

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**LEANDRO CEOTTO FREITAS LIMA**

**EFEITO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES NO  
TRATAMENTO DA ESTENOSE VASCULAR EM  
CAMUNDONGOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

VITÓRIA  
2012

LEANDRO CEOTTO FREITAS LIMA

# **EFEITO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES NO TRATAMENTO DA ESTENOSE VASCULAR EM CAMUNDONGOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvana dos Santos Meyrelles

VITÓRIA  
2012

**LEANDRO CEOTTO FREITAS LIMA**

# **EFEITO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES NO TRATAMENTO DA ESTENOSE VASCULAR EM CAMUNDONGOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Vitória, 26 de janeiro de 2012

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Silvana dos Santos Meyrelles  
Orientadora

---

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez  
Co-Orientador

---

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira  
Examinador Interno

---

Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira  
Examinador Externo

---

Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ivanita Stefanon  
Coordenadora do PPGCF

Aos meus avós Atyla, Gino e Maria. Aonde quer que estejam, sei que zelam por mim.

À minha avó Magdalena, por ainda ter o privilégio de ter sua benção.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao grande Pai Celestial por me guiar em mais uma conquista, sem a sua proteção Divina, meus passos seriam em vão.

Aos meus grandes mestres, orientadores, desorientadores, conselheiros, amigos enfim, tantos são os adjetivos para qualificá-los que poderia escrever até mais que uma dissertação aqui... Obrigado Silvana por me acolher, desde a iniciação vibrando a cada passo, me aconselhando em cada deslize e principalmente, caminhando junto na recuperação e superação! Obrigado professor Vasquez, com o senhor aprendi o significado da frase “ele tem uma educação européia!”...Ouso a dizer que, até hoje não conheço pessoa mais educada que o senhor, que para mim, é um exemplo de força de vontade e determinação. Sempre com a palavra certa e no melhor momento para te dar conforto e esperança de que dias melhores virão.

Minhas “mamães” Bianca e Clarissa, grande parte do que aprendi foi graças a vocês! Obrigado pela paciência com o “filho” rebelde, por não desistirem e por me mostrar o caminho, ganhamos hoje o grande prêmio...a defesa!

Sempre que algum aluno novo aparecia no laboratório eu dizia: “se quiser se espelhar em alguém aqui, que seja em Camille, pois ela tem a perseverança e a disciplina de um japonês”. Com você aprendi a ser um pouco mais disciplinado e organizado, olha que foi difícil hein!

Você foi responsável por grande parte desse trabalho, me ajudou nos experimentos, me freou nos pensamentos, chorou com nossas vitórias e derrotas, até acelerei o mestrado para sermos da mesma turma! Mana Marcella, obrigado por, mesmo sendo mais nova, fazer o papel da “irmã” mais velha!

Aos amigos do LTCC, Ágata, pelos momentos de diversão e descontração, Flávia, com a sua calma deixando o ambiente mais tranquilo, Sara pela sua espontaneidade, Bianca, Michelli, Fred e Gilberto. Ananda, pela simplicidade de enxergar a vida! Raffaella, Solina, Fran, Alan, Marcos e Luciano, alguns a pouco no laboratório, outros nem tanto, mas todos com um único objetivo: serem grandes pesquisadores! Obrigado pelas tardes de muita risada.

Sempre procuramos alguém para nos espelhar, eu tive o privilégio de me espelhar em vocês dois. Coração maior que o seu, sinceramente desconheço Breno, obrigado pelos seus ensinamentos. Pessoa mais enrolada, também nunca vi, mas todo o tempo que estive contigo, Thiago, me dedicava ao máximo em absorver cada experiência.

Ludimila, Rebeca, Eduardo e Divanei, obrigado pelas risadas nos corredores, trocas de informações, auxílios enfim, vocês foram muito importantes em minha formação.

Ao Marcelo, Baldinho, se cada professor tivesse um aluno como você, não seria necessário mais ter um orientador no laboratório. Não sei se te agradeço pelos ensinamentos e discussões ou se te parablenizo por ser um aluno, e pessoa, tão completo.

Ao Rogério, pelas suas tiradas de mau humor, sempre presente e pelas ajudas nos experimentos! A professora Ivanita por toda atenção e carinho.

Cristie, Rubia, Carol e Lais pelos experimentos, churrascos, risadas, passeios... Aprendi muito com cada um de vocês! Aprendi que  $17^{\circ}\text{C}$  não está entre  $15$  e  $25^{\circ}\text{C}$ , que de madrugada o celular deve ficar desligado, que o Silvio Santos é o melhor comediante do Brasil e com a Lais, não importa se seu trabalho é bom, o que importa é que você tem que apresentar de cabelo liso! Aliás, quem tem você, não precisa de ic!

Aos amigos do LQP, Vinicius, Ju e Helena pelas risadas, Pedro, desde a graduação juntos, aos pouco nos tornando amigos quase que inseparáveis! "Tia Sussu" pelas brincadeiras e diversão. Como já te disse um dia, seu lab é quase a casa da avó, pode tudo! À equipe Kuduru'sport: Filipe pela paciência, Thiago e "Soldado" Perin amizades valiosas que carrego para a posteridade!

Ao professor Fernandão, aprendi muitos com suas 12 teses em nossos churrascos! Principalmente de como abordar a garota com quem se quer "flertar". À professora Lívia, sempre solícita em todos os momentos!

Minhas tias Alyta e Sandra, minhas "mãesdioca", pela criação, dedicação, sacrifícios, conselhos... Por tudo! Ao meu tio Serginho por sempre me mostrar o caminho. Aos meus tios e primos por toda a torcida, apoio e compreensão nos meus momentos de ausência, sabendo que não era em vão.

À minha mãe, como ela mesma diz, hoje ela também se torna mestre! Mesmo no silêncio ao meu lado, sei que torce, vibra e zela por mim, obrigado por tudo! Eu te amo!

Aos meus irmãos, Felipe, Ricardo e Gustavo. Felipe, por muitas vezes quando vinha a imagem de pai em minhas mentes, era em você que pensava, você é o meu herói, um exemplo a seguir. Ricardo e Gustavo, não tivemos muitos momentos juntos e por vários anos nossas vidas se separaram, mas o pensamento em vocês, sempre esteve mais perto que imaginam!

Aos meus avós, Atyla, Gino, Maria e Magdalena. Por todo amor e carinho que me dedicaram.

Na graduação nos encontramos, tivemos idas e vindas, mas em nenhum momento nos separamos. A cada passo que dávamos, compartilhávamos a felicidade ou a tristeza, mas sempre juntos! Você é fundamental em minha vida! Obrigado por estar sempre ao meu lado, Renata.

Bernah, Marito e Olavo, aonde vai um, os outros estão por perto! Obrigado pelos momentos de distração e felicidades. Vocês são a alma da família FARMAUFES!

Felipe, Carlos, Matheus e Matheus Vaz, amigos de longa data que carrego no peito. Às vezes, não entendiam nada do que fazia ou falava, mas estavam sempre atentos e esboçavam sempre alguma opinião que não tinha nada a ver, o que era motivo de muita risada! Quem tem vocês como amigos, tem o mundo nas mãos!

Aos amigos farmaUFES, Aline, Bruno, Mauro, Marcelo, Milena e Fef's. Obrigado por tudo!

Pedrão e Ernesto, irmãos de coração, unidos pelas 7 virtudes!

## PREMIAÇÕES DESTE TRABALHO

**Prêmio de Iniciação Científica (área básica). 2008:** Menção Honrosa

### **Apresentação Oral:**

Lima LCF, Porto ML, Pereira TMC, Campagnaro BP, Tonini CL, Gava AL, Meyrelles SS

“A Utilização de Células Tronco Mononucleares Reduz o Desenvolvimento da Aterosclerose em Camundongos ApoE<sup>-/-</sup>”

In: II Congresso de Ciências da Saúde da EMESCAM, 2008, Vitória – ES.

**Prêmio de Excelência em Pesquisa Cardiovascular. 2010:** Menção Honrosa

### **Apresentação Oral:**

Lima LCF, Porto ML, Pereira TMC, Campagnaro BP, Tonini CL, Vasquez EC, Meyrelles SS

“Mononuclear Cells Therapy Diminishes Neointima Formation after Carotid Artery Injury in ApoE<sup>-/-</sup> Mice”

In: IV Congresso de Ciências da Saúde da EMESCAM, 2010, Vitória – ES.

**Prêmio Sérgio Diogo Gianini. 2011:** 2º Lugar

### **Apresentação Oral:**

Lima LCF, Porto ML, Pereira TMC, Campagnaro BP, Tonini CL, Vasquez EC, Meyrelles SS

“Tratamento *in situ* com Células Mononucleares Reduz a formação de Neointima após Lesão na Carótida de Camundongos hipercolesterolêmicos”

In: XIII Congresso Brasileiro de Aterosclerose, 2011, Florianópolis – SC.



**Prêmio de Excelência em Pesquisa Cardiovascular. 2011: 1º Lugar**

**Apresentação Oral:**

Lima LCF, Porto ML, Pereira TMC, Campagnaro BP, Tonini CL, Vasquez EC,  
Meyrelles SS

“Terapia com Células Mononucleares Reduz Lesão Induzida na Carótida de  
Camundongos Hipercolesterolêmicos”

In: V Congresso de Ciências da Saúde da EMESCAM, 2011, Vitória – ES.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Figuras e Tabelas.....</b>	<b>10</b>
<b>Lista de Abreviaturas.....</b>	<b>12</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>17</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>18</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1 Epidemiologia.....	20
1.2 Fatores de Risco.....	21
1.3 Morfologia Vascular.....	22
1.4 Aterosclerose.....	23
1.5 Remodelamento Vascular.....	26
1.6 Restenose.....	31
1.7 Células Tronco.....	33
1.8 Células Tronco Adultas.....	35
1.9 Medula Óssea.....	36
1.10 Células Progenitoras Endoteliais (CPE's).....	37
1.11 Terapia Celular.....	38
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
2.1 Objetivo Geral.....	41
2.2 Objetivos Específicos.....	41

<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>42</b>
3.1 Animais Experimentais.....	43
3.2 Isolamento das Células Mononucleares do Baço.....	43
3.3 Contagem das Células Mononucleares na Câmara de Neubauer.....	45
3.4 Análise da Viabilidade Celular.....	48
3.5 Esplenectomia.....	48
3.6 Realização da Estenose Experimental.....	49
3.7 Tratamento <i>in situ</i> com Células Mononucleares .....	50
3.8 Histoquímica .....	51
3.9 Análise Morfométrica.....	52
3.10 Dosagem do Colesterol Plasmático.....	53
3.11 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's).....	53
3.12 Medida de Células Apoptóticas.....	54
3.13 Imunofluorescência para Identificação de Células Progenitoras.....	54
3.14 Autofluorescência de Células <i>GFP</i> .....	55
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
4.1 Medida de Colesterol Plasmático.....	57
4.2 Área de Deposição Lipídica.....	58
4.3 Área Total Vascular (ATv).....	60
4.4 Área de Luz Vascular (ALv).....	61
4.5 Área de Parede Vascular (APv).....	62
4.6 Relação Parede/Luz (p/l).....	63
4.7 Razão de Remodelamento (RR).....	63
4.8 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's).....	64

4.9 Detecção de Células Apoptóticas.....	65
4.10 Autofluorescência de Células <i>GFP</i> .....	65
4.11 Imunofluorescência para Identificação de Células Progenitoras.....	66
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Corte transversal da aorta (aorta torácica, humana) tratado por uma coloração para fibras elásticas (orceína).....	22
Figura 2 - Estágios de desenvolvimento da lesão aterosclerótica.....	26
Figura 3 - Modelo Glagoviano de Remodelamento Arterial Positivo.....	28
Figura 4 - Relação entre área vascular total e área luminal.....	29
Figura 5 - Subtipos de remodelamento vascular.....	30
Figura 6 - Representação esquemática do desenvolvimento do processo de restenose vascular.....	33
Figura 7 - Esquema de divisão simétrica e assimétrica das células tronco.....	35
Figura 8 - Isolamento de células mononucleares.....	45
Figura 9 - Contagem celular em câmara de Neubauer.....	47
Figura 10 – Esplenectomia.....	49
Figura 11 – Colocação do anel silástico.....	50
Figura 12 - Medida de colesterol plasmático em mg/dL dos animais.....	57
Figura 13 - Área de deposição lipídica da carótida comum esquerda dos animais...58	
Figura 14 - Cortes transversais típicos de carótida comum dos camundongos ApoE <sup>-/-</sup> coradas com <i>Oil-Red-O</i> .....	59
Figura 15 - Área vascular total da carótida comum esquerda dos animais.....	60

Figura 16 - Gráfico da área luminal da carótida comum esquerda, em $\mu\text{m}^2$ , dos animais.....	61
Figura 17 – Área de parede vascular dos diferentes grupos estudados.....	62
Figura 18 - Cortes transversais típicos de carótida comum dos camundongos ApoE <sup>-/-</sup> coradas com DHE.....	64
Figura 19 - Cortes transversais típicos de carótida comum dos camundongos ApoE <sup>-/-</sup> coradas pelo método de TUNEL.....	65
Figura 20 - Cortes transversais típicos de carótida comum dos camundongos ApoE <sup>-/-</sup> (GFP).....	66
Figura 21 - Cortes transversais típicos de carótida comum dos camundongos ApoE <sup>-/-</sup> (CD117/CD90).....	67
Figura 2 - Cortes transversais típicos de carótida comum dos camundongos ApoE <sup>-/-</sup> (MERGE).....	67
Tabela 1: Razão Parede/Luz (p/l).....	63
Tabela 2: Razão Remodelamento (RR).....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ApoE<sup>-/-</sup>: camundongo *knockout* para apolipoproteína E
- BD: Becton, Dickinson and Company
- C57BL/6: linhagem de camundongo C57 black/6
- CD: cluster de diferenciação
- CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais
- CMN: célula mononuclear
- CML: célula muscular lisa
- CPE: célula progenitora endotelial
- CTH: célula tronco hematopoiética
- CTNBIO: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
- DAC: doença arterial coronariana
- DCV: doenças cardiovasculares
- DMEM: meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)
- EMESCAM: Escola Superior de Ciências Santa Casa de Misericórdia
- eNOS: enzima óxido nítrico sintase endotelial (*endothelial nitric oxide synthase*)
- EPM: erro padrão da média
- ERO's: espécies reativas de oxigênio
- *et al.*: *et alli* – e colaboradores
- EUA : Estados Unidos da América
- FGF – *fibroblast growth factor*
- FITC: isotiocianato de fluoresceína
- FLK-1:

- GFP<sup>+/+</sup>: camundongo transgênico para a proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)
- HGF: fator de crescimento de hepatócitos (*hepatocyte growth factor*)
- M-CSF: fator estimulante de colônias de macrófagos (*Macrophage Colony Stimulating Factor*)
- HDL: lipoproteína de alta densidade (*high density lipoprotein*)
- ICAM: molécula de adesão intercelular (*Intercellular Adhesion Molecule*)
- IL: interleucina (*interleukin*)
- Ip: intraperitoneal
- LDL: lipoproteína de baixa densidade (*low density lipoprotein*)
- LTCC: Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular
- mm: milímetro ( $10^{-3}$ )
- MMP: da matriz de metaloproteinase (*matrix metalloproteinase*)
- mL: mililitro ( $10^{-3}$ )
- $\mu\text{m}$ : micrometro ( $10^{-6}$ )
- NO: óxido nítrico
- p: significância estatística
- PBS: solução salina de fosfato tamponada (*Phosphate Buffered Saline*)
- PDGF – *platelet-derived growth factor*)
- PE: ficoeritrina
- rpm: rotações por minuto
- TGF- $\beta$  – *transforming growth factor- $\beta$*
- TIMP: inibidor tecidual de metaloproteinase (*tissue inhibitors of metalloproteinases*)
- TNF: fator de necrose tumoral (*tumoral necrosis factor*)
- VCAM: molécula de adesão celular vascular (*vascular cell adhesion molecule*)



- VEGF – fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*)
- SFB: soro fetal bovino
- SUS: Sistema Único de Saúde
- UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

## Resumo

O remodelamento vascular com formação de neointima é um processo que ocorre em resposta a doenças como a aterosclerose. Células mononucleares (CMN) têm sido utilizadas na neovascularização. Dessa forma, o objetivo do estudo foi avaliar o tratamento *in situ* de CMN após estenose da carótida de camundongos ApoE<sup>-/-</sup>. Camundongos ApoE<sup>-/-</sup> fêmeas de 5 meses foram esplenectomizados e submetidos à estenose da artéria carótida comum esquerda através de anel silástico. Após 10 dias, o anel foi retirado e, salina (Salina, n=8) ou 10<sup>6</sup> CMN (CMN, n=6), isoladas do baço de camundongos GFP, foram aplicadas *in situ*. O grupo controle (CT, n=5) não recebeu tratamento, sendo utilizado para análise de remodelamento vascular. Decorridos 7 dias, os animais foram eutanasiados, perfundidos e tiveram a artéria carótida removida para análise histomorfométrica. Foi realizada a autofluorescência para GFP para localização das CMN, imunofluorescência para localização das células progenitoras endoteliais (CPE's), através da marcação de CD90-PE/CD117-FITC, TUNEL para visualização de apoptose e dihidroetídio para produção de estresse oxidativo. Média±EPM, ANOVA 1 via seguida de *post hoc* de Tukey e teste *t* de Student. \*p<0,05. O grupo CMN apresentou predomínio destas células no endotélio vascular, podendo ser visualizadas através da autofluorescência do GFP e evidenciadas como CPE através da dupla marcação de fluorescência. O tratamento foi capaz de reduzir significativamente a área de lesão (CMN: 29,5±11,2\*\* vs. Salina: 104±15,9 vs. CT: 27,4±7,1 10<sup>3</sup>µm<sup>2</sup>) com consequente aumento da área luminal (CMN: 72,5±8,6\*\* vs. Salina: 7,8±4,6 vs. CT: 52,6±2,7 10<sup>3</sup>µm<sup>2</sup>). Também não foi observada diferença na área externa do vaso entre os grupos (Salina: 115±18,4 vs. CMN: 113,9±10,2 vs. CT: 89,7±5,8 10<sup>3</sup>µm<sup>2</sup>) sugerindo ausência de remodelamento positivo, sendo essa ausência comprovada pela razão de remodelamento (Salina: 0,92±0,37 vs. CMN: 0,92±0,21 ). Além disso, o tratamento reduziu a relação parede/luz (Salina: 2,94±0,47 vs. CMN: 0,6±0,08\*\* vs. CT: 0,7±0,07). O tratamento também foi capaz de reduzir a produção de ânion superóxido e, conseqüentemente, apoptose em relação ao grupo salina. Nossos dados sugerem que a terapia com CMN aumenta a área luminal da carótida sem evidências de remodelamento vascular, provavelmente pelo efeito parácrino e imunomodulatório das CMN, que foram capazes de recuperar o endotélio da parede vascular lesada.

**Palavras-chave:** ApoE<sup>-/-</sup>, aterosclerose, CMN, GFP, terapia celular.

## Abstract

Vascular remodeling with neointimal formation is an adaptive process that occurs in response to chronic changes in hemodynamic conditions such as atherosclerosis. Spleen derived mononuclear cells (MNC) have been implicated in neovascularization. Therefore, the aim of this study was to evaluate *in situ* MNC treatment after carotid artery stenosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice. Experiments were performed in 5-month-old female ApoE<sup>-/-</sup> mice. Animals were splenectomized and underwent left common carotid artery stenosis by placing a cuff around it. Ten days later the cuff was removed and animals received an *in situ* application of 20 µl saline (Saline; n = 8) or 10<sup>6</sup> splenic MNC (MNC; n = 6), isolated from GFP mice. A third group (CT; n = 5), received no treatment, it was being used as a vascular remodeling parameter. After 7 days, animals were euthanized, perfusion-fixed and the whole left common carotid artery was excised for histomorphological analysis and the plasma for biochemical analysis. Tissue sections (10 µm) were stained with Oil-Red-O and hematoxylin-eosin for plaque and morphological analysis. To localize the MNC, we used GFP fluorescence and CD90-PE/CD117-FITC to localize EPC. To apoptosis and reactive oxygen species detections was used TUNEL and DHE respectively. Mean±SEM, 1 way ANOVA followed by Tukey *post hoc* and Student *t* test. \*p<0.05. The GFP expressing cells revealed that MNC was presenting at endothelial layer in the treated group and the EPC was confirmed at CD-90/CD117 positive. This treatment decreased the thickening of carotid intima layer (MNC: 29.5±11.2\*\* vs. Saline: 104±15.9 vs. CT: 27.4±7.1 10<sup>3</sup>µm<sup>2</sup>) and, consequently, augmented vessel lumen (MNC: 72.5±8.6\*\* vs. Saline: 7.8±4.6 vs. CT 52.6±2.7 10<sup>3</sup>µm<sup>2</sup>). In addition, there was no difference in vessel external area between the groups (Saline: 115±18.4 vs. MNC: 113.9±10.2 vs. CT: 89.7±5.8 10<sup>3</sup>µm<sup>2</sup>) suggesting no positive vascular remodeling, evidenced by wall/lumen (Saline: 2.94±0.47 vs. MNC: 0.6±0.08\*\* vs. Control: 0.7±0.07) and remodeling ratio (Saline: 0.92±0.37 vs. MNC: 0.92±0.21). Furthermore, the treatment was be able to reduce reactive oxygen species and consequently apoptosis. Our data suggest that MNC therapy augments common carotid artery luminal area without evidence of vascular remodeling, probably due to the paracrine action of MNC, which could promote endothelial cells repairment on the injured vascular wall.

