

INTERACÇÃO CELULAR E ATEROSCLEROSE¹

Rui Mesquita, Carlota Saldanha, J Martins e Silva

Instituto de Bioquímica. Faculdade de Medicina de Lisboa.

¹ Comunicação oral apresentada no X Congresso Português de Aterosclerose, Novembro de 2002, Algarve, Portugal

Resumo

O Instituto de Bioquímica tem desenvolvido alguma investigação na área da interacção celular com possível interesse no estudo da aterogénese.

No contexto da aterogénese há evidência que o aumento da interacção leucócitos endotélio resulta na migração de leucócitos para o espaço sub-endotelial, potenciando assim o componente inflamatório da placa de ateroma. Os mecanismos subjacentes ao processo de interacção leucócitos-endotélio encontram-se ainda em discussão. Em estudos *in vivo* verificámos que a administração sistémica a ratos wistar de um inibidor da acetilcolinesterase (velnacrina maleato) aumentou o número de leucócitos em rolamento nas vénulas post-capilares do cremaster e aumentou a concentração plasmática de interleucina-1-beta. Estes resultados sugerem a possível participação de novos elementos no processo da aterogénese nomeadamente a acetilcolinesterase presente nas células sanguíneas e vasculares.

A placa de ateroma favorece ao nível do fluxo sanguíneo pontos de estagnação que induzem a agregação eritrocitária. A nível molecular o fibrinogénio é uma das proteínas que reversivelmente contribuí para a agregação entre os eritrócitos. A concentração elevada de fibrinogénio, factor de risco para a aterosclerose, correlaciona-se positivamente com a tendência agregante dos eritrócitos. Em estudos *in vitro* verificámos que um inibidor (DiBAC₄) da banda 3 eritrocitária (estruturalmente associada à acetilcolinesterase) provocou diminuição da agregação eritrocitária. Estes estudos levantam a hipótese de a banda 3 se relacionar com o local de ligação do fibrinogénio na membrana eritrocitária.

Os resultados de ambos os estudos a apresentar exemplificam processos de interacção celular com possível importância nos mecanismos de (i) iniciação/desenvolvimento/progressão da placa de ateroma e (ii) nos das alterações hemorreológicas decorrentes e que podem potenciar a evolução da aterogénese.

Interacção Leucócitos-Endotélio e Aterogénese

Tem sido verificado que as lesões de aterosclerose se localizam

preferencialmente nas zonas de bifurcação arterial, correlacionando-se este facto com as alterações reológicas resultantes do fluxo sanguíneo passar de laminar para turbulento (Davies, 2000). As modificações das condições do fluxo sanguíneo nas zonas das bifurcações condicionam variações na tensão de cisalhamento exercida sobre o endotélio destas zonas (Topper e col., 1996), julgando-se que poderão iniciar a disfunção endotelial com aumento da expressão de moléculas de adesão. O aumento da expressão das moléculas de adesão à superfície das células endoteliais suportam o aumento da interacção dos leucócitos com o endotélio verificado nas zonas pro-aterogénicas das bifurcações vasculares (Erickson e col., 2001). A migração de leucócitos para o espaço sub-endotelial juntamente com a possibilidade de aumento de retenção de lipoproteínas e sua oxidação, substancia a propagação da disfunção endotelial e da resposta inflamatória no local de pro-aterogénico (Libby e col., 2002; Fig. 1).

As vénulas pós-capilares são o local da circulação sanguínea onde ocorre, em condições normais, um determinado número basal de interacções entre os leucócitos e o endotélio, sendo também o domínio onde em condições fisiopatológicas acontece mais frequentemente o aumento deste fenómeno, como parte da resposta inflamatória. Sendo semelhantes os mecanismos que medeiam a interacção leucócitos - endotélio nas vénulas pós-capilares e nas zonas pro-aterogénicas, isto é ambos constituídos pelas mesmas etapas e mediados pelas mesmas moléculas de adesão (do que se sabe até ao momento), as conclusões retiradas de modelos experimentais baseados no estudo das primeiras

poderão com a margem de dúvida adequada serem extrapoladas para as segundas.

Acetilcolinesterase e Interacção Leucócitos -Endotélio²

Com o objectivo de estudar a função dos mediadores colinérgicos (acetilcolina, acetilcolinesterase e receptores colinérgicos) presentes nas células sanguíneas e endotélio vascular (Mesquita, R, 2001), construiu-se um modelo animal *in vivo* para avaliar a interacção leucócitos-endotélio nas vénulas post-capilares do cremaster de ratos wistar. Assim, ratos wistar foram anestesiados, foi-lhes colocado um catéter na artéria carótida para monitorização da frequência cardíaca e pressão arterial, um catéter na veia jugular para administração contínua de NaCl 0,9% e o cremaster foi preparado de forma apropriada para visualização por transiluminação em microscópio invertido Leitz (Figs. 2 e 3). Neste estudo verificou-se que 5 minutos após a administração sistémica do inibidor da acetilcolinesterase (velnacrina maleato) ocorreu um aumento do número de leucócitos em rolamento no endotélio das vénulas post-capilares do cremaster, relativamente aos ratos do grupo controlo ($p < 0.05$). Verificou-se ainda um aumento da concentração plasmática de interleucina-1 beta no grupo de ratos a que foi administrada velnacrina maleato relativamente ao grupo controlo (Fig. 4).

