low-abundance proteins using multidimensional chromatography and isotope-coded affinity tags. *J Proteome Res*. 2002;1(1):47-54. *Proteome Res*. 2002, 1, 47-54.

Han, D. K.; Eng, J.; Zhou, H.; Aebersold, Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *R. Nat. Biotechnol*. 2001,19, 946-951.

Hansen, K. C.; Schmitt-Ulms, G.; Chalkley, R.; Hirsch, J.; Baldwin, M. A.; Burlingame, A. L. Mass spectrometric analysis of protein mixtures at low

levels using cleavable ¹³C-isotope-coded affinity tag and multidimensional chromatography. *Mol. Cell Proteomics* 2003, 2, 299-314.

Julka S.; and Regnier F. Quantification in Proteomics through Stable Isotope Coding: A Review. *J Proteome Res.* 2004;3(3):350-63.

Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 1988; 15;60(20):2299-301.

le Coutre J, Whitelegge JP, Gross A, Turk E, Wright EM, Kaback HR, Faull KF. Proteomics on full-length membrane proteins using mass spectrometry. *Biochemistry.* 2000; 18;39(15):4237-42.

Liang X, Zhao J, Hajivandi M, Wu R, Tao J, Amshey JW, Pope RM. Quantification of membrane and membrane-bound proteins in normal and malignant breast cancer cells isolated from the same patient with primary breast carcinoma. *J Proteome Res.* 2006; 5(10):2632-41.

Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, Garvik BM, Yates JR 3rd. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 1999;17(7):676-82.

LiWang X, Fu A, Raghavakaimal S and Lee HC. Proteomic analysis of vascular endothelial cells in response to laminar shear stress. *Proteomics* 2007, 7, 588–596

Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:437-73.

- Neverova I, Van Eyk JE. Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005, 5;815(1-2):51-63.
- Niwayama, S.; Kurono, S.; Matsumoto, H. Synthesis of d-labeled N-alkylmaleimides and application to quantitative peptide analysis by isotope differential mass spectrometry. *Bioorg. Med. Chem Lett.* 2001; 11, 2257-2261.
- Nyman TA. The role of mass spectrometry in proteome studies. *Biomol Eng.* 2001;18(5):221-7.
- Oda, Y.; Owa, T.; Sato, T.; Boucher, B.; Daniels, S.; Yamanaka, H.; Shinohara, Y.; Yokoi, A.; Kuromitsu, J.; Nagasu, T. Quantitative chemical proteomics for identifying candidate drug targets. *Anal. Chem.* 2003, 75, 2159-2165.
- Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature.* 2000; 15;405(6788):837-46.
- Pasa-Tolic L, Jensen PK, Anderson GA, Lipton MS, Peden KK, Martinovic S, Tolic N, Bruce JE, Smith RD. High throughput proteome wide precision measurements of protein expression using mass spectrometry. *J Am Chem Soc.* 1999; 121:7949-7950
- Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B. et al., *Mol. Cell. Proteomics* 2004; 3, 1154–1169.
- Sechi S, Chait BT. Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. *Anal Chem.* 1998; 15;70(24):5150-8

- Sechi, S. A method to identify and simultaneously determine the relative quantities of proteins isolated by gel electrophoresis. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 2002; 16, 1416-1424.
- Smolka, M. B.; Zhou, H.; Purkayastha, S.; Aebersold, R. Optimization of the isotope-coded affinity tag-labeling procedure for quantitative proteome analysis. *Anal. Biochem.* 2001; 297, 25-31.
- Von Haller, P. D.; Yi, E.; Donohoe, S.; Vaughn, K.; Keller, A.; Nesvizhskii, A.I.; Eng, J.; Li, X.-J.; Goodlett, D. R.; Aebersold, R.; Watts, J. D. The application of new software tools to quantitative protein profiling via isotope-coded affinity tag (ICAT) and tandem mass spectrometry: II. Evaluation of tandem mass spectrometry methodologies for large-scale protein analysis, and the application of statistical tools for data analysis and interpretation. *Mol. Cell Proteomics* 2003; 2, 428-442.