**Keywords:** ApoE<sup>-/-</sup>, atherosclerosis, GFP, MNC, cell therapy.



# INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Epidemiologia

As doenças cardiovasculares (DCV) permanecem como uma das maiores causas de mortes no mundo (WHO, 2011; BASSON, 2008; STOCKER e KEANEY, 2004). Em 2008, mais de 17 milhões de pessoas morreram decorrente de complicações no aparelho circulatório, sendo que, desse total de óbitos, cerca 3 milhões ocorreu em pessoas que ainda não haviam completado 60 anos e, portanto, poderiam ter sido prevenidas (WHO, 2011). A porcentagem de mortes prematuras por DCV pode chegar até 42% do total de mortes em países em desenvolvimento, fato esse não compartilhado por diversos países desenvolvidos (WHO, 2011). As doenças cardiovasculares, dislipidemias, obesidade e diabetes ainda estão entre as principais causas de mortalidade e morbidade no Brasil, o que constitui um grave problema de saúde pública (MARTINS *et al.*, 1993).

Dados do DataSUS apontam que as DCV foram responsáveis por cerca de 10% das internações no ano de 2010, perfazendo um total de mais de um milhão e cem mil internos (1.153.213), sendo a terceira principal causa de internações naquele ano, ficando atrás apenas de internações por gravidez e puerpério, e doenças do aparelho respiratório. Entretanto, quando avaliados os custos dessas internações, percebe-se que correspondem a aproximadamente dois bilhões e cem milhões de reais (R\$2.094.586.170,00), sendo o principal gasto com internações no ano de 2010 (BRASIL, 2011).

Dentre as doenças do aparelho cardiocirculatório, as mais incidentes são insuficiência cardíaca, doenças isquêmicas do coração e acidentes vasculares cerebrais (BRASIL, 2011). As duas últimas mantêm uma estreita relação com a aterosclerose (WHO, 2011).

## 1.2 Fatores de Risco

A prevalência e a gravidade da aterosclerose estão relacionadas a diversos fatores, sendo estes intrínsecos ao indivíduo (como idade, raça, sexo e fatores genéticos) (WHO, 2011; STOCKER e KEANEY, 2004) ou relacionados com o ambiente

Muitos são os trabalhos que apontam a dislipidemia, diabetes, hipertensão, tabagismo, sedentarismo, hiper-homocisteinemia, o histórico familiar e até mesmo fatores socioeconômicos, como a educação, como sendo fatores de risco independente para o desenvolvimento de aterosclerose e cardiopatias isquêmicas (WHO, 2011; STOCKER e KEANEY, 2004; BRASIL, 2007; BRASIL, 2010; LAUFS *et al.*, 2005; D'USCIO *et al.*, 2001; WERNER e NICKENIG, 2006b; MEYRELLES *et al.*, 2011).

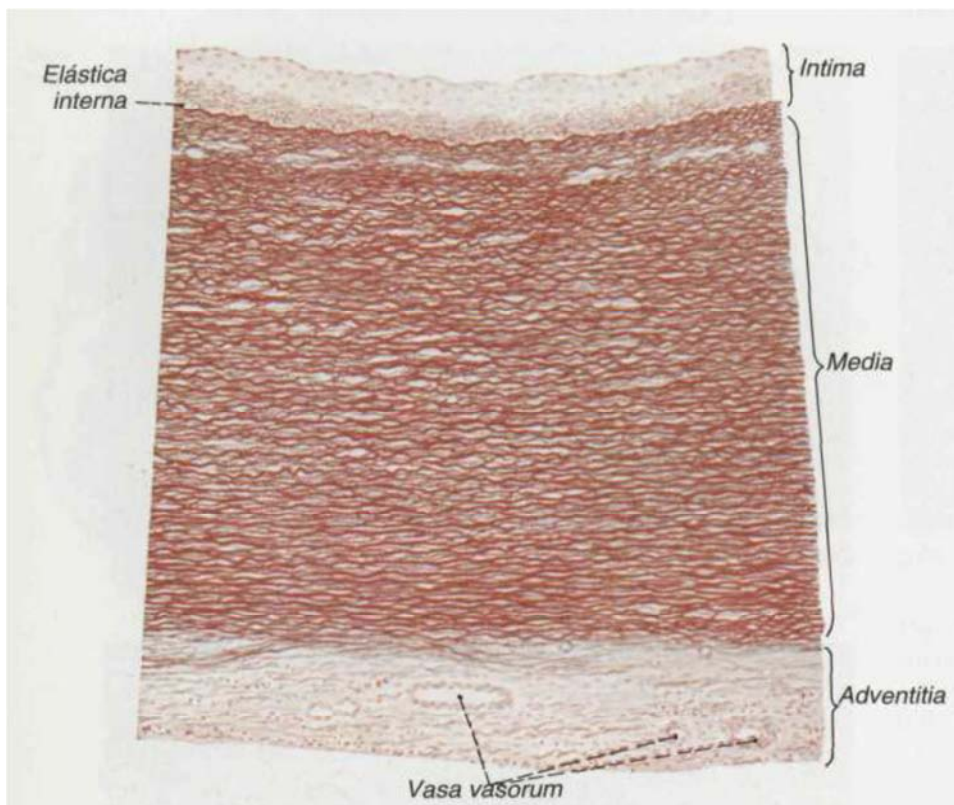
Na dislipidemia, evidências apontam que a hipercolesterolemia está intimamente relacionada com o desenvolvimento da placa aterosclerótica. Um dos principais componentes do colesterol plasmático associado ao risco aumentado é o LDL - colesterol (LDL – referente ao inglês *low density lipoprotein*). Mutações gênicas nos receptores de LDL ou no gene da apoB100 podem levar a Hipercolesterolemia Familiar (STOCKER e KEANEY, 2004; BRASIL, 2007), de modo que o perfil lipídico desses pacientes, se não tratados, permanecem elevados levando à formação de placas ateromatosas precoces. Tal fato aumenta, portanto, o risco de doenças isquêmicas (STOCKER e KEANEY, 2004).

A presença de níveis elevados de HDL - colesterol (*high density lipoprotein*), diferente do LDL - colesterol, estão relacionados a um risco diminuído de eventos isquêmicos (STOCKER e KEANEY, 2004), visto que participa do transporte reverso do colesterol, levando da circulação sanguínea para o fígado (STOCKER e KEANEY, 2004; ROSENSON, 2004). Além disso, sabe-se que o HDL - colesterol pode inibir a oxidação do LDL – colesterol, além de prevenir a inibição da eNOS (enzima óxido nítrico sintase endotelial) pelo LDL oxidado. As propriedades antioxidantes e antiaterogênicas do HDL - colesterol são devido à associação com enzimas, como a paraoxonase (ROSENSON, 2004). Sabe-se que algumas intervenções, como por exemplo o exercício físico e dieta rica em fibras elevam o

HDL – colesterol, enquanto que o tabagismo, obesidade e o sedentarismo o reduzem (BRASIL, 2007; LAUFS *et al.*, 2005).

### 1.3 Morfologia Vascular

A parede arterial normal consiste de três camadas concêntricas bem definidas ao redor do lúmen vascular, e cada uma possui composição distinta de células e matriz extracelular. A camada imediatamente adjacente ao lúmen é chamada de íntima, a camada posterior à íntima é conhecida por camada média e, a mais externa conhecida como o nome de adventícia. Essas três camadas são demarcadas por lâminas concêntricas de elastina, conhecida como: lâmina elástica interna, lâmina essa que separa a íntima da média, e a lâmina elástica externa, que separa a camada média da adventícia (Figura 1) (STOCKER e KEANEY, 2004).



**Figura 1 - Corte transversal da aorta (aorta torácica, humana) tratado por uma coloração para fibras elásticas (orceína).** Observe as três camadas que constituem a parede da artéria: 1. camada íntima, 2. camada média, 3. camada adventícia, composta tecido conjuntivo (com presença de *vasa vasorum*). As lâminas elásticas interna e externa são menos evidentes nas artérias do tipo elástico do que nas artérias do tipo muscular. Aumento 60 X.

Fonte: SOBOTTA (1999).

Uma simples e continua camada de células endoteliais, a camada íntima, compõe a superfície luminal das artérias. Essas células se acomodam sobre uma membrana basal rica em matriz extracelular e proteoglicanos que é delimitada pela lâmina elástica interna. Embora células musculares possam ser encontradas no espaço intimal, as células endoteliais são o principal componente desta camada formando uma barreira física e funcional entre o fluxo sanguíneo e estroma da parede arterial. Células endoteliais regulam uma grande variedade de processos incluindo coagulação, tônus vascular e tráfego de leucócitos, dentre outras funções (STOCKER e KEANEY, 2004; FONTAINE *et al.*, 2006).

Indo em direção ao exterior da lâmina elástica interna, a camada média consiste principalmente de células musculares lisas dispostas em camadas, e esse número de camadas depende do diâmetro do vaso. Uma matriz extracelular composta principalmente de fibras colágeno, elastina e uma menor concentração de proteoglicanos mantém unidas as células musculares lisas. Um aumento no teor de elastina é típico em grandes artérias, visto que necessitam de considerável recolhimento elástico durante a diástole que é o período entre ejeções de sangue do coração (STOCKER e KEANEY, 2004).

A adventícia é a camada mais externa da artéria e normalmente são constituídas de uma matriz frouxa de elastina, células musculares lisa, fibroblastos e colágeno. A maior parte das fibras nervosas que regulam os vasos sanguíneos também atravessa à adventícia. Ao mesmo tempo, a adventícia foi considerada inativa em relação à homeostase vascular, entretanto, recentemente se tornou claro que a adventícia, através da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's), pode desempenhar um importante papel no controle do remodelamento vascular além da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) (STOCKER e KEANEY, 2004).

#### **1.4 Aterosclerose**

Até meados da década de 70, os primeiros relatos com relação ao desenvolvimento da aterosclerose giravam em torno apenas dos lipídios, visto que existia uma forte correlação da clínica com estudos experimentais entre a hipercolesterolemia e o desenvolvimento da placa de ateroma. O desenvolvimento do conhecimento da



biologia vascular entre os anos 70 e 80 fez com que pesquisadores da época começassem a ampliar os horizontes de estudo, acreditando que fatores de crescimento, bem como a proliferação de células musculares lisas também estavam envolvidos no processo. Tal fato ocorreu devido a um problema deparado na clínica, o processo de restenose (estreitamento da luz vascular) pós-intervenção percutânea arterial. Dessa maneira, na época, acreditavam que a placa de ateroma era um depósito de lipídios acelular envolvido por uma capa proliferativa de células musculares lisas (LIBBY, 2002).

Durante as últimas décadas, têm se dado um importante papel para a inflamação na aterosclerose e suas complicações. Dessa maneira, a noção de que a inflamação e a resposta imune podem contribuir com a aterogênese fez com que surgisse então a necessidade de reformular o conceito sobre a aterosclerose (LIBBY, 2002). Portanto, de acordo com as IV Diretrizes Brasileiras de Dislipidemia e Prevenção da Aterosclerose, a aterosclerose pode ser definida como uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (BRASIL, 2007).

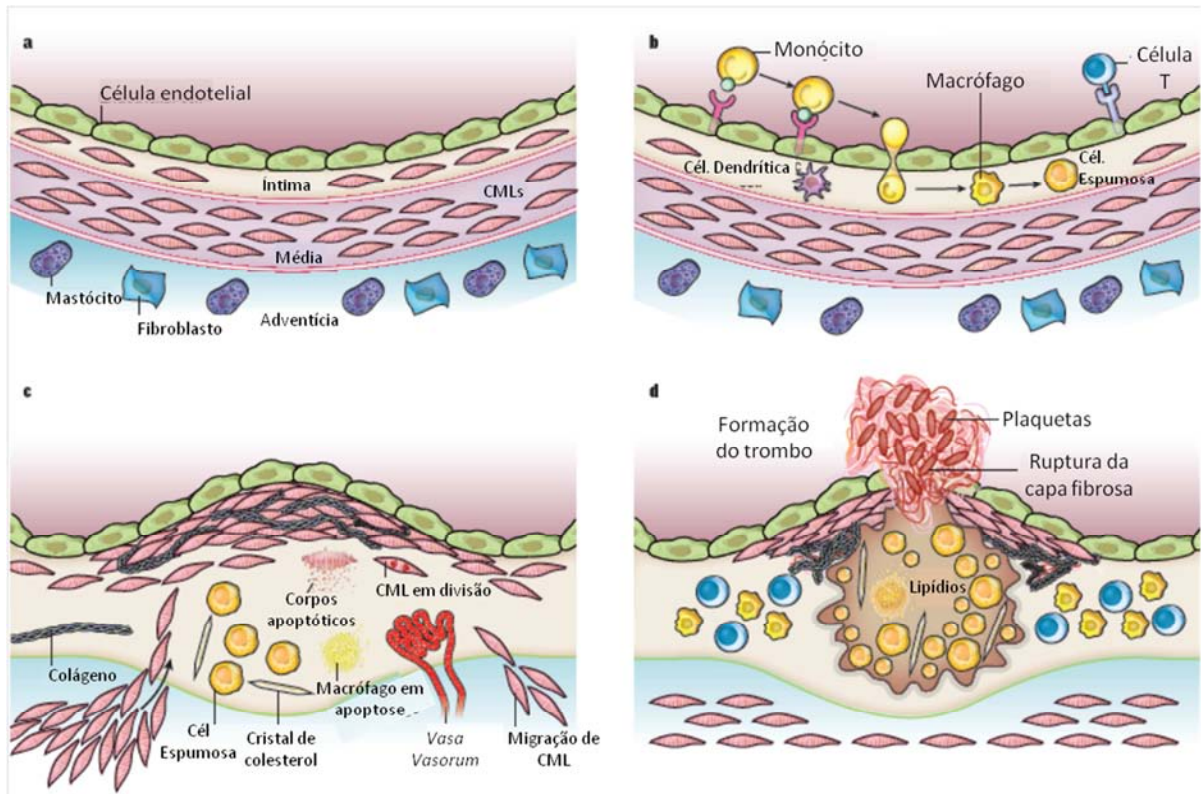
A aterogênese se refere ao desenvolvimento da placa ateromatosa na camada subendotelial das artérias. Ela se inicia com alterações qualitativas na camada de células endoteliais (LIBBY, RIDKER e HANSSON, 2011), gerando um aumento na produção de ânions superóxidos ( $O_2^{\cdot-}$ ), o que leva a um processo conhecido como disfunção endotelial. Nesse processo, há um desequilíbrio na produção endotelial de mediadores que regulam o tônus vascular, agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise. Assim, o endotélio vascular passa a expressar moléculas de adesão pró-inflamatórias (VCAM-1, ICAM e selectinas, por exemplo) que favorecem a entrada de leucócitos para o espaço intimal e fatores de crescimento, como o fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) (LUSIS, 2000; LIBBY, RIDKER e HANSSON, 2011; LAMON e HAJJAR, 2008; BRAUNERSREUTHER *et al.*, 2007).

Paralelo as alterações de permeabilidade do endotélio e composição de matriz extracelular sob o endotélio, ocorre à entrada e retenção do LDL - colesterol na parede arterial. A oxidação dessas partículas induz a migração de leucócitos e monócitos, uma vez na parede da artéria os monócitos se diferenciam em macrófagos que irão fagocitar o LDL oxidado, levando ao acúmulo de colesterol

intracelular (BRASIL, 2007; LUSIS, 2000; LIBBY, RIDKER e HANSSON, 2011). Esses macrófagos que endocitaram as partículas de colesterol são denominados de células espumosas devido a essa aparência quando visualizados ao microscópio óptico (LIBBY, RIDKER e HANSSON, 2011; LAMON e HAJJAR, 2008).

Os macrófagos na lesão ateromatosa possuem também um papel pró-inflamatório, pois produzem altos níveis de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral (TNF). Alguns fagócitos possuem características e provavelmente função de apresentação de antígenos. Outras classes de leucócitos (como os linfócitos) e os mastócitos se acumulam na placa de ateroma, porém em menor quantidade que os fagócitos. As células T, embora em menor número, possuem um papel chave no desenvolvimento da placa. A formação do ateroma também envolve o recrutamento de células musculares lisas advindas da camada média, camada medial da parede arterial, para a camada íntima (LUSIS, 2000; LIBBY, RIDKER e HANSSON, 2011; LAMON e HAJJAR, 2008). Ao contrário da maioria dos animais experimentais utilizados em estudos de aterosclerose, a camada íntima das artérias humanas (incluindo as coronárias) contém células musculares lisas (LIBBY, RIDKER e HANSSON, 2011). Entretanto, durante o processo de aterogênese, outras células musculares lisas migram da média para a íntima, e se proliferam em resposta a mediadores como o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF – *platelet-derived growth factor*). Na íntima, as células musculares lisas produzem moléculas de matriz extracelular, incluindo colágeno intersticial e elastina, formando uma capa fibrosa ao redor da placa. Essa capa recobre uma coleção de células espumosas derivadas de macrófagos, corpos apoptóticos e lipídio extracelular. O acúmulo de debris celulares e lipídio extracelular acabam por formar um centro necrótico no interior da placa (LIBBY, RIDKER e HANSSON, 2011; LAMON e HAJJAR, 2008). O esquema de formação de uma lesão aterosclerótica pode ser visto na figura 2.

As placas ateroscleróticas causam diversas manifestações clínicas através da redução de fluxo sanguíneo (estenose) e assim, isquemia tecidual, ou por favorecer a formação de trombos que podem interromper o fluxo local ou promover a embolia em artérias mais distais (LIBBY, RIDKER e HANSSON, 2011).



**Figura 2 - Estágios de desenvolvimento da lesão aterosclerótica.** Em A, corte esquemático representando uma artéria saudável. Em B, a disfunção endotelial e a oxidação do LDL na camada subendotelial vascular favorece o recrutamento de monócitos e macrófago para fagocitar esse LDL oxidado, dando assim origem às células espumosas e ao início do processo aterosclerótico. Em C, é possível observar a placa em estágio avançado, com o centro necrótico formado, angiogênese (formação dos *vasa vasorum*), migração de CML e apoptose. Em d, quando ocorre ruptura da capa fibrosa e formação de trombos. CML: célula muscular lisa.

Fonte: Adaptado de LIBBY, RIDKER e HANSSON (2011)

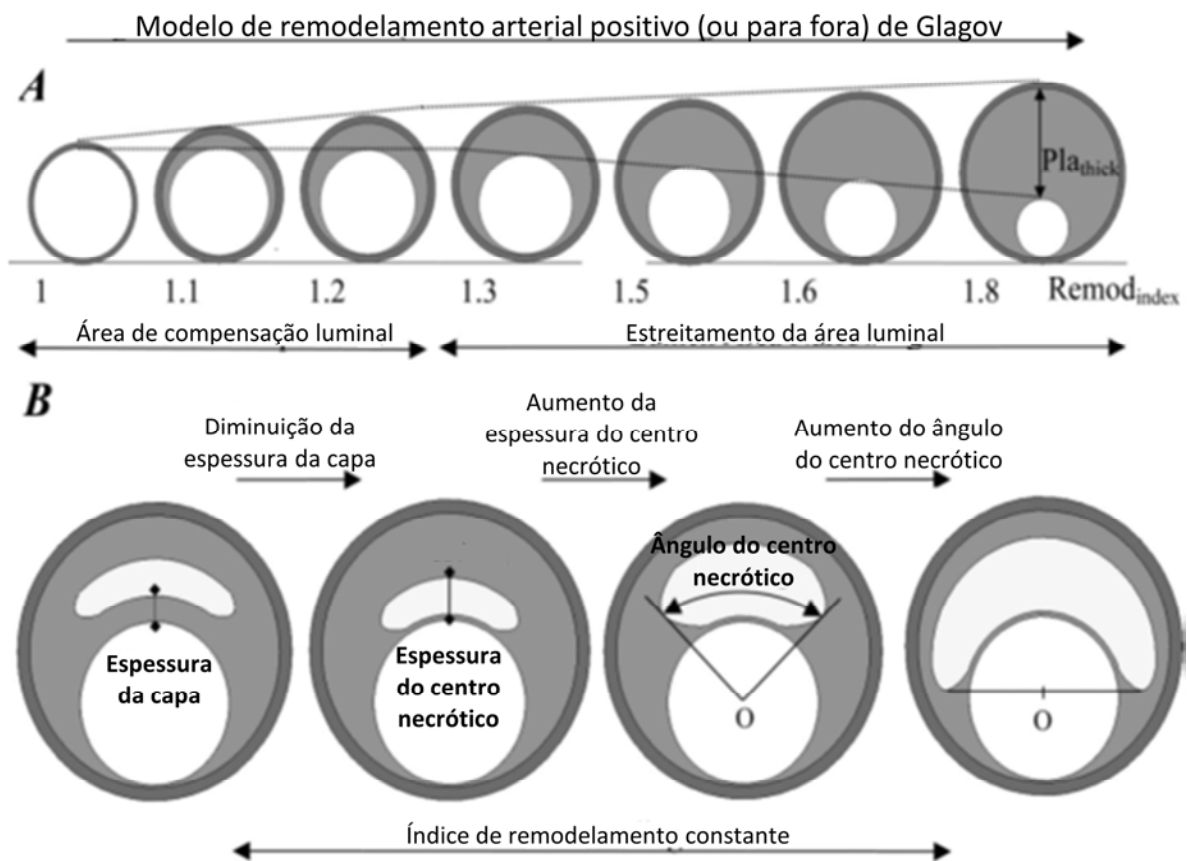
## 1.5 Remodelamento Vascular

O remodelamento arterial pode ser descrito como o processo em que a parede arterial se adapta de maneira fisiológica ou patológica às variações do tamanho vascular. O aumento da área de secção transversa é conhecido como remodelamento positivo ou para fora, enquanto que a redução é chamada de remodelamento negativo ou para dentro (MOHIADDIN *et al.*, 2004).

O conceito de remodelamento arterial foi descrito pela primeira vez em 1893 por Thoma, quando reparou que os vasos sanguíneos se alargavam para acomodar o aumento do fluxo para um órgão (MOHIADDIN *et al.*, 2004). Quase 100 anos depois, Glagov apresenta o conceito de remodelamento arterial em um processo patológico

de desenvolvimento da aterosclerose em artérias coronárias (GLAGOV *et al.*, 1987). O fenômeno de Glagov descreve que a área de secção luminal é preservada face ao avanço da aterosclerose na parede arterial (MOHIADDIN *et al.*, 2004; GLAGOV *et al.*, 1987; WARD *et al.*, 2000).