Aterosclerose e Agregação Eritrocitária

O fenómeno inflamatório subjacente à lesão de aterosclerose poderá associar-se ao aumento de fibrinogénio o qual tem sido verificado em doentes com doenças cardiovasculares relacionadas com a aterosclerose como enfarte agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (Faber e col., 1997; Weng, X e col., 1999; Demiroglu e col., 1996). O aumento de fibrinogénio está relacionado com o aumento da agregação eritrocitária, fenómeno este potenciado pelas alterações de fluxo sanguíneo (Figs. 5 e 6). Neste sentido têm sido realizados vários estudos no Instituto de Bioquímica com o âmbito de esclarecer qual o local da membrana eritrocitária em que se liga o fibrinogénio. Sendo a banda 3 um canal aniónico associado à acetilcolinesterase e às proteínas do citoesqueleto eritrocitário apresenta-se em seguida os resultados obtidos na agregação eritrocitária após a adição de um inibidor da banda 3.

Inibidores da Banda 3 e Agregação Eritrocitária³

Após recolha de sangue venoso de indivíduos aparentemente normais com idades entre os 25 e 35 anos, incubaram-se alíquotas de sangue na presença e ausência do inibidor da proteína da membrana eritrocitária banda 3-DiBAC₄ (Knauf e col., 1995). Verificou-se uma diminuição da agregação eritrocitária ($p < 0,003$) relativamente ao controlo (Fig. 7). Este estudo levanta a hipótese de a banda 3 poder ser um local de ligação da molécula de fibrinogénio, estabelecendo assim a agregação entre eritrócitos.

CONCLUSÕES

Os trabalhos realizados no Instituto de Bioquímica, embora não sendo em modelos de aterogénese, poderão contribuir para o esclarecimento dos mecanismos subjacentes (i) à interacção eucócitos-endotélio e (ii) à agregação eritrocitária. O aumento da agregação eritrocitária e a progressão da placa de ateroma poderão aumentar as alterações de fluxo sanguíneo na zona de bifurcação. Assim fecha-se um «ciclo vicioso» porque as alterações de fluxo nas zonas de bifurcação arterial condicionam (i) disfunção endotelial que suporta o aumento da interacção leucócitos-endotélio e migração para o espaço sub-endotelial, (ii) seguido de activação de leucócitos, com (iii) progressão da placa de ateroma e (iv) aumento da concentração de fibrinogénio e aumento da agregação eritrocitária. Os resultados dos trabalhos apresentados podem assim substanciar intervenções terapêuticas que interrompam o referido «ciclo vicioso» da aterogénese (Fig. 8).

Referências Bibliográficas

1. Libby P, Ridker P, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143.
2. Davies P. Spatial Hemodynamics, the Endothelium, and Focal Atherogenesis. *A Cell Cycle Link? Circ Res* 2000; 86: 114-116.
3. Eriksson E, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L. Direct viewing of atherosclerosis in vivo: plaque invasion by leukocytes is initiated by the endothelial selectins. *FASEB J* 2001; 15: 1149-1157.
4. Topper J, Cai J, Falb D, Gimbrone M. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady

- laminar shear stress. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93 (19): 10417-10422.
5. Mesquita R. Comunicação colinérgica no sangue e endotélio vascular. Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica. Faculdade de Medicina de Lisboa, 2001.
 6. Faber C, Troost J, Vermes I, Lodder J, Kalsbeek-Batenburg E, Kessels F, Haanen C. Enhanced Red Blood Cell Aggregation Unrelated to Fibrinogen: A Possible Stroke Mechanism in Young Patients. Cerebrovasc Dis 1997; 7: 70-76.
 7. Weng X, Cloutier G, Genest J. Contribution of the -455G/A polymorphism at the beta-fibrinogen gene to erythrocyte aggregation in patients with coronary artery disease. Thromb Haemost 1999; 82: 1406-1411.
 8. Demiroglu H, Barista I, Dundar S. Erythrocyte aggregability in patients with coronary heart disease. Clin Hemorheology 1996; 16 (3): 313-317.
 9. Knauf P, Law F-Y, Hahn K. Na oxonol dye is the most potent known inhibitor of band 3-mediated anion exchange. Cell Physiol 1995; 38: C1073-C1077.

² Trabalho apresentado na Reunião da Sociedade Alemã de Microcirculação e Biologia Vascular, 10 a 12 de Outubro de 2002, Munique

³ Trabalho apresentado no II *Workshop* "Educação pela Ciência", Faculdade de Medicina de Lisboa, 1999