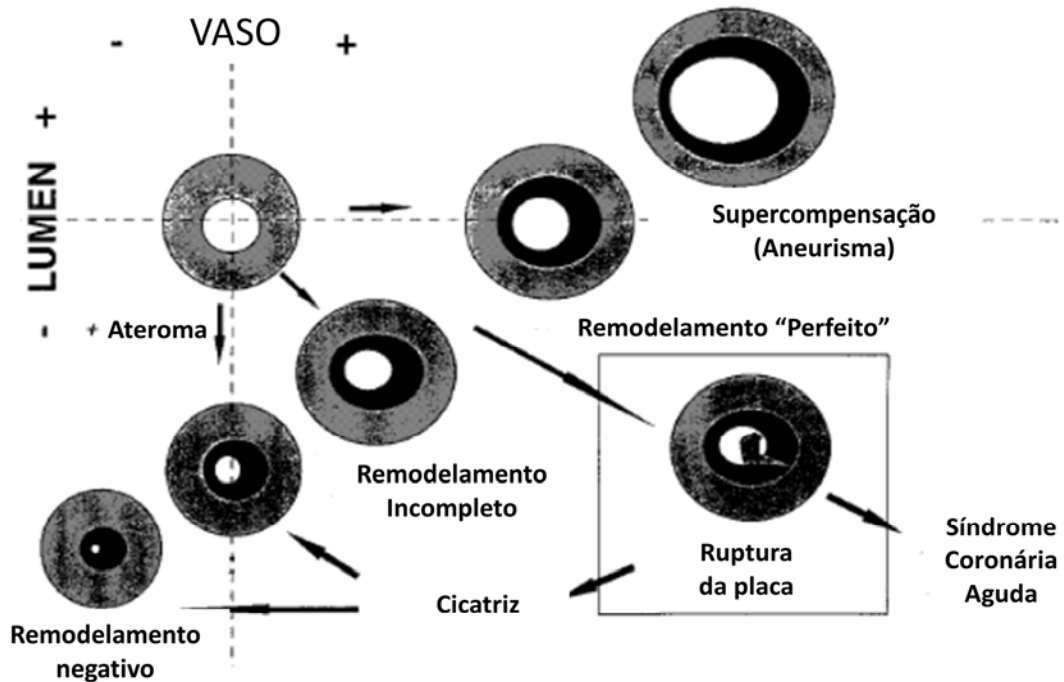
O termo remodelamento arterial foi previamente utilizado para descrever qualquer alteração na estrutura vascular. Entretanto, atualmente esse termo tem sido utilizado de maneira mais específica para se referir a mudanças no tamanho do vaso quando comparado à artéria controle (MOHIADDIN *et al.*, 2004; GLAGOV *et al.*, 1987; PASTERKAMP, DE KLEIJN e BORST, 1995). Esse fenômeno foi descrito por Glagov *et al.* (1987), que correlacionou área de lesão aterosclerótica com aumento da lâmina elástica externa. Dessa maneira, foi descrito que a área de secção luminal de uma coronária humana permanecia inalterada até uma percentagem de estenose próxima de 40%, fazendo com que o vaso alterasse somente sua área vascular total para “acomodar” a lesão ateromatosa (PASTERKAMP, DE KLEIJN e BORST, 1995; KORSHUNOV, SCHWARTZ e BERK, 2007). Entretanto, quando a placa representa mais de 40% de área da lâmina elástica interna, ocorre uma progressiva redução da área luminal levando a um processo de estenose luminal, conforme mostrado na figura 3 (MOHIADDIN *et al.*, 2004; PASTERKAMP, DE KLEIJN e BORST, 1995; OHAYON *et al.*, 2008).



**Figura 3 - Modelo Glagoviano de Remodelamento Arterial Positivo.** Note que no início do desenvolvimento da lesão aterosclerótica há uma preservação da luz vascular, entretanto com o contínuo desenvolvimento da lesão, há um estreitamento progressivo da luz vascular.

Fonte: Modificado de Ohayon *et al.* (2008).

A medida da área do vaso é feita através da sua área de secção transversa, sendo esta contida dentro dos limites da lâmina elástica externa. Portanto, conhecendo a área de secção transversa de um vaso saudável, é possível saber se houve um remodelamento positivo, aumento na área de secção transversa, ou um remodelamento negativo, com redução da área vascular (WARD *et al.*, 2000; PASTERKAMP, DE KLEIJN e BORST, 1995). Quando há uma compensação exagerada da área vascular e com aumento da área luminal, denomina-se aneurisma (Figura 4) (WARD *et al.*, 2000).



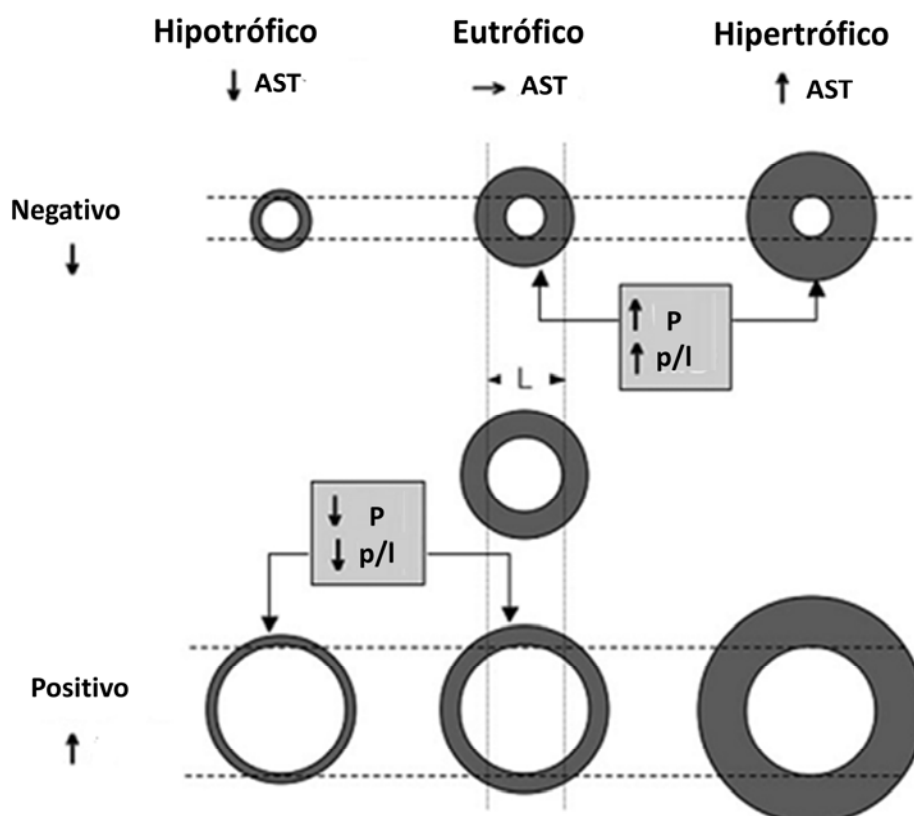
**Figura 4 - Relação entre área vascular total e área luminal.** A partir de um vaso saudável, o desenvolvimento de uma lesão aterosclerótica pode gerar um remodelamento positivo com preservação do lúmen vascular, pode haver um remodelamento incompleto onde a placa aterosclerótica promove o estreitamento da luz. A ruptura da placa pode levar a um processo cicatricial acarretando em um remodelamento negativo. O aneurisma ocorre quando há uma compensação exagerada com aumento tanto de área vascular total quanto luminal.

Fonte: Modificado de Ward *et al.* (2000).

Tanto o remodelamento positivo quanto o negativo podem ser subdivididos em hipotrófico, eutrófico e hipertrófico (Figura 5). Tais termos são geralmente empregados para vasos de resistência tomando como parâmetros a área luminal e a relação parede/luz, ou de maneira mais fidedigna a relação média/luz (MULVANY, 1999; FEIHL *et al.*, 2008).

Os vasos de resistência são aqueles que concentram a maior parte da queda de pressão, que deve ocorrer entre as grandes artérias e os capilares. São consideradas artérias e arteríolas de resistências os vasos com diâmetros entre 300 e 15  $\mu\text{m}$ . Os vasos de resistência têm como característica o tônus miogênico, ou seja, a capacidade intrínseca de contrair em resposta a um aumento súbito de pressão transmural (FEIHL *et al.*, 2008).

Para um remodelamento eutrófico, ocorre tanto diminuição da área vascular total quanto da área luminal, porém sem alteração da área de parede (ou área da camada média) com aumento da relação parede/luz. Em um remodelamento hipertrófico, ocorre tanto aumento da relação parede/luz quanto aumento da área de parede. Para determinação de um remodelamento hipotrófico, ocorre o inverso de um remodelamento hipertrófico, ou seja, redução tanto da relação parede/luz; sendo que a relação parede/luz ou média/luz fornece a informação de como o vaso se comporta, contrai, perante estímulos intravasculares, como aumento de pressão (MULVANY, 1999; FEIHL *et al.*, 2008).



**Figura 5 - Subtipos de remodelamento vascular.** Representação esquemática de cortes vasculares. No centro da figura, tem-se o vaso de referência. AST parede (ou média), área de secção transversa. L, diâmetro luminal. P, espessura de parede.

Fonte: Modificado de Feihl *et al.* (2008).

Durante o processo aterosclerótico, a artéria pode estar sujeita a três tipos de remodelamento: 1) aumento vascular compensatório, 2) falência do aumento vascular compensatório, e 3) redução do lúmen. O aumento compensatório da artéria ocorre em resposta à formação de placa ateromatosa no intuito de preservar a luz vascular. Não apenas o tamanho da placa, mas também o grau de remodelamento determina o grau e a severidade de estreitamento luminal (PASTERKAMP, DE KLEIJN e BORST, 1995).

Muitos são os fatores que promovem o desenvolvimento da placa, entretanto pouco se sabe quais são os que de fato determinam o remodelamento. Algumas variações de remodelamento dependem do leito envolvido como, por exemplo: a artéria íleo femoral está propensa a sofrer tanto um remodelamento positivo quanto um negativo, fato esse que não é comum em artérias renais (PASTERKAMP, DE KLEIJN e BORST, 1995).

A razão para se compreender a heterogeneidade regional em resposta ao remodelamento ainda não está clara, porém podem refletir na variabilidade de resposta ao endotélio frente a alterações hemodinâmicas. Além disso, alguns pesquisadores têm percebido que as características do paciente podem estar relacionadas com o padrão de remodelamento: o remodelamento positivo inadequado e o remodelamento negativo são mais comuns, por exemplo, em pacientes diabéticos insulino dependentes e em fumantes quando comparados à pacientes diabéticos não insulino dependentes e a pacientes não fumantes (WARD *et al.*, 2000).

## **1.6 Restenose**

O processo de desenvolvimento da placa aterosclerótica, através da estenose vascular, pode dar início a diversas doenças isquêmicas como, por exemplo, a doença arterial coronariana (DAC). Tal condição pode ser assintomática ou evoluir para quadros de angina ou até mesmo o infarto agudo do miocárdio (IAM) (GIORDANO e ROMANO, 2011).

A Intervenção percutânea é um procedimento terapêutico que permite o tratamento de oclusão coronariana sem a necessidade de procedimentos cirúrgicos. Esse

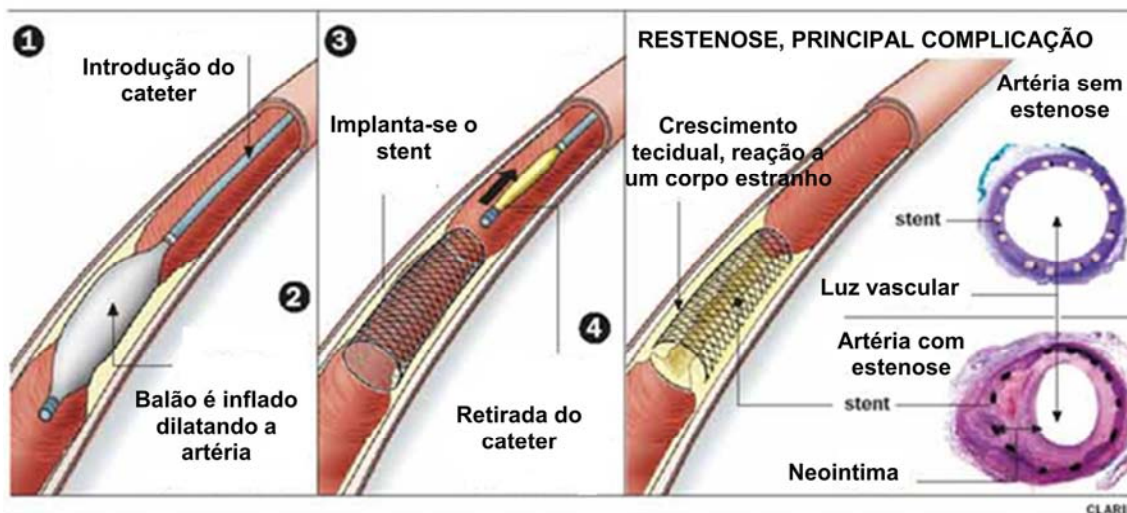


procedimento é comumente executado inflando um balão ligado a um cateter na região estenosada de forma a dilatar a artéria e assim, melhorar o fluxo sanguíneo na região. Entretanto, a ruptura de placa com obstrução vascular aguda, retração vascular e o processo de restenose (representado na figura 6) podem ocorrer a partir deste procedimento (GIORDANO e ROMANO, 2011; TSIGKAS *et al.*, 2011).

Diversas estratégias, com o intuito de melhorar a técnica de balão cateter, têm sido desenvolvidas. Os *stents* foram introduzidos na clínica entre os anos de 80 e 90, com o objetivo de restabelecer o fluxo coronariano prevenindo a oclusão aguda, bem como o processo de restenose causado, com grande frequência, pelo balão cateter (GIORDANO e ROMANO, 2011). Porém, em 1994 surgiram os primeiros relatos de restenose tardia provocados pelo uso do *stent* e, desde então, a restenose vem sendo considerada a maior desvantagem na tentativa do processo de revascularização (GIORDANO e ROMANO, 2011; TSIGKAS *et al.*, 2011; DARDAS *et al.*, 2011).

Atualmente, cerca de 30% dos pacientes submetidos à colocação de *stent* sofrem com a restenose, portanto ela se torna um problema recorrente e independente do tipo de angioplastia (TSIGKAS *et al.*, 2011; JOLLY *et al.*, 1999; TIMMINS *et al.*, 2011). Quando se analisa outros leitos, esse número pode ser ainda mais alarmante, como por exemplo, processos de isquemia crônica de leito mesentérico podem chegar até 64% de chances de restenose (MALGOR *et al.*, 2010).

A hiperplasia da íntima é o evento central causador da restenose após colocação de um *stent*. A restenose ocorre em conjunto com a migração de células musculares lisas vascular advindas da camada média através da ruptura da barreira endotelial provocado pelo estiramento mecânico. Assim, essa contínua proliferação dá origem à neointima, que por sua vez, leva a obstrução vascular. A participação de citocinas e fatores de crescimento como o fator de crescimento de fibroblasto (FGF – *fibroblast growth factor*) e PDGF, podem contribuir ainda mais com a hiperplasia de íntima. Além disso, componentes inflamatórios envolvidos na sinalização do fator de transformação do crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$  – *transforming growth factor- $\beta$* ) também participa na patogênese da lesão. Em estágios mais avançados, a neointima está rica em componentes da matriz extracelular incluindo proteoglicanos e colágeno, que são os principais constituintes da lesão (GIORDANO e ROMANO, 2011; TIMMINS *et al.*, 2011; NUNES, ALFONSO e OLIVEIRA, 2004).



**Figura 6 - Representação esquemática do desenvolvimento do processo de restenose vascular.**

Fonte: Modificado de SPINELLI (2005).

## 1.7 Células Tronco

A pesquisa com células tronco começou em 1945 logo após os ataques nucleares às cidades de Hiroshima e Nagasaki, locais onde milhares de pessoas morreram, não só pelo ataque, mas também devido à exposição prolongada de baixas doses de radiação. Essa exposição prolongada comprometeu o sistema hematopoiético de forma a impossibilitar a regeneração suficiente de células “brancas” do sangue, para proteção contra infecções, ou de plaquetas, comprometendo a coagulação sanguínea. Altas doses de radiação também acabaram destruindo as células tronco do trato intestinal, resultando em mortes mais rápidas. Mais tarde, o mesmo efeito foi demonstrado em camundongos quando expostos à radiação X e, quando receberam uma dose letal mínima, morriam devido à falência do sistema hematopoiético em aproximadamente duas semanas pós-irradiação. No entanto, quando apenas um osso ou o baço do animal foi protegido da radiação, eles não desenvolveram essa síndrome (NIH, 2006).

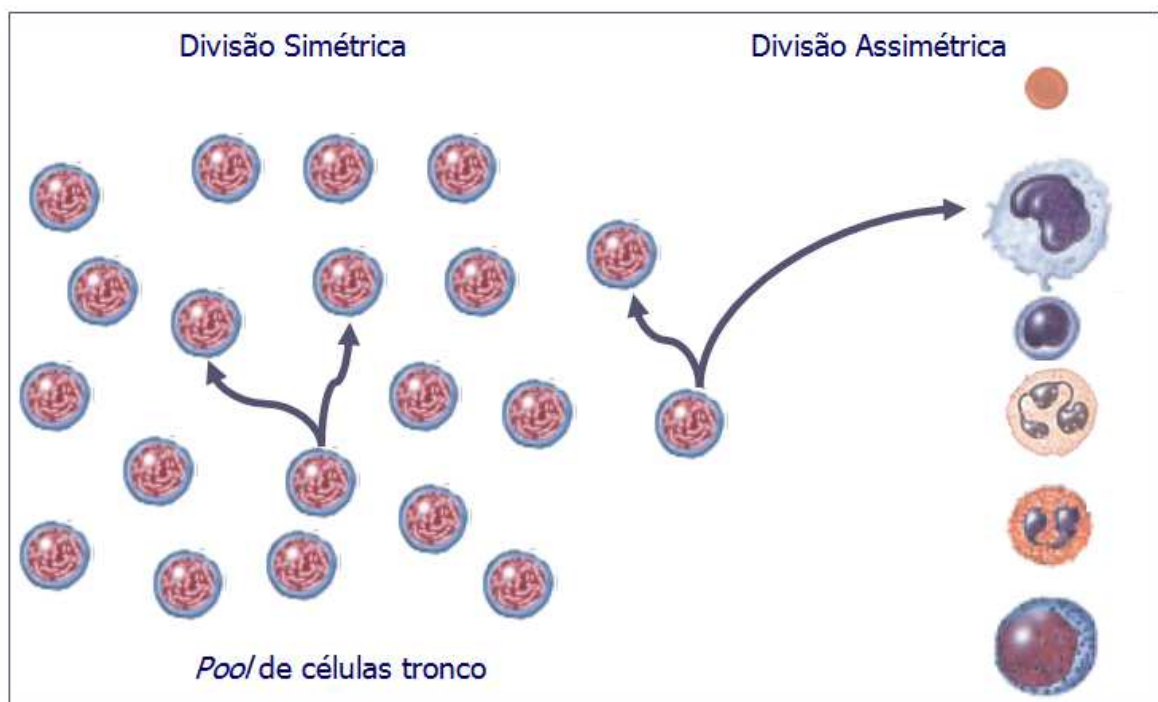
Após essas evidências, Lorenz, Congdon e Uphoff em 1952, utilizando cepas de animais isogênicos, demonstraram que a morte por falência do sistema hematopoiético poderia ser evitada se utilizasse uma injeção de células hematopoiéticas derivadas, por exemplo, da medula óssea de um animal doador, ou

se fizesse um transplante de baço saudável para um animal irradiado. Em 1956, foi demonstrado que injeções de células da medula óssea regeneravam as células do sistema sanguíneo ao invés de liberar fatores que recuperariam as células lesadas do receptor pela irradiação (GENGOZIAN *et al.*, 1957; FORD *et al.*, 1956; NOWELL *et al.*, 1956). A partir desses estudos, desenvolveu-se a idéia de células tronco, que são células com capacidade de autorenovação e são capazes de realizar divisão assimétrica (Figura 7), ou seja, podem originar células que permanecem indiferenciadas além de dar origem a células especializadas. Embora a maioria das células do organismo, como as do coração ou pele são comprometidas com a diferenciação tecido específica, as células tronco não estão comprometidas com uma diferenciação sítio específica até serem estimuladas. Sua capacidade proliferativa com a habilidade de se especializar faz da célula tronco única (NIH, 2001; ZAGO e COVAS, 2006; MOTHE *et al.*, 2011).

As células tronco podem ser classificadas quanto a sua plasticidade, ou seja, capacidade de dar origem a diferentes tipos de tecido (totipotente, pluripotente, multipotente ou unipotente) e quanto à sua origem, sendo embrionárias ou adultas (NIH, 2001; ZAGO e COVAS, 2006; QING-BO, 2005). As células tronco totipotentes são células do início da vida embrionária (até o 4º dia de gestação), são capazes de originar um organismo completo uma vez que têm a capacidade de gerar todos os tipos de células do corpo, incluindo os anexos embrionários, como por exemplo, a placenta (NIH, 2001; ZAGO e COVAS, 2006). As células tronco pluripotentes têm a capacidade de gerar células dos três folhetos embrionários (tecidos primordiais do estágio inicial do desenvolvimento embrionário, que darão origem a todos os outros tecidos do organismo, que são o ectoderma, mesoderma e endoderma (NIH, 2001; ZAGO e COVAS, 2006; GEARHART, 1998; YU e THOMSON, 2008). Em oposição, as células totipotente não podem originar um indivíduo como um todo porque visto que, não conseguem gerar os anexos embrionários; enquanto que as células multipotente, têm capacidade de gerar um número limitado de células especializadas. As células multipotente são encontradas em quase todo o corpo, sendo capazes de gerar células do tecido de que são provenientes, tendo como exemplo, as células tronco mesenquimais (NIH, 2001; ZAGO e COVAS, 2006; MOTHE *et al.*, 2011). Por fim, também existem células tronco unipotente que são capazes de originar apenas um tipo celular sobre condições normais, sendo a

maioria das células tronco tecido-específicas, como as encontradas no tecido cerebral (NIH, 2001).

Com relação à origem, elas podem ser classificadas como embrionárias, que são células tronco pluripotente que crescem *in vitro* na forma de linhagens derivadas de embriões humanos (NIH, 2001; ZAGO e COVAS, 2006; YU e THOMSON, 2008; THOMSON *et al.*, 1998) e células tronco adultas, as quais podem ser obtidas após a fase embrionária (recém-nascido, adulto). Essas células são tecido-específicas, ou seja, possuem capacidade de diferenciação limitada (NIH, 2001; ZAGO e COVAS, 2006).



**Figura 7 - Esquema de divisão simétrica e assimétrica das células tronco.**

Fonte: Modificado de ZAGO e COVAS (2006).

## 1.8 Células Tronco Adultas

Assim como as células tronco, as células tronco adultas possuem ao menos duas características. Primeiro, possuem a capacidade de gerar cópias idênticas por longos períodos. Essa capacidade proliferativa é conhecida pelo termo auto-

renovação. Segundo, podem dar origem a células maduras que possuem características morfológicas e função especializada (NIH, 2001; DOTSENKO, 2010).

Normalmente, as células tronco geram um ou vários tipos de células intermediárias antes de atingir seu estado totalmente diferenciado. Esse tipo de célula intermediária é chamado de célula progenitora ou precursora. As células progenitoras, tanto em tecido fetal quanto adulto, são parcialmente diferenciadas e, quando se dividem, dão origem a células comprometidas com o tecido em questão. Essas células são consideradas “comprometidas” com a diferenciação ao longo de um caminho de desenvolvimento celular, embora essa característica pode não ser tão definitiva quanto se pensava (NIH, 2001; QING-BO, 2005).

As células tronco adultas também são capazes de dar origem a células totalmente diferenciadas com fenótipo de células maduras, sendo totalmente integradas ao tecido e capazes de assumir funções especializadas no tecido. O termo fenótipo se refere a todas as características observáveis em uma célula (ou organismo); formato (morfologia); interação com outras células e do ambiente não celular (matriz extracelular); proteínas que aparecem na superfície celular (marcadores de superfície) e o comportamento celular (secreção, contração e transmissão sináptica) (NIH, 2001; DOTSENKO, 2010; STEINMETZ, NICKENIG e WERNER, 2010).

Além de dar origem a células especializadas no tecido ao qual residem, as células tronco adultas podem dar origem a diferentes tecidos provenientes do mesmo anexo embrionário. A característica tronco dessas células é conhecida pelo termo de plasticidade ou transdiferenciação (NIH, 2001; DOTSENKO, 2010).

## **1.9 Medula Óssea**

A noção de que a medula óssea contém células tronco não é nova. Uma população de células da medula óssea, as células tronco hematopoiéticas (CTH), é reconhecida por formar todos os tipos de células do sangue. As CTH foram descobertas há 40 anos (ZAGO e COVAS, 2006). Células estromais da medula óssea, uma mistura de células que originam osso, cartilagem, gordura, tecido conectivo fibroso e a rede reticular que sustenta a formação de células sanguíneas, foram descritas logo após a descoberta das CTH (NIH, 2001; DOTSENKO, 2010).

Recentemente, uma população de células progenitoras que se diferenciam em células endoteliais, um tipo de célula que reveste os vasos sanguíneos, foram isoladas do sangue circulante e identificadas como originárias da medula óssea. Essas células progenitoras endoteliais (CPE) lembram os angioblastos, células que dão origem aos vasos sanguíneos durante o desenvolvimento embrionário. Sendo assim, a medula óssea contém ao menos três tipos de populações tronco: as células tronco hematopoiéticas, as células estromais (mesenquimais) e as células progenitoras endoteliais (NIH, 2001; DOTSENKO, 2010; STEINMETZ, NICKENIG e WERNER, 2010).

Diversos são os marcadores de superfície utilizados para identificar as CTH derivadas do sangue e medula óssea. CTH e CPE expressam em sua superfície c-kit (CD 117), CD90, CD34, Sca-1, CD133, FLK-1 (VEGFR-2) dentre outros (NIH, 2006; NIH, 2001; DOTSENKO, 2010; STEINMETZ, NICKENIG e WERNER, 2010).

### **1.10 Células Progenitoras Endoteliais (CPE's)**

As células endoteliais compõem a superfície interna de todos os vasos sanguíneos do organismo. Durante o desenvolvimento embrionário, após a gastrulação, um tipo celular chamado de hemangioblasto, que é derivado do mesoderma, é o precursor tanto da linhagem hematopoiética quanto endotelial. A vascularização embrionária formada nesse estágio é transitória e consiste em ilhotas sanguíneas no saco vitelino. No embrião, o processo de desenvolvimento dos vasos sanguíneos é conhecido por vasculogênese, enquanto que no tecido adulto a formação de novos vasos se dá a partir de vasos já existentes e recebe o nome de angiogênese (NIH, 2001; DOTSENKO, 2010).

Devido aos diferentes marcadores que identificam as CPE's uma definição exata para esse tipo de células seria um julgamento equivocado e precoce, visto que os estudos com esse tipo celular ainda são muito recentes (DOTSENKO, 2010; STEINMETZ, NICKENIG e WERNER, 2010; ZAMPETAKI, KIRTON e XU, 2008). Essas células foram descritas pela primeira vez por Asahara et al. em 1997. Atualmente especula-se a existência de duas linhagens de CPE's, as CPE-precoces e as CPE-tardias (a diferença entre elas se dá por marcadores de superfície), além

de monócitos/macrófagos com características de células endoteliais *like* derivadas de CPE's. Sendo assim, a definição de CPE talvez não deva se restringir a uma única linhagem celular ou a combinações de marcadores de superfície, mas incorporar uma família com subclasses funcionalmente associadas à regeneração de células endoteliais. A capacidade de formação de novos vasos e sua contribuição para o reparo do endotélio lesado através da substituição de células endoteliais parece ser o que realmente define uma CPE (STEINMETZ, NICKENIG e WERNER, 2010; ZAMPETAKI, KIRTON E XU, 2008).

### 1.11 Terapia Celular

O termo terapia celular descreve um conjunto de limites pouco precisos de métodos e abordagens tecnológicas fundamentadas no conhecimento de várias ciências que visam à utilização de células para tratamento de doenças. A forma mais antiga de terapia celular é a transfusão de elementos sanguíneos, um dos procedimentos terapêuticos mais amplamente utilizados no mundo todo (ZAGO e COVAS, 2006).

Atualmente, o principal foco da terapia celular é a medicina regenerativa, em que se busca a substituição de células ou tecidos lesados, senescentes ou perdidos, para restaurar sua função. Isso explica a atenção despertada para as moléstias que são alvos desses tratamentos e constituem as principais causas de morte e de morbidade das sociedades modernas, como as doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, pneumopatias e doenças genéticas (ZAGO e COVAS, 2006).

Apesar de os resultados com terapia celular serem controversos (PORTO *et al.*, 2011) para o tratamento de doenças cardiovasculares, têm se dado muita importância e ênfase para as células tronco provenientes da medula óssea e baço. Acredita-se que a administração celular irá reparar o tecido lesado repovoando-o (STEINMETZ, NICKENIG e WERNER, 2010; WERNER e NICKENIG, 2006a), estimulará o recrutamento de células tronco endógenas para auxiliar no reparo tecidual, atuará secretando diversos fatores (VEGF, TGF- $\beta$ , MMP-2, IL-10, TIMP-1 dentre outros) a fim de promover um efeito parácrino além de desenvolver um papel imunomodulatório no ambiente a ser reparado (MIROTSOU *et al.*, 2010). Assim, o

presente estudo propõe avaliar os efeitos da terapia celular sobre animais ateroscleróticos.





# **OBJETIVOS**



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar o tratamento tópico de células mononucleares (CMN) na estenose induzida na carótida de camundongos ApoE<sup>-/-</sup>.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influencia do tratamento com CMN sobre o perfil lipídico dos animais;
- Avaliar o efeito da terapia celular sobre a evolução da lesão aterosclerótica;
- Quantificar a área de luz vascular dos grupos experimentais;
- Verificar se a indução da estenose promoveu remodelamento vascular, através da análise dos parâmetros relação parede/luz, razão de remodelamento e espessamento de parede;
- Avaliar redução da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) nos animais tratados com CMN;
- Observar redução de corpos apoptóticos na carótida dos camundongos tratados com CMN.
- Verificar a presença de células progenitoras proveniente do tratamento com CMN no endotélio vascular.



# **METODOLOGIA**

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Animais Experimentais.

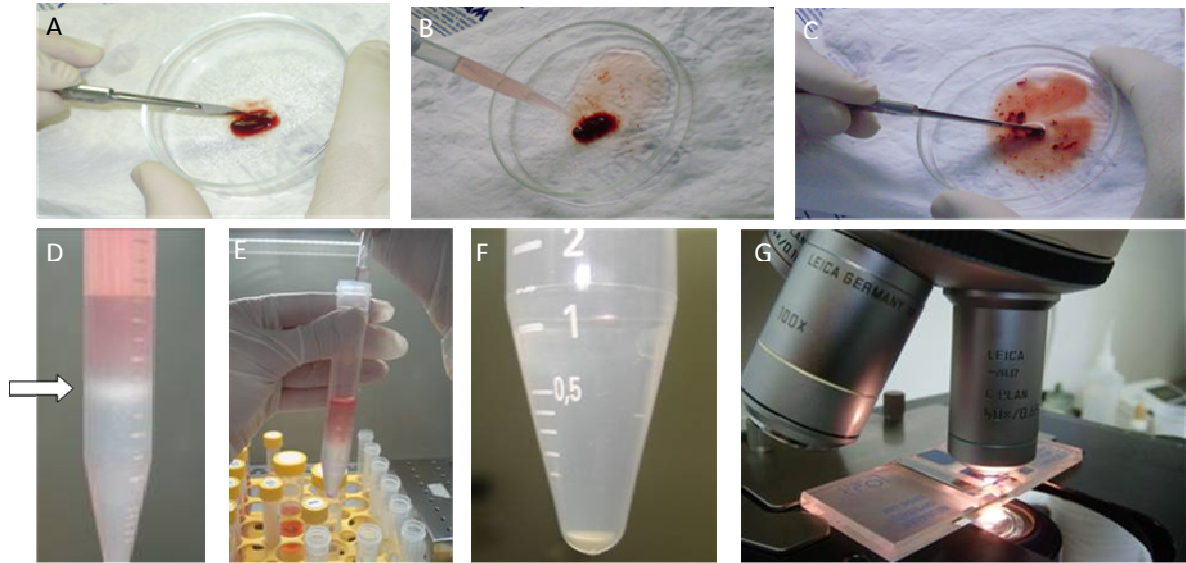
Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), *Knockout* para a Apolipoproteína E (ApoE<sup>-/-</sup>), fêmeas, com 5 meses de idade, aleatoriamente divididos em dois grupos: CMN (n=6; tratados com CMN) e Salina (n=6; tratados com salina). Também foram utilizados camundongos transgênicos para a proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*, GFP<sup>+/-</sup>), machos com 3 meses de idade como doadores de células mononucleares. Todos os animais foram provenientes do biotério do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular (LTCC), do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo com garantia de serem isogênicos, ou seja, filhos de casais irmãos, portanto, com o mínimo de variabilidade genética. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais onde receberam água e ração *ad libitum* e tiveram controlado o ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como temperatura (22±2°C) e umidade (70%) do ambiente.

Os aspectos éticos, a utilização e o manuseio experimental dos animais estavam de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO) e *American Physiological Society* (APS). O protocolo experimental foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória – EMESCAM (protocolo 007/20008).

#### 3.2 Isolamento das Células Mononucleares do Baço

Para o isolamento, foram utilizados camundongos *GFP* machos de 3 meses de idade. Os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico tiopental sódico (100mg/kg, *ip*). Todo o material era previamente autoclavado para evitar a contaminação das células. O animal era higienizado com álcool 70%, o baço removido, através de uma pequena incisão no flanco esquerdo, e colocado em placa de Petri sobre o gelo. Com o auxílio de um bisturi, o órgão era macerado e meio de

cultura DMEM (Meio Essencial de *Eagle* Modificado por Dulbecco; Sigma) adicionado à placa de Petri para nutrir as células. O material foi homogeneizado, transferido para um tubo cônico em um volume de 5mL (células + meio de cultura) e centrifugado por 10 minutos a 1200rpm. O sobrenadante foi desprezado, as células ressuspensas em DMEM e lentamente colocadas sob gradiente de densidade (Histopaque 1083; Sigma), específico para células de camundongos. Em seguida, o material foi novamente centrifugado por 30 minutos a 1500rpm em centrífuga de rotor móvel (Eppendorf, centrifuge 5702) para separação das células mononucleares. Após a centrifugação, duas fases foram observadas: uma aquosa composta pelo meio de cultura, proteínas plasmáticas e plaquetas; e uma orgânica que consiste no gradiente de densidade, granulócitos e hemácias precipitados. Na interface, se encontra um anel (região turva) formado pelas células mononucleares (células indiferenciadas, linfócitos, monócitos e blastos). Este anel de células mononucleares (CMN) foi delicadamente coletado com uma pipeta de vidro e transferido para um novo tubo cônico. Em seguida, solução salina tamponada (*Phosphate Buffer Solution* – PBS; GIBCO) foi adicionada ao tubo e este centrifugado por 10 minutos a 1200rpm. Essa lavagem foi repetida três vezes para garantir a remoção completa do gradiente de densidade que é altamente tóxico para as células. Após a última lavagem, o PBS era removido, as células ressuspensas em 1mL de DMEM e uma alíquota separada para contagem na câmara de Neubauer.



**Figura 8 - Isolamento de células mononucleares.** Foi retirado o baço do animal *GFP*, colocado em uma placa de Petri sobre o gelo para ser macerado (A e B respectivamente). Em seguida, o baço era homogeneizado em meio de cultura DMEM (C) para posterior centrifugação e visualização e coleta da nuvem de células mononucleares (CMN; D e E respectivamente). Após a coleta, as CMN eram lavadas com Salina (F) para então ser lidas na Câmara de Neubauer.

### 3.3 Contagem das Células Mononucleares na Câmara de Neubauer

A contagem das células mononucleares em câmara de Neubauer, também conhecida como hemocitômetro, é um método manual tradicional que permite estimar o número de células por mililitro de suspensão. A câmara de Neubauer é um tipo especial de lâmina de microscópio composta por duas câmaras de contagens separadas por uma depressão transversal. Cada câmara contém uma superfície espelhada quadriculada de dimensão 3x3 mm. A contagem total do número de células é realizada nos quatro quadrantes das duas câmaras de contagem seguindo sempre a mesma direção e usando o esquema do “L” para que a mesma célula não seja contada duas vezes. Portanto, as células que se encontravam sobre as linhas de baixo e da direita não eram contadas. Para determinação do número de células obtido, foi realizada uma diluição 1:10 (v/v) da suspensão celular obtida em PBS (GIBCO). Em seguida uma alíquota desta solução foi diluída 1:2 (v/v) em solução de Turk (ácido acético 2% com azul de metileno; tem função de lisar hemáceas), e uma

alíquota desta última solução foi novamente diluída 1:2 (v/v) em solução de azul de Tripano 0,4% (com função de corar células mortas). A Solução (células/Turk/Tripano) foi homogeneizada e colocada em um lado da câmara de Neubauer para contagem com auxílio do microscópio óptico (Quimis, modelo Q730I) no aumento de 40x. Foram feitas duas contagens e a média do número de células foi calculada. O critério para utilização ou descarte das células isoladas era viabilidade celular superior a 85%. A equação utilizada para determinar o número de células por mililitro foi:

$$QC = FD \times 10^4 \times 1 \text{ mL} \times \underline{n^{\circ} \text{ de células}}; \text{ onde:}$$

4

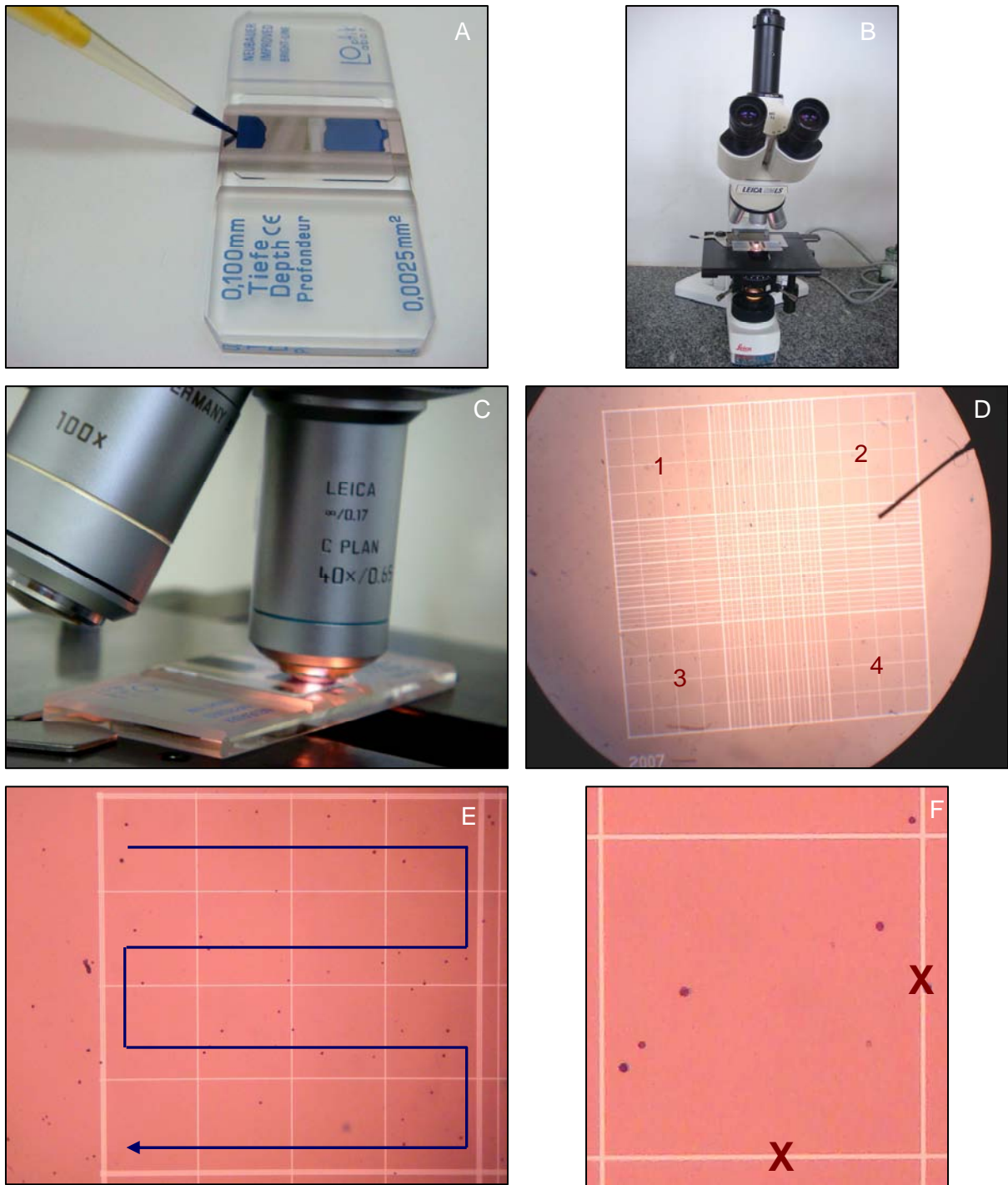
FD → Fator de diluição (40x);

$10^4$  → Fator de correção da Câmara de Neubauer;

1 mL → Volume da amostra;

Nº de células → Média do número de células contadas.

4



**Figura 9 - Contagem celular em câmara de Neubauer.** Suspensão celular misturada com os corantes sendo adicionada a câmara (A), a análise foi feita em microscópio óptico (B), no aumento de 40X (C), as células foram contadas nos quatro quadrantes externos da câmara, indicados pelos números (D), detalhe de um quadrante mostrando o sentido da contagem (E) e as células que se encontravam sobre as linhas marcadas com o x não eram contadas (F).



### 3.4 Análise da Viabilidade Celular

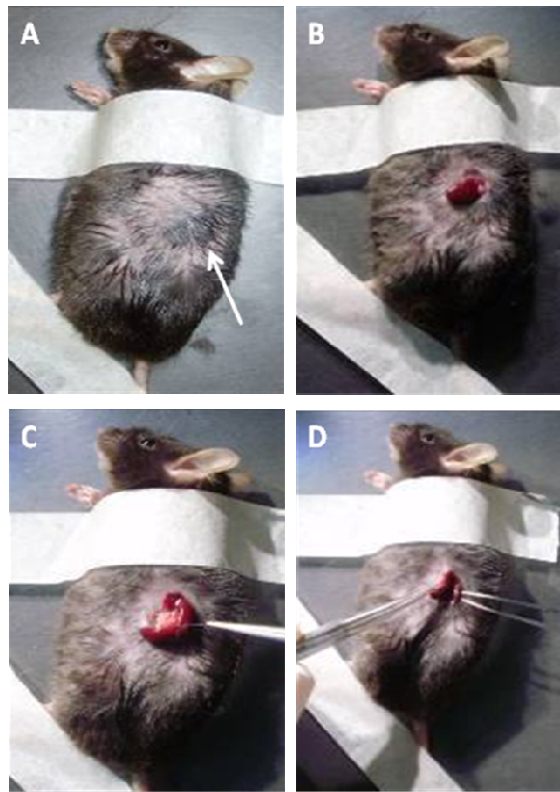
A viabilidade celular foi avaliada utilizando o método de exclusão do corante azul de Tripiano durante a contagem celular na câmara de Neubauer. Por este método, as células mortas se coram de azul, pois sua membrana é permeável ao corante, enquanto que a membrana das células vivas não. Desta maneira, ao visualizar as células ao microscópio, observam-se as células mortas coradas em azul e as vivas transparentes. Para calcular o percentual de células viáveis, a média de células vivas foi dividida pela média total de células (vivas e mortas) contadas na câmara de Neubauer. O valor obtido foi multiplicado por 100 e, dessa forma, a viabilidade é dada em porcentagem.

$$\text{Viabilidade} = \frac{\text{Células vivas} \times 100}{\text{Células totais}}$$

É importante destacar que a viabilidade celular deve ser maior que 85%, mostrando que o procedimento utilizado para o isolamento das células mononucleares do baço foi executado da maneira correta.

### 3.5 Esplenectomia

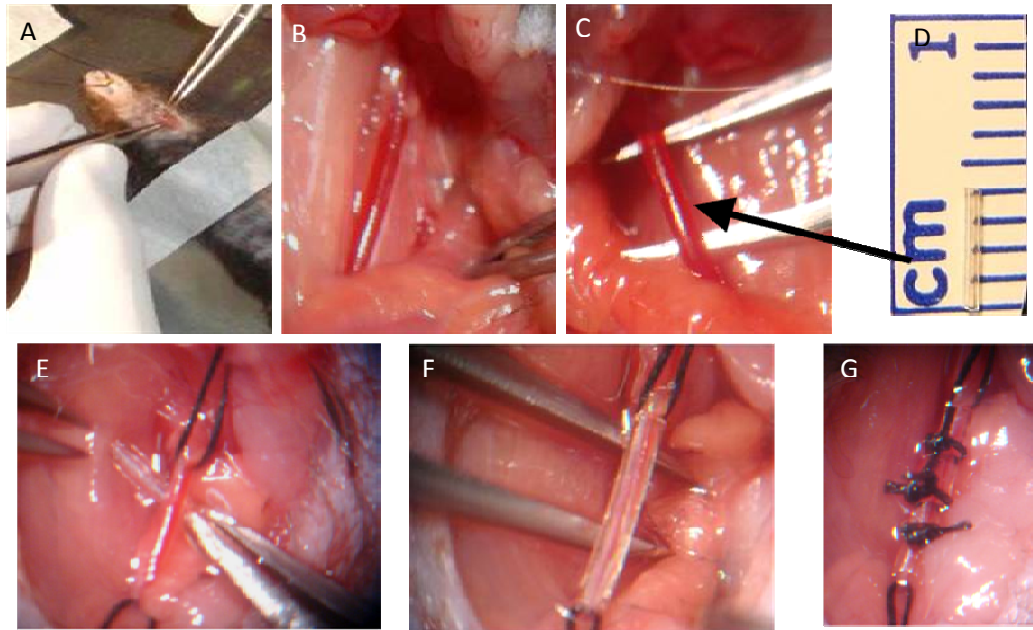
Camundongos ApoE<sup>-/-</sup> fêmeas de 5 meses de idade foram anestesiados com uma mistura de ketamina e xylazina (91:9,1 mg/Kg, *ip*). Após tricotomia, foi realizada uma incisão no flanco esquerdo do animal para exposição do baço. Com uma linha de seda 4.0, tanto a artéria quanto a veia foram amarradas e o baço do animal removido. Em seguida, a camada muscular e a incisão foram suturadas, respectivamente, com *Catgut* 4.0 e Fio de seda 4.0.



**Figura 10 – Esplenectomia.** Figura A mostra o animal anestesiado e fixo à mesa de cirurgia o qual é submetido à tricotomia do flanco esquerdo para visualização do baço (seta branca). Em B é realizada uma incisão no flanco para exposição e retirada do baço (C) e em seguida, sutura da região (D).

### 3.6 Realização da Estenose Experimental

A estenose experimental foi realizada simultaneamente com a esplenectomia. Portanto, após a esplenectomia, foi realizada uma incisão cervical nos animais para permitir o acesso à artéria carótida. Com auxílio de uma lupa cirúrgica (Opto Eletrônica S/A Brasil) a artéria carótida comum foi isolada para a colocação de um anel silástico (0,5 mm de diâmetro externo e 0,3 mm de diâmetro interno; Clay-Adams, USA) com 4 mm de comprimento. O silástico foi colocado em volta da artéria carótida comum esquerda a fim de provocar um fluxo turbilhonar e, assim, acelerar a formação de placa ateromatosa. O anel foi amarrado em 3 pontos distintos e a incisão suturada com Fio de Seda 4.0. Durante a cirurgia, o animal foi mantido aquecido sobre uma manta cirúrgica em 37°C e foram observados até se recuperarem da anestesia. Esta técnica é a mesma utilizada por von der Thüsen *et al* (2001).



**Figura 11 – Colocação do anel silástico.** A Figura mostra como é realizado o procedimento de colocação do anel silástico (cuff) ao redor da carótida comum esquerda. É realizada uma incisão cervical (A) para exposição e dissecação da artéria carótida (B e C respectivamente) para colocação do anel silástico de 4 mm de diâmetro (D). Com auxílio de duas pinças, o cuff é colocado ao redor da artéria e posteriormente amarrado em 3 pontos para permanecer fixo e proporcionar a formação de placa aterosclerótica (E, F e G respectivamente).

### 3.7 Tratamento *in situ* com Células Mononucleares

Dez dias após a colocação do anel silástico, os animais foram novamente anestesiados com uma mistura de ketamina e xylazina (91:9,1 mg/Kg, *ip*), e com auxílio de uma lupa cirúrgica (Opto eletrônica S/A Brasil) novamente foi realizada uma incisão cervical para exposição e isolamento da artéria carótida para que com muito cuidado, o anel silástico fosse removido. Em seguida, os animais do Grupo CMN receberam  $1 \times 10^6$  CMN (em 20  $\mu$ L de salina) isoladas dos camundongos *GFP*, enquanto que os animais do Grupo Salina receberam apenas 20  $\mu$ L de solução salina, ambos de forma tópica. Após o tratamento, a incisão foi suturada com fio de seda 4.0. Durante a cirurgia, o animal foi mantido aquecido sobre uma manta cirúrgica em 37°C e foram observados até se recuperarem da anestesia. Os protocolos seguintes foram todos realizados 7 dias após o tratamento com CMN ou salina.

### 3.8 Histoquímica

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (100 mg/kg, IP), e posteriormente realizou-se uma incisão torácica de forma que o coração estivesse com livre acesso para realização da perfusão no animal. Após exposição do coração, foi feita uma pequena incisão no átrio direito para extravasamento do sangue e 50 mL de tampão fosfato salina (PBS: 0,1 M; pH 7,4) foi infundido no ventrículo esquerdo, seguido de 50 mL de paraformaldeído (4%). As soluções foram infundidas no coração com pressão controlada mimetizando a pressão arterial média do animal objetivando preservar o formato das artérias, evitando possíveis rupturas e degradação das placas ateromatosas. Ao término da perfusão, a artéria carótida comum esquerda foi removida e estocada em microtubos contendo paraformaldeído 4% até o momento da preparação histológica.

A amostra foi emblocada em Tissue-Tek (Tissue-Tek; Sakura Finetek USA, Inc. Torrance, CA, USA) e seccionadas transversalmente (8 µm) utilizando um micrótomo criostato (Leica, modelo CM 1850). Os cortes teciduais foram realizados em quadruplicata e posicionados em lâminas de vidro previamente gelatinizadas (1%) para adesão do tecido.

Para localização de lipídeos neutros, os cortes foram incubados com o corante *Oil-red-O* (Sigma, USA) durante 15 minutos e, decorrido este tempo, lavados em água corrente por 10 minutos. Para visualização das células que compõem as diferentes camadas da parede do vaso, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE). Inicialmente, os cortes foram expostos à solução de hematoxilina por 1 minuto, lavados por 15 minutos em água corrente e, em seguida foram expostos à solução de eosina por 3 minutos seguidos de uma última lavagem em água corrente por 5 minutos.

Ao término das colorações, foi adicionada solução de montagem específica (glicerol em PBS e azida sódica 0,1%; Mounting Medium, Sigma) e uma lamínula sobre os cortes. A borda entre a lâmina e a lamínula foi recoberta com esmalte para evitar a evaporação da solução de montagem e preservar os cortes.

### 3.9 Análise Morfométrica

Com o uso de um microscópio trinocular (Olympus AX70) acoplado a uma câmera digital (VK-C150, Hitachi, Japão) fez-se a captura de imagens das lâminas, e estas foram analisadas em programas específicos (Image J, versão 1.4). Para captura das imagens foram utilizadas objetivas de 10x e 20x, de modo que a ampliação final real na tela do monitor (13") foi igual a 126x e 1260x respectivamente. Todas as imagens obtidas foram de 640x480 pixels, e foram analisados 10 cortes de cada animal.

Para medições das imagens capturadas com a objetiva de 10x, foram analisados 5 cortes transversos por animal e, através das ferramentas oferecidas pelo programa Image J (versão 1.4) fez-se a medida de 2 diâmetros. Devido à forma elíptica do vaso, e assim existirem diferentes diâmetros, foi necessário calcular a média dos diâmetros para que se obtivesse a área da seção transversal do vaso e da luz vascular, para que indiretamente fosse realizada a medida da área de parede do vaso. Foram utilizados 2 diâmetros para o cálculo da área total vascular (ATv), sendo estes o de maior e menor diâmetro da elipse, que vão do limite da lâmina elástica externa (divisão entre as camadas adventícia e média) de um lado ao lado contra-lateral do vaso. Em seguida após a obtenção da média dos diâmetros, fez-se a divisão do diâmetro por 2 para obtenção do raio ( $r$ ) do vaso, para que assim, pudesse ser calculada a área do círculo com a fórmula:  $A = \pi \cdot r^2$ . O mesmo procedimento foi realizado para o cálculo da área da luz, mas os diâmetros se limitavam de um bordo ao outro oposto do endotélio vascular. As duas áreas foram calculadas isoladamente, obtendo-se uma área total vascular (ATv), que contém a área de parede somada à área de luz vascular (ALv). A área de parede, contendo as camadas média e íntima, foi determinada pela diferença entre as duas áreas (APv).

Também se calculou a razão de remodelamento ou índice de remodelamento (RR), através da razão entre a ATv dos animais dos grupos Salina e CMN pela ATv dos animais controles. Sendo considerado remodelamento positivo quando o  $RR > 1,05$ ; a ausência de remodelamento quando o RR entre 0,95 e 1,05; e o remodelamento negativo, quando o  $RR < 0,95$  (Pasterkamp *et al*, 1995a; Schoenhagen *et al*, 2000; Yang *et al*, 2003). Passando esses valores do RR para percentual temos: ausência de remodelamento quando o RR está entre 95 e 105;  $RR > 105$  indica remodelamento positivo e o  $RR < 95$  indica remodelamento negativo.

Utilizando o programa Image J, foi quantificada diretamente a área de deposição lipídica na parede vascular, incluindo as camadas média e íntima, os resultados foram expressos em  $\mu\text{m}^2$ . Foram analisados 5 cortes de secção transversa de cada animal em imagens capturadas com uma objetiva de 10x.

### **3.10 Dosagem de Colesterol Plasmático**

Imediatamente após os animais serem eutanasiados sobredose de anestésico tiopental sódico (100mg/kg, IP), 200 $\mu\text{L}$  de sangue foi coletado, através de punção intracardíaca, centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos e o soro transferido para um novo tubo. A dosagem do colesterol plasmático foi realizada utilizando um kit enzimático colorimétrico (Bioclin) e a análise foi realizada por espectrofotometria.

### **3.11 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's)**

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (100 mg/kg, IP) e perfundidos com 50 ml de solução de KREBS-Hepes (HEPES 9,4 mM; NaCl 132 mM; glicose 5 mM; KCl 4 mM;  $\text{MgCl}_2$  0,49 mM;  $\text{CaCl}_2$  1mM; pH 7,4 à 37°C). Após a perfusão, a artéria carótida comum esquerda foi removida e armazenada a -80°C.

No momento da análise, as carótidas foram emblocadas em Tissue Teck e foram feitos cortes de 8 $\mu\text{m}$  de espessura com auxílio de um micrótomo-criostato. Os cortes foram gentilmente posicionados sobre lâminas de vidro superfrost Plus®. Em seguida, as lâminas foram colocadas em estufa por 2 horas a 37°C e os cortes incubados com solução de dihidroetidina (2  $\mu\text{M}$ ) diluído em Krebs-HEPES pH 7,4 a 37°C por 30 minutos na ausência de luz. Ao final do período de incubação, as lâminas foram lavadas com solução salina tamponada (PBS) e mantidas à temperatura de 4°C. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência (Nikon Ti-S, EUA) equipado com filtro de comprimento de onda de 585nm (G-2E/C; Nikon, EUA) e câmera digital (Ds-Ri1; Nikon, EUA), e os dados analisados utilizando o *software* NIS Elements (Nikon).

### 3.12 Medida de Células Apoptóticas

Seguindo o mesmo passo de preparo da amostra da Medida de Ânion Superóxido, as lâminas foram secas a temperatura ambiente por 30 minutos e, em seguida, utilizando o protocolo de detecção de células apoptóticas *in situ* do *Kit* TUNEL assay (Roche), esses cortes foram fixados (Paraformaldeído 4% em PBS; pH 7,4) por 20 minutos a uma temperatura variando de 15 a 20°C com posterior lavagem em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esses passos, os cortes foram incubados com solução de bloqueio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em metanol) por 10 minutos à temperatura ambiente com posterior lavagem em PBS para que em seguida aplicasse por 2 minutos a 4°C a solução de permeabilização (Triton X-100 0,1% em citrato de sódio 0,1%). Após a aplicação da solução de permeabilização, as amostras foram incubadas com o reativo de TUNEL por 1 hora em câmara úmida protegida da luz à temperatura ambiente. Decorrido o tempo de marcação, os cortes foram lavados com PBS por 3 vezes e as lâminas foram cobertas com uma gota de PBS para serem então analisadas ao microscópio invertido de fluorescência (Nikon, modelo Eclipse Ti) em um comprimento de onda excitatório variando de 450-500 nm e uma faixa de detecção de 515-565 nm. Os parâmetros estabelecidos para o laser utilizados foram idênticos entre os grupos pesquisados. Para captura das imagens foram utilizadas objetivas de 10x e 20x de modo a analisá-las na objetiva de 10x em programa específico para análise de emissão de fluorescência (NIS Elements, Nikon).

### 3.13 Imunofluorescência para Identificação de Células Progenitoras

Seguindo o mesmo passo de preparo da amostra da Medida de Ânion Superóxido, as lâminas foram secas a temperatura ambiente por 30 minutos e, em seguida, os cortes foram fixados (Paraformaldeído 4% em PBS; pH 7,4) por 20 minutos a uma temperatura variando de 15 a 20°C com posterior lavagem em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esses passos, os cortes foram incubados com solução de bloqueio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em metanol) por 10 minutos à temperatura ambiente com

posterior lavagem em PBS para que em seguida aplicasse por 2 minutos a 4°C a solução de permeabilização (PBS + Tween 20 a 0,3%). Após a aplicação da solução de permeabilização, as amostras foram incubadas com anticorpo CD90-PE (*BD-Becton & Dickinson*; 1:100) por 1,5 horas em câmara úmida protegida da luz à temperatura ambiente. Decorrido o tempo de marcação, os cortes foram lavados com PBS (uma vez) e as lâminas novamente incubadas com anticorpo CD117-FITC (*BD-Becton & Dickinson*, 1:100). Ao término das marcações, as lâminas foram lavadas 1 vez com PBS e em seguida, cobertas com uma gota de PBS para serem então analisadas ao microscópio invertido de fluorescência (Nikon, modelo Eclipse Ti). Para captura das imagens foram utilizadas objetivas de 10x e 20x e programa específico para análise de emissão de fluorescência (NIS Elements, Nikon).

### **3.14 Autofluorescência de Células GFP**

As lâminas histológicas foram colocadas em estufa por 2 horas a 37°C e lavadas com PBS para retirada do Tissue Teck. Decorrida a lavagem, as lâminas foram cobertas com uma gota de PBS para então serem analisadas ao microscópio invertido de fluorescência (Nikon Ti-S, EUA) em um comprimento de onda excitatório variando de 450-500 nm e uma faixa de detecção de 515-565 nm e câmera digital (Ds-Ri1; Nikon, EUA), e os dados analisados utilizando o *software* NIS Elements (Nikon).





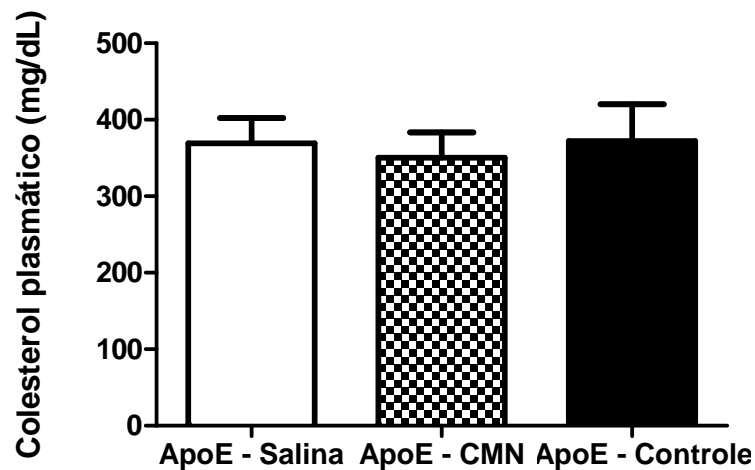
# **RESULTADOS**



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Medida de Colesterol plasmático

Conforme esperado, os valores de colesterol não apresentaram variação significativa entre os grupos (figura 12). Os animais ateroscleróticos, com seis meses de idade, que serviram como controle (Grupo Controle), apresentaram  $372,0 \pm 48,38$  mg/dL de colesterol plasmático enquanto que os animais que receberam solução salina (Grupo Salina) e terapia celular (Grupo CMN) apresentaram  $369,2 \pm 33,0$  mg/dL e  $350,3 \pm 33,17$  mg/dL respectivamente.

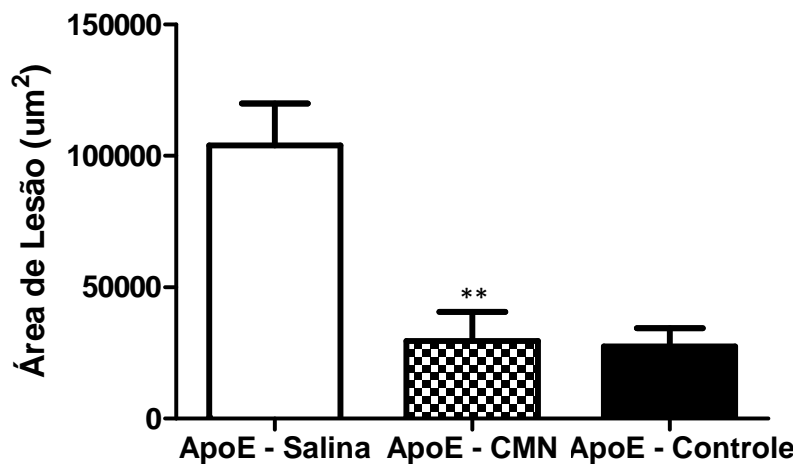


**Figura 12 - Medida de colesterol plasmático em mg/dL dos animais.** ApoE-Salina (n = 9), animais ApoE-CMN (n = 9) e animais ApoE-Controle (n = 6). Os valores indicam média±EPM.

## 4.2 Área de Deposição Lipídica

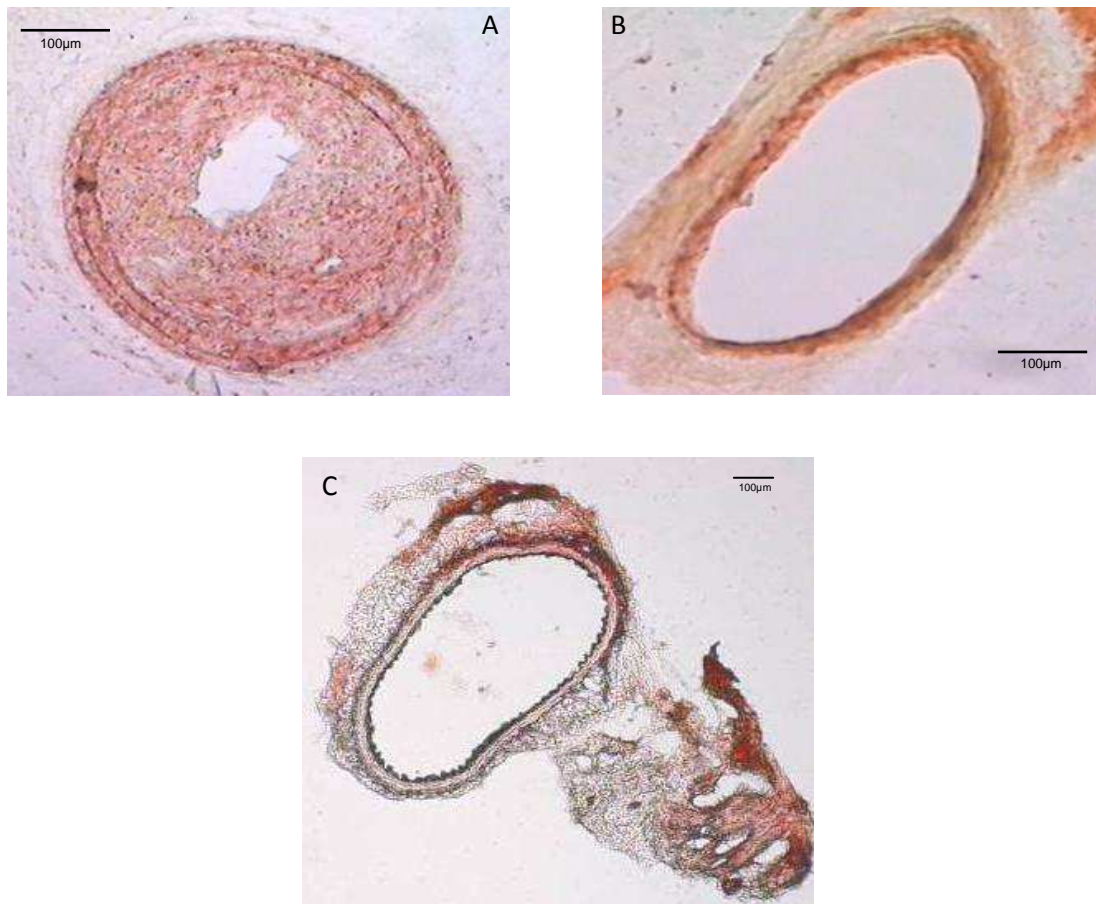
No gráfico mostrado na figura 13, pode ser observado um aumento da área de deposição lipídica do grupo Salina ( $104000 \pm 15940 \mu\text{m}^2$ ) demonstrando o sucesso na técnica de estenose utilizada, já descrita anteriormente.

Ainda na figura 2, pode-se notar uma redução significativa da área de lesão dos animais pertencente ao grupo CMN ( $29510 \pm 11200 \mu\text{m}^2$ ) chegando inclusive à parâmetros semelhantes aos animais do grupo Controle ( $27380 \pm 7093 \mu\text{m}^2$ ) com seis meses de idade; fato este que demonstra a eficácia do tratamento utilizado.



**Figura 13 - Área de deposição lipídica da carótida comum esquerda dos animais.** ApoE-Salina (n = 8), animais ApoE-CMN (n = 6) e animais ApoE-Controle (n = 5). Valores indicam média±EPM. \*\*p<0,01.

Na figura 14, podem-se observar cortes típicos da carótida comum esquerda, ilustrando a diferença na área de deposição lipídica, seguindo o padrão exposto no gráfico de barras.

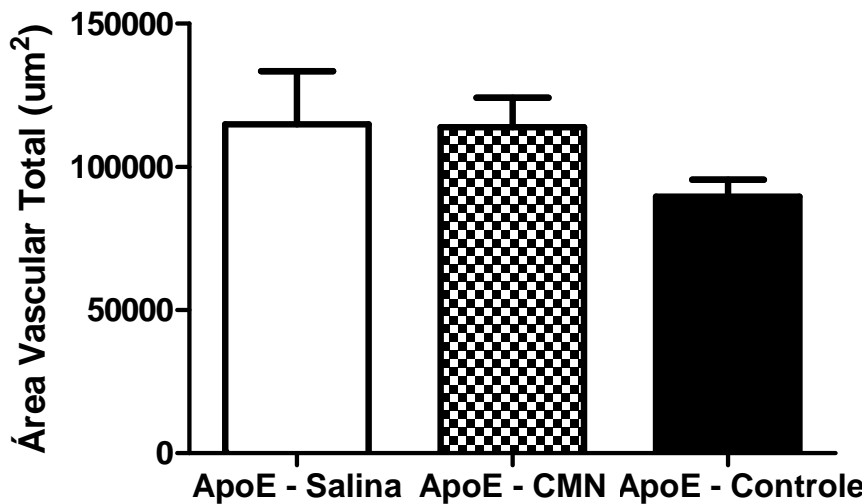


**Figura 14 - Cortes transversais típicos de carótida comum dos camundongos ApoE<sup>-/-</sup> coradas com Oil-Red-O.** Figura A representa o grupo ApoE-Salina, B, o grupo ApoE-CMN e a figura C, o grupo ApoE-Controle. As áreas coradas em vermelho indicam lesões ateroscleróticas. A barra preta possui 100 µm. Fotografia realizada com a objetiva de 10x.

### 4.3 Área Total Vascular (ATv)

No gráfico abaixo (figura 15), não se observa mudanças na área total dos vasos (área contida entre os limites da lâmina elástica externa) dos grupos estudados, grupo Salina;  $115000 \pm 18410 \mu\text{m}^2$  e grupo CMN;  $113900 \pm 10200 \mu\text{m}^2$ .

Quando foi comparada a área vascular total dos grupos Salina e CMN com o grupo Controle ( $89730 \pm 5808 \mu\text{m}^2$ ), também não foi observado diferença estatística na área vascular total.

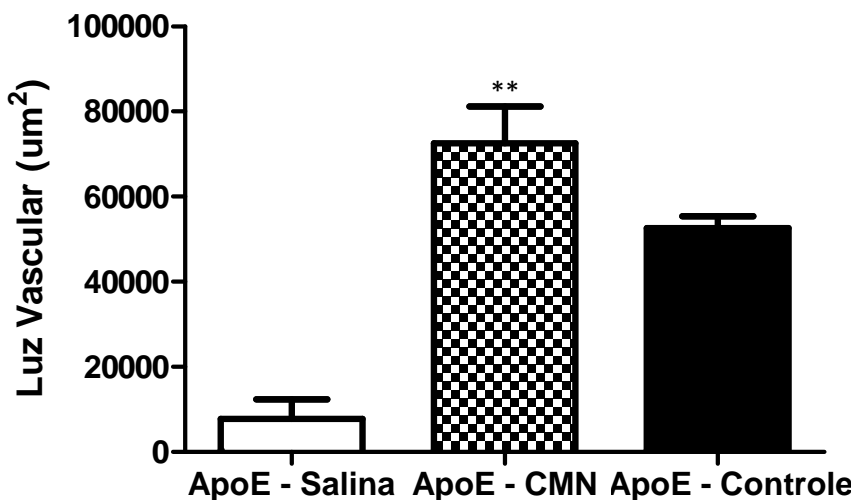


**Figura 15 - Área vascular total da carótida comum esquerda dos animais.** ApoE-Salina (n = 8), ApoE-CMN (n = 6) e ApoE-Controle (n = 5). Os valores indicam média±EPM.

#### 4.4 Área de Luz Vascular (ALv)

Ao analisar a figura 16, é possível notar uma redução significativa da luz vascular dos animais tratados com solução salina (grupo Salina;  $7800 \pm 4584 \mu\text{m}^2$ ) quando comparado com os animais que receberam CMN como forma de tratamento (grupo CMN;  $72550 \pm 8663 \mu\text{m}^2$ ). Ainda na figura 16, é possível observar que o tratamento foi capaz de restabelecer a luz do vaso, sem interferir na área vascular total (figura 4), a parâmetros de animais com seis meses de idade (grupo Controle;  $52640 \pm 2761 \mu\text{m}^2$ ).

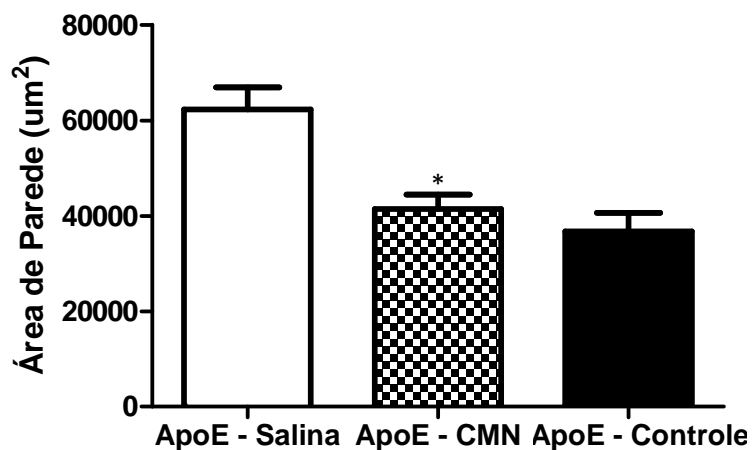
A figura 14 representa um corte transversal típico de carótida de camundongos ateroscleróticos, tornando um visualização mais clara da luz vascular, reforçando dessa maneira, a figura 16.



**Figura 16** - Gráfico da área luminal da carótida comum esquerda, em  $\mu\text{m}^2$ , dos animais. ApoE-Salina (n = 8), ApoE-CMN (n = 6) e ApoE-Controle (n = 5). Os valores indicam média+EPM. \*\* $p < 0,01$ .

#### 4.5 Área de Parede Vascular (APv)

O gráfico de barras, da figura 17, ilustra as diferenças da área de parede encontradas entre os diferentes grupos estudados. Pode ser observado que a aterosclerose implicou no aumento da espessura da parede vascular do grupo Salina ( $62310 \pm 4618 \mu\text{m}^2$ ) quando comparado o grupo CMN ( $41400 \pm 3065 \mu\text{m}^2$ ) demonstrando a eficácia do tratamento com CMN. Quando foi comparada a APv dos animais do grupo Controle ( $36690 \pm 3936 \mu\text{m}^2$ ) com o grupo CMN, pode-se notar que o tratamento foi capaz de restabelecer a parede vascular a parâmetros normais de uma animal aterosclerótico de seis meses de idade.



**Figura 17 – Área de parede vascular dos diferentes grupos estudados.** Animais ApoE-Salina (n = 8), ApoE-CMN (n = 6) e ApoE-Controle (n = 5). Os valores indicam média+EPM. \*p<0,05.

#### 4.6 Relação Parede/Luz (p/l)

A relação p/l está representada na tabela abaixo. De modo que a relação tende a estar aumentada no grupo Salina quando comparado ao grupo Controle; além disso, é possível notar também que não houve diferença entre o grupo CMN quando comparado ao grupo Controle.

**Tabela 1: Razão Parede/Luz (p/l)**

Grupos (n)	p/l
ApoE-Controle (5)	0,7±0,07
ApoE-Salina (8)	2,94±0,47
ApoE-CMN (6)	0,6±0,08**

Dados Expressos em média±EPM. \*\*p<0,01

#### 4.7 Razão de Remodelamento (RR)

A razão de remodelamento tem como referência a ATv do animal ApoE-Controle. Por isso, seu valor é considerado 1,0±0,05%, sendo este o padrão da normalidade. Lembrando-se que é considerado como remodelamento positivo quando RR>1,05; ausência de remodelamento quando RR entre 0,95 e 1,05 e remodelamento negativo quando RR<0,95.

É possível notar que não houve diferença entre os grupos estudados quando comparado com o grupo Controle (tabela 2), demonstrando que o tratamento aumentou a área luminal (figura 16) sem promover remodelamento vascular, de forma que a área total vascular permaneceu semelhante ao grupo controle (figura 15). Não foi possível notar também remodelamento vascular no grupo Salina, porque o anel silástico ao redor da carótida comum esquerda do animal impedia a distensibilidade vascular, dessa forma, o vaso passou a ter o diâmetro interno do anel.



**Tabela 2: Razão Remodelamento (RR)**

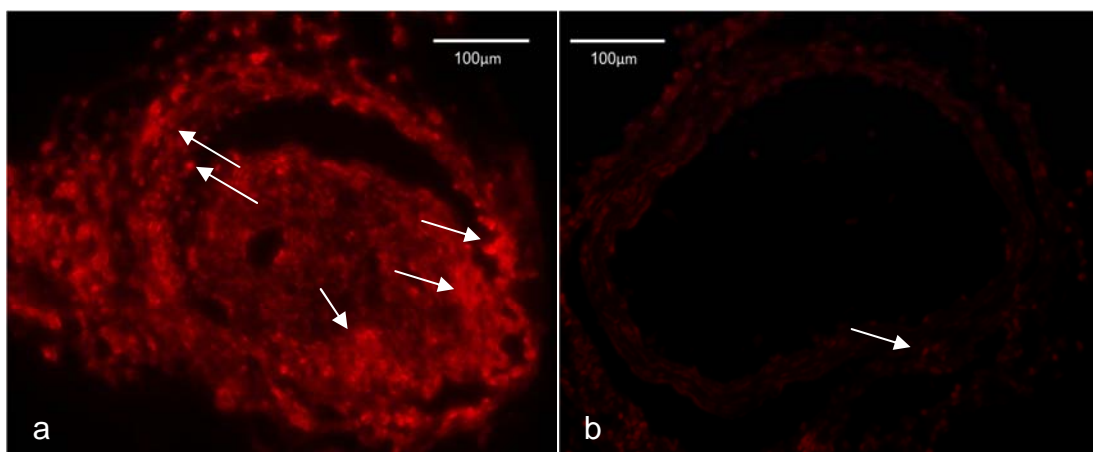
Grupos (n)	RR
ApoE-Controle (5)	-
ApoE-Salina (8)	0,92±0,37
ApoE-CMN (6)	0,92±0,21

Dados Expressos em média±EPM

#### 4.8 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's)

Ao observar a figura 18a, é possível notar um aumento de pontos fluorescentes, que indicam uma maior expressão de ânion superóxido, em um corte histológico da carótida comum esquerda de animais ApoE-Salina. As setas apontam para um aumento de ERO's tanto para a área de placa quanto para a parede vascular.

Na figura 18b, nota-se uma redução significativa de pontos fluorescentes, corte histológico da carótida comum esquerda de animais ApoE-CMN, demonstrando que o tratamento *in situ* com CMN foi capaz de reduzir a expressão de ERO's na artéria do animal.



**Figura 18 - Cortes transversais típicos de carótida comum dos camundongos ApoE<sup>-/-</sup> coradas com DHE.** Figura a: animais ApoE-Salina e b, animais ApoE-CMN. As setas apontam para maior expressão de ERO's. A barra branca possui 100 µm. Fotografia realizada com a objetiva de 20x.

#### 4.9 Detecção de Células Apoptóticas

Ao observar a figura 19a, é possível notar um aumento de pontos fluorescentes, que indicam apoptose celular, em um corte histológico da carótida comum esquerda de animais ApoE-Salina. As setas apontam para um aumento de células apoptóticas tanto para a área de placa quanto para a parede vascular.

Na figura 19b, nota-se uma redução significativa de pontos fluorescentes, corte histológico da carótida comum esquerda de animais ApoE-CMN, demonstrando que o tratamento *in situ* com CMN foi capaz de reduzir a quantidade de células apoptóticas na artéria do animal.

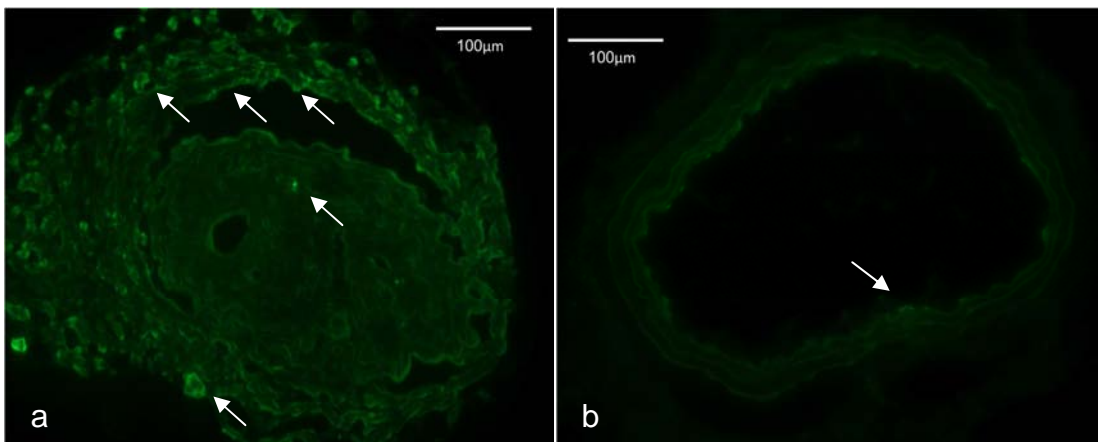
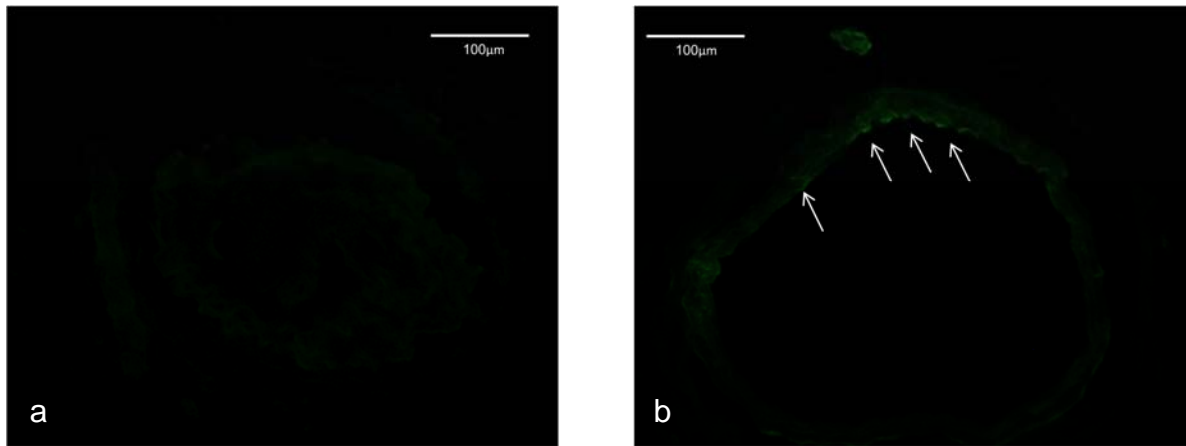


Figura 19 - Cortes transversais típicos de carótida comum dos camundongos ApoE<sup>-/-</sup> coradas pelo método de TUNEL. Figura a: animais ApoE-Salina e b, animais ApoE-CMN. As setas indicam pontos de maior apoptose celular. A barra branca possui 100 µm. Fotografia realizada com a objetiva de 20x.

#### 4.10 Autofluorescência de Células GFP

Na figura 20b, é possível notar algumas regiões fluorescentes que indicam células do camundongo doador GFP no endotélio da carótida comum do animal ApoE-CMN, o qual recebeu o tratamento com CMN, enquanto que o mesmo não se observa na figura 20a. O camundongo GFP é um animal transgênico o qual foi inserido em seu

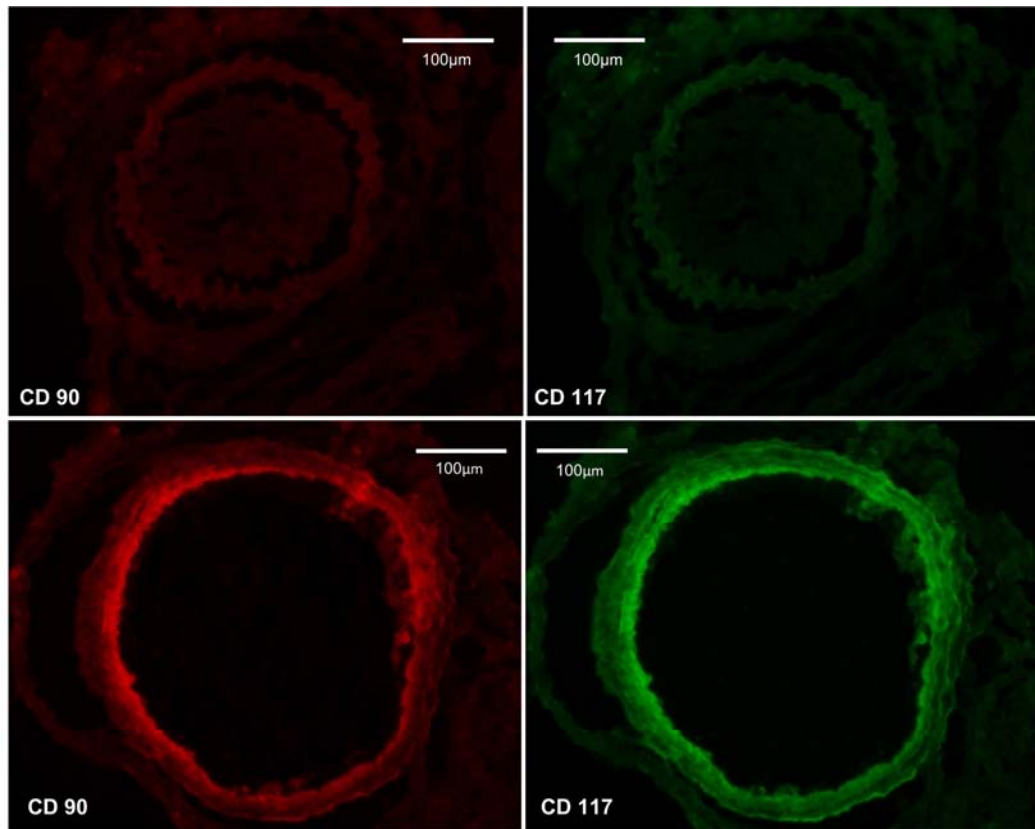
material genético uma sequência de DNA de uma água-viva bioluminescente do gênero *Aequorea* que quando excitada, emite luz fluorescente verde.



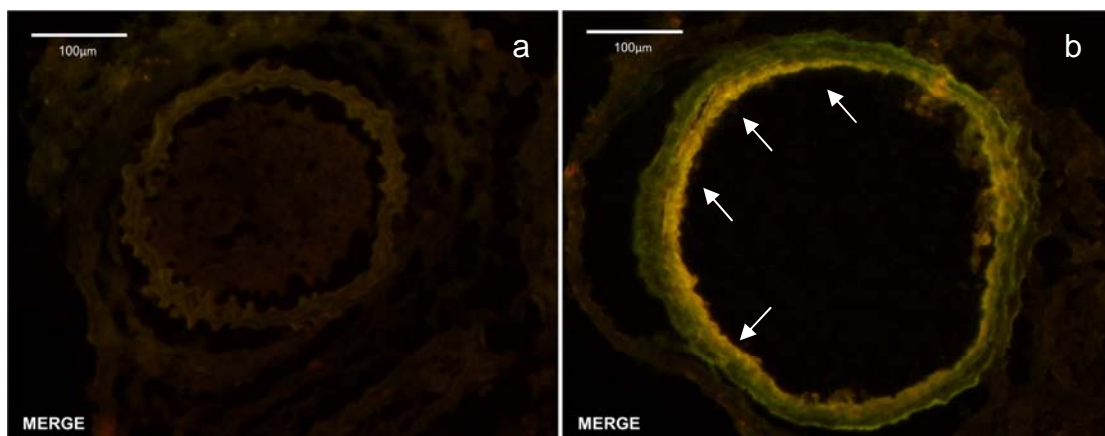
**Figura 20 - Cortes transversais típicos de carótida comum dos camundongos ApoE<sup>-/-</sup> (GFP).** Figura a: animais ApoE-Salina e b, animais ApoE-CMN. As setas indicam presença de células de camundongos GFP. A barra branca possui 100 µm. Fotografia realizada com a objetiva de 20x.

#### 4.11 Imunofluorescência para Identificação de Células Progenitoras

Nas figuras abaixo, figura 21c e 21d, é possível notar um aumento da intensidade de fluorescência no endotélio vascular do grupo CMN, demonstrando tanto marcação positiva para CD90 quanto para CD117 e, confirmada pela sobreposição dessas imagens (merge) que pode ser evidenciada na figura 22b. Com essa dupla marcação, é possível identificar células indiferenciadas no endotélio vascular dos animais que receberam tratamento com CMN, podendo dessa forma, inferir que no endotélio há presença de células progenitoras endoteliais recompondo o tecido antes lesado.



**Figura 21 - Cortes transversais típicos de carótida comum dos camundongos ApoE<sup>-/-</sup> (CD117/CD90).** Figuras **a** e **b**: animais ApoE-Salina e, figuras **c** e **d**, animais ApoE-CMN. Em **c**, as setas indicam presença marcação CD90 e em **d**, marcação de CD117, que não pode ser visualizado em **a** e **b**. A barra branca possui 100 µm. Fotografia realizada com a objetiva de 20x.



**Figura 1 - Cortes transversais típicos de carótida comum dos camundongos ApoE<sup>-/-</sup> (MERGE).** Figura **a**, sobreposição das figuras 10a e 10b. Figura **b**, sobreposição das figuras 10c e 10d, animais ApoE-CMN. Em **b**, as setas indicam a dupla marcação para CD90 e Cd117. A barra branca possui 100 µm. Fotografia realizada com a objetiva de 20x.



# **DISCUSSÃO**



## 5 DISCUSSÃO

Recentes evidências apontam que as células tronco circulantes e células progenitoras derivadas da medula óssea, transitando através da circulação, entram em diferentes órgãos, se diferenciam em células a fim de recuperar o tecido lesado, ou contribuem para o *pool* de células tronco residente (WERNER *et al.*, 2003). Assim, o propósito do trabalho foi avaliar o efeito das CMN sobre a lesão induzida na carótida de camundongos hipercolesterolêmicos.

O modelo utilizado de lesão vascular induzida por um anel silástico perivascular, seja ao redor da artéria carótida ou femoral, já é bem estabelecido na literatura (WERNER *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2004; von der THÜSEN, BERKEL e BIESSEN, 2001; YANG *et al.*, 2008) e demonstra ser uma ferramenta válida e eficaz na aceleração da formação de placa aterosclerótica, sendo a patogênese inicial dessa lesão induzida pelo acúmulo de lipídios (THÜSEN, BERKEL e BIESSEN, 2001). O fato de essa lesão ser dependente da hipercolesterolemia fez com que Yang *et al.* (2008) alterassem a linhagem de animal utilizada (de *wild type* para *knockout* para o receptor de LDL). A desvantagem desse modelo é o desenvolvimento de uma lesão pontual, sem a expansão ou causando um menor efeito em regiões adjacentes à lesão (von der THÜSEN, BERKEL e BIESSEN, 2001). Assim como já descrito, com cerca de 10 dias, o modelo empregado já apresentava uma lesão estabelecida de forma pontual com uma ligeira expansão da placa ateromatosa para as regiões adjacentes, principalmente em direção à bifurcação da artéria carótida (dados não apresentados).

Alguns trabalhos que utilizam o modelo murino *knockout* para ApoE ou para o receptor de LDL aceleram a progressão da placa aterosclerótica através de dieta hipercolesterolêmica, mesmo quando utilizam o modelo de estenose induzida (XU *et al.*, 2004). Devido à idade dos animais utilizados nos protocolos experimentais (PORTO *et al.*, 2011), até cerca de 6 meses de idade, o camundongo ApoE<sup>-/-</sup> é apenas hipercolesterolêmico, possuindo apenas lesões ateromatosas iniciais. Entretanto, no presente estudo a dieta hipercolesterolêmica não influenciou para acelerar a lesão sendo descartado do estudo, o grupo que recebeu dieta hipercolesterolêmica. Rauscher *et al.* (2003), Wassmann *et al.* (2006) e Porto *et al.*

(2011), ao utilizarem em seus protocolos experimentais dieta hipercolesterolêmica para acelerar a formação de placa aterosclerótica, não observaram diferença no perfil lipídico dos animais tratados com CMN e/ou CPE quando comparado ao grupo controle.

Como observado por diversos outros autores, a administração de CMN não influenciou no perfil lipídico dos animais *knockout* para ApoE. Sendo a hipercolesterolemia um contínuo fator pró-aterogênico, e todos os grupos experimentais utilizados no estudo apresentaram valores de colesterol total semelhantes a um camundongo ApoE<sup>-/-</sup> controle de 6 meses de idade, os efeitos mediados pelas CMN seriam mediados por outros fatores, diferentes daquele efeito clássico associado à hipercolesterolemia.

Os níveis elevados de colesterol influenciou de maneira significativa na área de lesão provocada na carótida comum esquerda dos animais. No entanto, a administração *in situ* de CMN promoveu uma redução significativa da área de lesão quando comparada ao grupo que recebeu somente solução salina. Werner *et al.* (2002), ao realizarem um tratamento combinando CMN da medula óssea e rosuvastatina, observaram redução de neointima na carótida dos camundongos quando comparados ao grupo controle. Em 2003, Werner *et al.*, induziram lesão na artéria carótida e administraram  $10^6$  CMN derivadas do baço, de forma tópica ao fim da cirurgia e  $10^6$  células pela veia caudal, 24h após a primeira aplicação. Os autores observaram que esses animais apresentavam redução de neointima quando comparados com os animais que receberam placebo. Porto *et al.* (2011) observaram efeito similar sobre a aterosclerose, porém na aorta de camundongos hipercolesterolêmicos após oito injeções de  $10^6$  CMN derivadas do baço através da veia caudal.

Apesar Thorin (2011) observarem tanto que as CMN quanto CPE são capazes de promover redução da área de deposição lipídica, esses dados ainda são controversos. Wassmann *et al.* (2006) ao realizarem três infusões de  $2 \times 10^7$  de CMN derivadas do baço não encontraram redução na área de deposição lipídica dos animais quando comparados ao placebo. Entretanto, pôde ser notada uma melhora funcional vascular ao realizarem protocolos de reatividade vascular em anéis isolados de aorta. Há trabalhos ainda que demonstram que as CMN e as CPE são capazes de promover aumento da área de deposição lipídica contribuindo com a

progressão da aterosclerose. Esse efeito foi observado por George *et al.* (2005) quando compararam o tratamento com CPE derivadas do baço e CMN derivadas de medula óssea, proveniente de cultura *versus* controle. Silvestre *et al.* (2003) ao comparar o tratamento com CMN derivadas da medula óssea em animais com isquemia de membro e a terapia celular para progressão da placa aterosclerótica, percebeu que apesar do aumento na neovascularização, os grupos que receberam terapia celular tiveram um aumento de quase 40% na área da placa aterosclerótica em relação ao grupo controle.

Provavelmente, os diferentes resultados encontrados decorrente da terapia celular se dêem em parte pela falta de padronização de tratamento. A maioria dos estudos divergem na escolha da melhor via de administração (se sistêmica, através de injeções locais ou de forma tópica) e na escolha do tipo celular a ser empregado (se o *pool* de CMN, a fração de CPE ou até mesmo de células provenientes de cultura). Alguns autores já demonstram em seus trabalhos que a fração mononuclear possui melhores resultados que a fração progenitora, além de demonstrar também que células provenientes de cultura acabam por perder propriedades fenotípicas, comprometendo sua ação no tecido (WASSMANN *et al.*, 2006; WERNER *et al.*, 2003; URBICH e DIMMELER, 2004; LAWALL, BRAMLAGE e AMANN, 2010).

A justificativa utilizada para demonstrar o efeito ateroprotetor das CPE's é a mesma para demonstrar a contribuição dessas células para a progressão e formação de neointima. Acredita-se que a terapia celular contribua com a formação de *vasa vasorum*, vasos que nutrem as artérias, facilitando a migração das células tronco para a área de lesão (XU *et al.*, 2004) e se diferenciar em células musculares lisa e macrófagos, a fim de aumentar a placa aterosclerótica. Há ainda autores que defendem a formação de *vasa vasorum* como algo benéfico, visto que a administração celular pode tanto recrutar células tronco advindas da medula óssea quanto células progenitoras endoteliais provenientes da adventícia (ZAMPETAKI, KIRTON e XU, 2008; MAJESKYA *et al.*, 2012) para que então, seja possível promover o reparo e restabelecer os parâmetros funcionais vasculares (WERNER e NICKENIG, 2006a; ZAMPETAKI, KIRTON e XU, 2008). Inoue *et al.* (2011) acreditam que seja possível ocorrer as duas teorias, sendo que a segunda ocorre quando há uma desregulação no sítio lesado, fazendo com que haja uma sinalização para



estimular as células progenitoras a contribuir com o desenvolvimento da lesão em curso.

Através da redução da área de lesão aterosclerótica, foi possível restabelecer o lúmen vascular e dessa maneira, provavelmente promover uma melhora no fluxo sanguíneo. Colocando esses resultados em uma perspectiva clínica, o processo de restenose pós-*stent* também está relacionado com a redução de CPE's circulante, fato que prejudica o reparo de lesões endoteliais (URBICH e DIMMELER, 2004; WERNER e NICKENIG, 2006a; MATSUMOTO *et al.*, 2009). Além disso, muitas DCV, o diabetes, tabagismo, a hipercolesterolemia e o sedentarismo também estão intimamente relacionados com menor mobilização de CPE's em áreas isquêmicas, fato este que demonstra o papel dessa linhagem celular no reparo tecidual da parede vascular (URBICH e DIMMELER, 2004; WERNER e NICKENIG, 2006b).

O primeiro ensaio clínico utilizando células da medula óssea do próprio paciente para tratar isquemia crônica de membro, ocorreu entre os anos de 2007 e 2010 e observou uma redução significativa de amputação de membro quando comparado ao grupo que recebeu apenas veículo (cerca de 19% dos pacientes tratados tiveram alguma amputação de membro comparado com 43% do grupo controle (POWELL *et al.*, 2011). Dados de estudos experimentais (YANG *et al.*, 2008; URBICH e DIMMELER, 2004) corroboram esse resultado, o que fortalece a hipótese de que as células tronco podem ser uma terapia promissora.

O remodelamento vascular em artérias de grande calibre é uma alteração estrutural adaptativa que ocorre em resposta às diversas condições, incluindo a aterosclerose (PORTO *et al.*, 2011; GLAGOV *et al.*, 1987; LANGILLE, 1996). Diferente dos dados encontrados na literatura, em que a progressão da placa aterosclerótica promove um remodelamento vascular (PEREIRA *et al.*, 2010; LUTGENS *et al.*, 2001; NOGUEIRA *et al.*, 2007), o presente estudo não observou remodelamento na carótida nos animais que receberam solução salina. Essa ausência de remodelamento do grupo salina ocorreu devido ao processo de estenose causado pelo anel silástico, fazendo com que as artérias assumissem o diâmetro interno da cânula e tivessem sua distensibilidade impedida. Ao impedir a distensibilidade vascular, impediu também que o vaso pudesse acomodar a lesão que se formava, reduzindo dessa maneira a luz vascular além de promover um enrijecimento arterial.

Ainda permanece incerto sobre a participação de CPE's ou de células derivadas da medula óssea sobre o remodelamento vascular. Assim como as CPE's estão envolvidas na angiogênese, acredita-se também que essas células estejam intimamente relacionadas com o remodelamento vascular (HRISTOV *et al.*, 2008; HRISTOV e ER, 2008). Diferente das observações feitas por Porto *et al.* (2011) que demonstram recuperação de quase 40% do diâmetro vascular no animal tratado com CMN quando comparado ao grupo que recebeu veículo, retornando dessa maneira, a área vascular à parâmetros de um animal controle *wild type* (C57BL/6), o presente estudo não encontrou diferença na área vascular total, bem como na razão de remodelamento denotando assim, ausência de remodelamento vascular no grupo que recebeu terapia celular. Entretanto, houve uma significativa redução da relação parede/luz nos animais tratados com CMN quando comparados aos animais que receberam somente solução salina. Essa diferença encontrada ocorreu pelo fato de esse grupo apresentar menor área de lesão aterosclerótica, fato que contribuiu para a redução dessa relação.

A redução da área de deposição lipídica resultou em um aumento na área luminal e dessa maneira, possivelmente proporcionou melhora do fluxo vascular. Não pode ser observada influencia no remodelamento vascular, visto que ele foi ausente nos grupos experimentais, apresentando valores próximos de um animal controle. Dessa maneira, é possível reafirmar que o restabelecimento da luz vascular ocorreu devido à redução da área de deposição lipídica e não por aumento da área vascular a fim de acomodar a área de lesão. Os animais tratados com CMN tiveram também uma redução significativa da sua espessura de parede, que pode ser explicada por redução da área de lesão, fato esse que não pode ser observado nos animais que receberam solução salina.

O acúmulo de células musculares lisas, a hipertrofia, e o aumento do estresse oxidativo são características da aterosclerose, restenose e doenças relacionadas à hipertensão vascular. Diversas condições patológicas vasculares também estão envolvidas nos diferentes graus de proliferação de células endoteliais e fibroblastos (STOCKER e KEANEY, 2004) além de aumentar a disfunção endotelial e reduzir as CPE's circulantes (THORIN, 2011), comprometendo a reendotelização e estimulando a progressão da lesão. Geralmente, o balanço entre a proliferação e a morte celular determina a extensão do crescimento celular. As espécies reativas de

oxigênio (ERO's) desempenham um importante papel na morte celular, sendo tanto na apoptose quanto na necrose (WERNER *et al.*, 2002; STOCKER e KEANEY, 2004).

Recentes evidências apontam os efeitos parácrinos derivados das CPE's na prevenção do estresse oxidativo (MIROTSOU *et al.*, 2011). Um estudo realizado recentemente aponta que as CPE's derivadas de cordão umbilical humano, em cultura, reduzem os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio das próprias CPE's, convertendo-os a peróxido de hidrogênio e reduzindo a quantidade de células apoptóticas (YANG *et al.*, 2010). Outro dado interessante encontrado por Yang *et al.* (2010) foi que a neutralização de fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor* – VEGF), fator de crescimento de hepatócitos (*hepatocyte growth factor* – HGF), interleucina-8 (*interleukin-8*, IL-8) e da matriz de metaloproteinase-9 (*matrix metalloproteinase* – 9, MMP-9) não atenuou o efeito citoprotetor das CPE's, sugerindo que essas células exerçam suas ações em vias alternativas relacionadas aos mecanismos antioxidantes intracelulares. Laufs *et al.* (2004) demonstraram que quatro semanas de exercício físico moderado em pacientes com DAC, além de aumentar o número de CPE's circulante, reduziu o número de CPE's circulantes apoptóticas.

Os resultados obtidos por este estudo, assim como outros estudos experimentais e clínicos sobre aterosclerose, reforçam a hipótese que o excesso de espécies reativas de oxigênio e/ou a diminuição da capacidade antioxidante desempenham um papel crucial para a progressão da aterosclerose. Além disso, a integridade da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e da produção de óxido nítrico (NO) são essenciais para a manutenção do tônus vascular. Assim como os resultados observados por Porto *et al.* (2011), pioneiro na investigação dos efeitos da terapia celular sobre a redução das ERO's, o presente estudo observou que um dos efeitos benéficos da terapia com CMN inclui a redução do estresse oxidativo.

Células em apoptose têm sido demonstradas em diversas lesões ateroscleróticas. Uma estudo realizado por Yang *et al.* (2008) demonstrou que após uma semana de retirada do anel silástico ao redor da artéria, a maioria das células apoptóticas encontradas eram macrófagos que estavam localizadas na camada adventícia. Duas semanas após a retirada do anel silástico, o perfil de aparecimento de apoptose foi estendido para a camada média caracterizando apoptose de células musculares lisa,

demonstrando dessa maneira que a apoptose está intimamente relacionada com os estágios de evolução da lesão aterosclerótica.

Corroborando a literatura, o tratamento com CMN foi capaz de reduzir o número de células apoptóticas nos animais quando comparados ao grupo controle, bem como reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio. A redução dos fatores pró-aterogênicos, como a redução de ERO's e apoptose, demonstra uma eficácia da terapia celular a fim de reduzir a lesão aterosclerótica e promover um reparo na função endotelial (WERNER e NICKENIG, 2006b).

A expressão de espécies reativas de oxigênio na aterosclerose contribui de maneira significativa para a progressão da lesão, fato esse que pode ser constatado na carótida dos animais tratados com salina. A redução da expressão de ERO's nos animais que receberam a terapia celular demonstra a eficácia no tratamento. Além da redução da quantidade de radicais livres na área de lesão, foi possível também notar uma redução de células apoptóticas comprovando a correlação, já descrita na literatura (LIBBY, RIDKER e HANSSON, 2011), de que o estresse oxidativo proporciona o aumento no aparecimento de corpos apoptóticos em lesões ateroscleróticas.

Após dano na medula óssea, foram encontrados sinais de proliferação de células tronco hemaopoiéticas (CTH) tanto no baço quanto no fígado indicando que mesmo após a destruição do nicho das células hematopoiéticas, elas migram para outras regiões com o objetivo de proliferar e substituir as células perdidas. Estudos apontam que o nicho vascular é especialmente importante quando há um aumento da hematopoiese, dessa forma, a lesão na medula óssea promove um aumento na produção de CTH em nichos extramedulares. Essa teoria pode ser comprovada por um modelo de CTH quiescente, que reside em nicho endosteal, ser recrutada para nichos extravasculares sob sinais estimulatórios acarretando assim em proliferação e diferenciação (HUURNE, FIGDOR e TORENSMA, 2010).

Embora os trabalhos envolvendo CPE's sejam relativamente novos na literatura, uma vez que esse tipo celular foi descrito pela primeira vez em 1997, diversos trabalhos têm demonstrado que o seu potencial terapêutico pode ser altamente dependente da fonte de células progenitoras, como por exemplo, o baço e a medula (LAMON e HAJJAR, 2008).

Werner *et al.* (2003) e George *et al.* (2005) puderam constatar em seus experimentos que o baço é a maior fonte de CPE's em camundongos, com cerca de duas vezes mais células que o encontrado na medula óssea. As CMN derivadas do baço possuem alta concentração de monócitos e macrófagos. Essas células possuem um grande potencial de assumir um papel de células endoteliais *like*, fato esse que explicaria o aumento da reendotelização e supressão de neointima por tratamento com CMN (WERNER *et al.*, 2003; WERNER e NICKENING, 2006b).

Em 2003, Werner *et al.* constatou um aumento das CMN derivadas do baço no local da lesão quando era realizado uma esplenectomia prévia no animal que receberia o tratamento. Com a esplenectomia, foi constatado também que a presença de CPE's na circulação se tornava prolongada, resultando assim, em alterações nos marcadores de superfície de forma a induzir a presença dessas células no local da lesão. Apesar de estudos demonstrarem um maior recrutamento celular para o local da lesão, um grupo piloto com tratamento celular (dados não apresentados), bem como dados recentes publicados pelo laboratório (PORTO *et al.*, 2011), não observaram diferença na terapia em animais não esplenectomizados, entretanto, não foi realizada marcação para células *GFP* positivas no baço ou na medula para demonstrar, se de fato ali também estavam presentes células do camundongo doador.

Dados apresentado por Vasa *et al.* (2001), demonstram que fatores de risco para DCV, como a aterosclerose, sedentarismo e DAC reduzem o número de CPE's circulantes, além de torná-las menos efetivas para reendotelizar um tecido lesado. A redução do risco cardiovascular bem como a prática de exercícios físicos aumentam o número de CPE's circulantes provenientes da medula óssea. Laufs *et al.* (2004) demonstrou que o exercício físico também aumenta de maneira equivalente o número de CPE's na medula e no baço, sendo esse aumento sustentado por até 28 dias após a prática moderada de exercício realizada em um período de 7 dias.

A terapia celular foi capaz de promover a reendotelização da artéria contribuindo com a redução da área de deposição lipídica. Essa reendotelização pode ser constatada com a presença de marcadores na superfície (CD177-FITC e CD90-PE) no endotélio vascular. Pode-se notar também que nem todas as células ali presentes são provenientes do animal doador, visto que há uma baixa marcação para *GFP*. Corroborando os dados de Zampetaki, Kirton, Xu (2008) a qual demonstraram que a

terapia com CMN derivadas do baço foi capaz de melhorar a vasodilatação dependente do endotélio em camundongos aterosclerótico, além de desempenhar um importante papel na reendotelização e redução de neointima, melhoram também os parâmetros funcionais vasculares.

Wassmann *et al.* (2006) demonstraram que mesmo depois de 45 dias após receber tratamento com CMN, os parâmetros funcionais dos animais tratados, mesmo com leve diminuição, ainda eram melhores que do animal controle, demonstrando que a terapia celular pode produzir efeitos a longo prazo.

Animais fêmeas possuem maior concentração de CPE's circulantes, sendo essas reguladas pelo ciclo menstrual. Sua maior concentração no sangue ocorre quando há o pico de estrogênio (UMEMURA e HIGASHI, 2008). Nelson *et al.* (2007) também demonstrou que o tratamento com CMN é dependente tanto do gênero quanto da idade, de forma que animais fêmeas responderam melhor ao tratamento quando comparadas aos animais machos, além de demonstrar que as CMN proveniente de fêmeas jovens são mais eficazes em relação às células de animais adultos, sendo portanto o uso de células jovens provenientes de animais fêmeas a melhor alternativa para a terapia celular.

Fatores parácrinos podem influenciar as células adjacentes modulando a resposta do tecido aumentando a sobrevida e ativando fatores endógenos a fim de promover uma regeneração tecidual, além de também estimular de maneira autócrina as ações das próprias células tronco (GNECCHI *et al.*, 2008). Essa regulação dinâmica entre as células tronco e as citocinas liberadas por elas influenciam a sobrevida, reparo e regeneração tecidual, incluindo a ativação de células residentes e células tronco circulantes. Isso pode ser evidenciado no endotélio da carótida tratada com CMN, uma vez que nem todos as CPE's presentes ali tinham marcação positiva para *GFP*, sinalizando dessa maneira o recrutamento de células tronco endógenas para o local da lesão.

Um estudo desenvolvido em 2009 por Barcelos *et al.*, demonstrou que somente os fatores parácrinos quando aplicados de forma tópica são capazes de promover o reparo de úlceras isquêmicas em animais diabéticos além de promover neovascularização no local. Esse dado reforça o potencial de recrutar e modular as células para recuperação tecidual.

Uma camada endotelial intacta é fundamental para um bom funcionamento vascular. Condições metabólicas, como a hipercolesterolemia e o diabetes, levam à disfunção endotelial. Manipulações mecânicas, como a angioplastia levam à denudação do endotélio. Tanto a disfunção quanto a denudação do endotélio estão relacionados com a formação de neointima, resultando em um estreitamento luminal e, por fim, em uma oclusão vascular. A melhora da função endotelial e a acelerada reendotelização reduzem a formação de neointima, o que se torna potencialmente interessante para a prevenção de restenose pós-angioplastia (WERNER *et al.*, 2002).

Com os resultados obtidos no presente estudo, bem como os dados já apresentados na literatura, é possível supor mecanismos para explicar os efeitos observados. Um desses mecanismos estaria baseado na idéia de que o tratamento com células tronco, através de moléculas sinalizadoras, facilitaria a migração dessas células para o local da lesão. Dessa maneira, elas seriam capazes de reduzir as ERO's (PORTO *et al.*, 2011), a formação de células espumosas (LAMON e HAJJAR, 2008), e conseqüente redução da apoptose (WERNER e NICKENIG, 2006b).

A redução das células apoptóticas bem como das espécies reativas de oxigênio faz com que haja uma redução da formação de LDL oxidado bem como dos fatores inflamatórios e, dessa forma reduza o recrutamento celular para a região. A terapia com células mononucleares, fração celular essa também rica em monócitos e macrófagos (POWELL *et al.*, 2011), é capaz de secretar fatores parácrinos de forma a modular as células adjacentes à lesão bem como recrutar células tronco endógenas para auxiliar no processo de reparo da lesão (GNECCHI *et al.*, 2008). Através da modulação parácrina, os monócitos e macrófagos provenientes do tratamento são capazes de fagocitar os elementos da matriz extracelular bem como realizar o transporte inverso do colesterol, retirando-o da camada intimal (POWELL *et al.*, 2011; DIAZ *et al.*, 1997).

A redução da área de lesão bem como a participação das CPE's e dos monócitos/macrófagos com características de células endoteliais – *like* (UMEMURA e HIGASHI, 2008) são capazes de restabelecer a superfície vascular através de uma reendotelização, e dessa maneira, promovendo o restabelecimento morfológico e funcional do vaso (WASSMANN *et al.*, 2006; PORTO *et al.*, 2011; WERNER *et al.*, 2003; STEINMETZ, NICKENIG e WERNER, 2010).

O conhecimento adquirido ao longo dos estudos com terapia celular têm se mostrado crucial para aplicações clínicas em termos de biomarcadores de prognóstico/diagnóstico confiáveis, mas também como ferramentas terapêuticas a serem utilizadas na medicina regenerativa (HRISTOV e ER, 2008).

Do ponto de vista terapêutico, ensaios clínicos com a utilização de CPE para reparo de miocárdio ainda apresentam resultados conflitantes do ponto de vista da melhora da função ventricular esquerda. Dessa maneira, os efeitos modestos da melhora funcional estão provavelmente associados à neovascularização e a ações parácrinas. Portanto, pode-se hipotetizar que a co-administração de compostos angiogênicos à terapia celular poderia contribuir com o recrutamento de CPE's e com a neovascularização após o infarto do miocárdio (HRISTOV *et al.*, 2008). Outra alternativa terapêutica seria avaliar os efeitos pleiotrópicos dos inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) e dos  $\beta$ -bloqueadores, pois há indícios de que a administração desses medicamentos promovam o recrutamento de CPE's (STEINMETZ, NICKENIG e WERNER, 2010) além da associação de CPE's aos *stents* com o objetivo de reduzir a restenose através da implantação de um organismo inerte no interior da artéria do paciente (HRISTOV *et al.*, 2008).

A terapia com células tronco endógenas tem se mostrado um ferramenta promissora no tratamento da doença isquêmica periférica, sendo que evidências preliminares apontam a viabilidade, segurança e eficácia em vários pontos dos estudos (LAWALL, BRAMLAGE e AMANN, 2011). Além do tratamento da restenose e infarto de miocárdio, a terapia celular pode ser utilizadas para outras doenças cardiovasculares, como o tratamento de lesões isquêmicas de membro, promovendo revascularização e reduzindo as chances de amputação.

Através de um perfil lipídico elevado, fato que favorece a entrada de partículas de LDL - colesterol para a camada subendotelial e a disfunção endotelial. O LDL oxidado na íntima vascular estimula a migração de macrófagos e leucócitos para a formação de lesões ateroscleróticas incipientes. A entrada dos macrófagos na área de lesão faz com que haja a fagocitose das moléculas de LDL oxidado, que resultará nas células espumosas (*foam cells*). Esse acúmulo de células espumosas também possui propriedades pró-inflamatórias. Durante o processo, ocorre entrada de células musculares lisas, produção de matriz extracelular e o processo de apoptose (LIBBY, RIDKER e HANSSON, 2011).





# CONCLUSÕES

## 6 CONCLUSÃO

Através do presente estudo é possível concluir que a terapia com CMN foi capaz de reduzir a área de deposição lipídica, restabelecendo o lúmen vascular, mas sem alterar o perfil lipídico dos animais. O restabelecimento da luz vascular não ocorreu por remodelamento, visto que não foi observada diferença no remodelamento vascular entre os grupos, mas redução da parede arterial devido à redução da área de lesão ateromatosa. Além disso, pode-se observar redução da produção de espécies reativas de oxigênio e apoptose com a terapia celular, com melhora nos parâmetros morfológicos vascular, devido à presença de células derivadas do baço, promovendo a reendotelização na artéria previamente lesada.



# REFERÊNCIAS



## 7. REFERÊNCIAS

ASAHARA, T. *et al.* Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for angiogenesis. **Science**, v. 275, p. 964-967, 1997.

BARCELOS, L. S. *et al.* Human CD133+ Progenitor Cells Promote the Healing of Diabetic Ischemic Ulcers by Paracrine Stimulation of Angiogenesis and Activation of Wnt Signaling. **Circulation Research**, v. 104, p. 1095-1102, 2009.

BASSON, M. Cardiovascular Disease. **Nature Insight**, v. 451, n. 7181, p. 1, fev. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. **Informações de Saúde**. Brasília: [s.n.], 2011. Disponível em <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sih/cnv/niuf.def>>. Acesso em: 28 dez. 2011.

BRASIL. Sociedade Brasileira de Cardiologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Brazilian Journal of Hypertension**, v. 17, n. 1, p. 1-69, jan./mar. 2010.

BRASIL. Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, n. 4, p. 1-22, abr. 2007.

BRAUNERSREUTHER, V. *et al.* Ccr5 But Not Ccr1 Deficiency Reduces Development of Diet-Induced Atherosclerosis in Mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, p. 373-379, Nov 2007.

DARDAS, P. *et al.* The Use of Rotational Atherectomy and Drug-Eluting Stents in the Treatment of Heavily Calcified Coronary Lesions. **Hellenic J Cardiol**, v. 52, p. 399-406, June 2011.

DIAZ, M. N. *et al.* Mechanisms of Disease: Antioxidants and Atherosclerotic Heart Disease. **N Engl J Med**, v. 337, n. 6, p. 408-416, Aug 1997.

DOTSENKO, O. Stem/Progenitor Cells, Atherosclerosis and Cardiovascular Regeneration. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**, v. 4, p. 97-104, 2010.

D'USCIO, L. V. *et al.* Mechanism of Endothelial Dysfunction in Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, p. 1017-1022, Mar 2001.

FEIHL, F. *et al.* Hypertension and microvascular remodelling. **Cardiovascular Research**, v. 78, p. 274-285, Feb 2008.

FONTAINE, V. *et al.* Essential Role of Bone Marrow Fibroblast Growth Factor-2 in the Effect of Estradiol on Reendothelialization and Endothelial Progenitor Cell Mobilization. **Am J Pathol**, v. 169, n. 5, p. 1855-1862, Nov 2006.

FORD, C. E. *et al.* Cytological identification of radiation-chimaeras. **Nature**, v. 177, p. 452-454, Mar 1956.

GEARHART, J. New Potential for Human Embryonic Stem Cells. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1061-1062, Nov 1998.

GENGOZIAN, N. *et al.* Thymus specificity in lethally irradiated mice treated with rat bone marrow. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 96, n. 3, p. 714-720, Dec 1957.

GEORGE, J. *et al.* Transfer of Endothelial Progenitor and Bone Marrow Cells Influences Atherosclerotic Plaque Size and Composition in Apolipoprotein E Knockout Mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, p. 2636-2641, Sep 2005.

GIORDANO, A. e ROMANO, A. Inhibition of Human in-stent Restenosis: A Molecular View. **Curr Opin Pharmacol**, v. 11, p. 372-377, April 2011.

GLAGOV, S. *et al.* Compensatory Enlargement of Human Atherosclerotic Coronary Arteries. **N Engl J Med**, v. 316, p. 1371-5, 1987.

GNECCHI, M. *et al.* Paracrine Mechanisms in Adult Stem Cell Signaling and Therapy. **Circulation Research**, v. 103, p. 1204-1219, 2008.

HRISTOV, M. *et al.* Adult progenitor cells in vascular remodeling during atherosclerosis. **Biol. Chem**, v. 389, p. 837–844, July 2008.

HRISTOV, M. e ER, C. W. Endothelial progenitor cells in vascular repair and remodeling. **Pharmacological Research**, v. 58, p. 148-151, 2008.

HUURNE, M. T.; FIGDOR, C. G. e TORENSMA, R. Hematopoietic Stem Cells Are Coordinated by the Molecular Cues of the Endosteal Niche. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 8, p. 1131-1141, 2010.

INOUE, T. *et al.* Vascular Inflammation and Repair: Implications for Re-Endothelialization, Restenosis, and Stent Thrombosis. **JACC: Cardiovascular Interventions CME**, v. 4, n. 10, p. 1057-1066, 2011.

JOLLY, N. *et al.* Coronary Artery Stent Restenosis Responds Favorable to Repeat Interventions. **Am J Cardiol**, v. 83, p. 1565-1568, June 1999.

KORSHUNOV, V. A.; SCHWARTZ, S. M. e BERK, B. C. Vascular Remodeling Hemodynamic and Biochemical Mechanisms Underlying Glagov's Phenomenon. **Thromb Vasc Biol**, v. 27, p. 1722-1728, May 2007.

LAMON, B. D. e HAJJAR, D. P. Inflammation at the Molecular Interface of Atherogenesis - An Anthropological Journey. **Am J Pathol**, v. 173, n. 5, p. 1253-1264, Nov 2008.

LANGILLE, B. L. Arterial remodeling: relation to hemodynamics. **Can J Physio Pharmacol**, v. 74, n. 7, p. 834-41, 1996.

LAUFS, U. *et al.* Physical Inactivity Increases Oxidative Stress, Endothelial Dysfunction, and Atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, p. 809-814, Feb 2005.

LAUFS, U. *et al.* Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. **Circulation**, v. 109, p. 220–226, 2004.

LAWALL, H.; BRAMLAGE, P. e AMANN, B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease: A critical appraisal. **Thromb Haemost**, v. 103, p. 696–709, 2010.

LAWALL, H.; BRAMLAGE, P. e AMANN, B. Treatment of peripheral arterial disease using stem and progenitor cell therapy. **J Vasc Surg**, v. 53, n. 2, p. 445-453, 2011.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, p. 868-874, Dec 2002.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M. e HANSSON, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, v. 473, p. 317-325, May 2011.

LORENZ, E.; CONGDON, C. e UPHOFF, D. Modification of acute irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injection. **Radiology**, v. 58, n. 6, p. 863-877, June 1952.

LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, p. 233-241, Sep 2000.

LUTGENS, E. *et al.* Compensatory Enlargement and Stenosis Develop in ApoE<sup>-/-</sup> and ApoE<sup>\*3</sup>-Leiden Transgenic Mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, p. 1359-1365, 2001.

MAJESKYA, M. W. *et al.* **The Adventitia**: A Progenitor Cell Niche for the Vessel Wall, v. 195, n. 1-2, p. 73-81, Jan 2012.

MALGOR, R. D. *et al.* Results of Single- and Two-Vessel Mesenteric Artery Stents for Chronic Mesenteric Ischemia. **Ann Vasc Surg**, v. 24, p. 1094-1101, 2010.

MARTINS, I. S. *et al.* Doenças cardiovasculares ateroscleróticas, dislipidemias, hipertensão, obesidade e diabetes melito em população da área metropolitana da região sudeste do Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 27, n. 4, p. 250-61, 1993.

MATSUMOTO, Y. *et al.* Reduced number and function of endothelial progenitor cells in patients with aortic valve stenosis: a novel concept for valvular endothelial cell repair. **European Heart Journal**, v. 30, p. 346–355, 2009.

MEYRELLES, S. S. M. *et al.* Endothelial Dysfunction in the Apolipoprotein E-deficient Mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. **Lipids Health Dis**, v. 10, n. 211, p. 1-18, Dec 2011.



MIROTSOU, M. *et al.* Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. **J Mol Cell Cardiol**, v. 50, p. 280-289, Aug 2010.

MOHIADDIN, R. H. *et al.* Glagov Remodeling of the Atherosclerotic Aorta Demonstrated by Cardiovascular Magnetic Resonance: The CORDA Asymptomatic Subject Plaque Assessment Research (CASPAR) Project. **J Cardiovasc Magn Reson**, v. 6, n. 2, p. 517-525, 2004.

MOTHE, A. J. *et al.* Neural Stem/Progenitor Cells from the Adult Human Spinal Cord Are Multipotent and Self-Renewing and Differentiate after transplantation. **Plos One**, v. 6, n. 11, p. 1-13, Nov 2011.

MULVANY, M. J. Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this? **Cardiovascular Research**, v. 41, p. 9-13, 1999.

NELSON, W. D. *et al.* Sex-Dependent Attenuation of Plaque Growth After Treatment With Bone Marrow Mononuclear Cells. **Circulation Research**, v. 101, p. 1319-1327, 2007.

NIH. National Institutes of Health. **Regenerative Medicine**, [S.I.]: Terese Winslow, 2006. Disponível em <[http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/pdfs/regenerative\\_medicine\\_2006.pdf](http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/pdfs/regenerative_medicine_2006.pdf)>. Acesso em: 03 jan. 2012.

NIH. National Institutes of Health. **Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions**. [S.I.]: Terese Winslow, 2001. Disponível em <<http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/fullrptstem.pdf>>. Acesso em: 03 jan. 2012.

NOGUEIRA, B. V. *et al.* Evaluation of aortic remodeling in apolipoprotein E-deficient mice and renovascular hypertensive mice. **Archives of Medical Research**, v. 38, n. 8, p. 816-821, 2007.

NOWELL, P. C. *et al.* Growth and continued function of rat marrow cells in x-irradiated mice. **Cancer Res**, v. 16, p. 258-261, 1956.

NUNES, G. L.; ALFONSO, T. e OLIVEIRA, A. T. Reestenose Coronária: Fisiopatologia e Epidemiologia. **Rev Bras Cardiol Invas**, v. 12, n. 4, p. 178-184, 2004.

OHAYON, J. *et al.* Necrotic core thickness and positive arterial remodeling index: emergent biomechanical factors for evaluating the risk of plaque rupture. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 295, p. H717–H727, June 2008.

PASTERKAMP, G.; DE KLEIJN, D. P. V. e BORST, C. Remodeling of De Novo Atherosclerotic Lesions in Femoral Arteries: Impact on Mechanism of Balloon Angioplasty. **J Am Coll Cardiol**, v. 26, n. 2, p. 422-8, Aug 1995.

PEREIRA, T. M. *et al.* Cardiac and vascular changes in elderly atherosclerotic mice: the influence of gender. **Lipids in Health and Disease**, v. 87, n. 9, p. 1-9, 2010.

PORTO, M. L. *et al.* Mononuclear cell therapy attenuates atherosclerosis in apoE KO mice. **Lipids Health Dis**, v. 10, n. 155, p.1-6, 2011.

POWELL, R. J. *et al.* Interim analysis results from the RESTORE-CLI, a randomized, double-blind multicenter phase II trial comparing expanded autologous bone marrow-derived tissue repair cells and placebo in patients with critical limb ischemia. **J Vasc Surg**, v. 54, p. 1032-41, 2011.

QING-BO, X. Endothelial progenitor cells in angiogenesis. **Acta Physiologica Sinica**, v. 57, n. 1, p. 1-6, Feb 2005.

RAUSCHER, F. M. *et al.* Aging, Progenitor Cell Exhaustion, and Atherosclerosis. **Circulation**, v. 108, p. 457-463, 2003.

ROSENSON, R. S. Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. **Atherosclerosis**, v. 173, p. 1-12, 2004.

SILVESTRE, J. S. *et al.* Transplantation of Bone Marrow–Derived Mononuclear Cells in Ischemic Apolipoprotein E–Knockout Mice Accelerates Atherosclerosis Without Altering Plaque Composition. **Circulation**, v. 108, p. 2839-2842, 2003.

SOBOTTA, J. **Atlas de Histologia, Citologia, Histologia e Anatomia Microscópica**. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SPINELLI, O. A. Premian a un argentino que probó la eficacia de una técnica cardiológica. **Jornal Clarín**, Argentina, 14 set 2005. Disponível em <<http://edant.clarin.com/diario/2005/09/14/sociedad/s-03801.htm>>. Acesso em: 03 Jan 2012.

STEINMETZ, M.; NICKENIG, G. e WERNER, N. Endothelial-Regenerating Cells: An Expanding Universe. **Hypertension**, v. 55, p. 593-599, Jan 2010.

STOCKER, R. e KEANEY, J.F. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. **Physiol Rev**, v. 84, p. 1381–1478, out. 2004.

THOMSON, J. A. *et al.* Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science**, v. 282, p. 1145-1147, Nov 1998.

THORIN, E. Vascular Disease Risk in Patients With Hypertriglyceridemia: Endothelial Progenitor Cells, Oxidative Stress, Accelerated Senescence, and Impaired Vascular Repair. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 27, p. 538 –540, 2011.

THÜSEN, J. H. V. D.; BERKEL, T. J. C. V. e BIESSEN, E. A. L. Induction of Rapid Atherogenesis by Perivascular Carotid Collar Placement in Apolipoprotein E–Deficient and Low-Density Lipoprotein Receptor–Deficient Mice. **Circulation**, v. 103, p. 1164-1170, 2001.

TIMMINS, L. H. *et al.* Increased artery wall stress post-stenting leads to greater intimal thickening. **Lab Invest**, v. 91, n. 6, p. 955-967, June 2011.

TSIGKAS, G. G. *et al.* Stent Restenosis, Pathophysiology and Treatment Options: A 2010 Update. **Hellenic J Cardiol**, v. 52, p. 149-157, 2011.

UMEMURA, T. e HIGASHI, Y. Endothelial Progenitor Cells: Therapeutic Target for Cardiovascular Diseases. **J Pharmacol Sci**, v. 108, p. 1-6, 2008.

URBICH, C. e DIMMELER, S. Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. **Circ Res**, v. 95, p. 343-353, 2004.

WARD, M. R. *et al.* Arterial Remodeling Mechanisms and Clinical Implications. **Circulation**, v. 102, p. 1186-1191, 2000.

WASSMANN, S. *et al.* Improvement of Endothelial Function by Systemic Transfusion of Vascular Progenitor Cells. **Circ Res**, v. 99, p. e74-e83, Sep 2006.

WERNER, N. *et al.* Bone Marrow–Derived Progenitor Cells Modulate Vascular Reendothelialization and Neointimal Formation: Effect of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibition. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 22, p. 1567-1572, Sep 2002.

WERNER, N. *et al.* Intravenous Transfusion of Endothelial Progenitor Cells Reduces Neointima Formation After Vascular Injury. **Circulation Research**, v. 93, p. e17-e24, June 2003.

WERNER, N. e NICKENIG, G. Clinical and therapeutical implications of EPC biology in atherosclerosis. **J Cell Mol Med**, v. 10, n. 2, p. 318-332, 2006a.

WERNER, N. e NICKENIG, G. Influence of Cardiovascular Risk Factors on Endothelial Progenitor Cells - Limitations for Therapy? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, p. 257-266, Oct 2006b.

WHO. World Health Organization. **Global Atlas on Cardiovascular Disease - Prevention and Control**. Geneva: [s.n.], 2011. Disponível em <[http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/publications/atlas\\_cvd/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/atlas_cvd/en/)>. Acesso em: 03 jan. 2012.

XU, Y. *et al.* Role of Bone Marrow–Derived Progenitor Cells in Cuff-Induced Vascular Injury in Mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, p. 477-482, 2004.

YANG, X. *et al.* Vascular remodeling and mobilization of bone marrow-derived cells in cuff-induced vascular injury in LDL receptor knockout mice. **Chin Med J**, v. 121, n. 3, p. 220-226, 2008.

YANG, Z. *et al.* Paracrine factors secreted by endothelial progenitor cells prevent oxidative stress-induced apoptosis of mature endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 211, n. 1, p. 103-109, July 2010.

YU, J. e THOMSON, J. A. Pluripotent stem cell lines. **Genes Dev**, v. 22, p. 1987-1997, 2008.

ZAGO, M. A. e COVAS, D. T. **Células-tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006.

ZAMPETAKI, A.; KIRTON, J.P. e XU, Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells. **Cardiovascular Research**, v. 78, p. 413–421, Mar 2008.