



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Histologia e Embriologia

CAROLINA DA SILVA GOUVEIA PEDROSA

**POTENCIAL ANGIOGÊNICO DAS CÉLULAS
MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA E
TECIDO ADIPOSEO EM MODELO DE ISQUEMIA
DE MEMBROS INFERIORES**

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Morfológicas da Universidade
Federal do Rio de Janeiro, visando
a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^a Maria Isabel Doria Rossi

Abril 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Examinadores

Prof. Sang Won Han - Centro Interdisciplinar de Terapia Gênica, UNIFESP.

Prof^a. Tatiana Lobo Coelho de Sampaio - Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ.

Prof^a. Claudia dos Santos Mermelstein - Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ.

Prof^a. Valéria de Mello Coelho - Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ.

Prof^a. Christina Maeda Takiya - Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ. Revisora.

Prof^a. Maria Isabel Doria Rossi - Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ. Orientadora.

Prof. Vivaldo de Moura Neto - Coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas, UFRJ.

Pedrosa, Carolina da Silva Gouveia.

Potencial Angiogênico das Células Mesenquimais de Medula Óssea e Tecido Adiposo em Modelo de Isquemia de Membros Inferiores/ Carolina da Silva Gouveia Pedrosa. Rio de Janeiro: UFRJ/ Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, 2009.

xv
81p

Dissertação – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Pós-graduação em Ciências Morfológicas, 2009.

1.Células-Tronco Mesenquimais 2.Tecido Adiposo 3.Isquemia de Membros

“Aquilo que guia e arrasta o mundo não são as máquinas, mas as idéias.”

Vitor Hugo

“As pessoas raramente reconhecem a oportunidade porque ela surge disfarçada em trabalho árduo.”

H.L.Mencken

“Falta de tempo é desculpa daqueles que perdem tempo for falta de métodos.”

Albert Einstein

**Aos meus pais, Carlos e Marilene, e avós, Braz e Maria,
por acreditarem sempre em mim.**

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me permitido chegar até aqui. Aos meus pais, Carlos e Marilene, e irmão, Laercio, que com toda a paciência, agüentaram o meu mau humor e estresse durante a conclusão dessa tese. Aos meus avós, Braz e Maria, pelo apoio incondicional. Não posso esquecer do meu sobrinho, Kevin, que mesmo não entendendo nada queria sempre ajudar. Obrigada mesmo, mesmo!!

A minha orientadora, Isabel, por me ajudar sempre que necessário, contribuindo enormemente para minha formação. Obrigada por me ensinar muito mais do que ciência.

Ao Prof. Radovan, por ser um exemplo de profissional e professor. Obrigada por me “apresentar” a Leandra e a Isabel, com as quais eu aprendi muito.

A Prof^a Christina Takiya pelo tempo e energia dispensados tanto para a resolução de “pepinos” quanto para a revisão da tese, além de sua enorme contribuição intelectual ao trabalho. Não tenho palavras para agradecê-la.

Ao Prof. Sang Won Han pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho, além da participação na banca examinadora desta dissertação. Aos alunos do Prof. Sang, em especial, Paulo, Eduardo, Vivi e Leo, pela grande ajuda na execução dos experimentos. Estarei aqui para ajudá-los no que precisarem.

As Prof^{as}. Tatiana Sampaio, Claudia Mermelstein e Valéria Coelho, por aceitarem participar da banca examinadora desta dissertação.

As “meninas da Isabel”, Karina, Dai, Dani, Naty e Ana, por quebrarem vários galhos enquanto eu estava em SP. Obrigada por tudo meninas, muita sorte pra vocês.

A minha ex-futura chefinha, Leandra, o eterno IC, Ronaldo, a doidinha, Karla, e, Karina, pelas várias conversas científicas, ou não, durante nossos encontros quase que mensais no Outback. Ah, se aquelas mesas falassem!

Ao pessoal dos laboratórios de Proliferação e Diferenciação Celular, de Patologia Celular e do Banco de Células do Rio de Janeiro, pela grande disponibilidade para ajudar e pelos momentos de descontração também, por que ninguém é de ferro!

A todos que de alguma maneira ajudaram na realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A angiogênese terapêutica tem surgido como uma promissora terapia desenvolvida para tratar isquemias teciduais pela promoção da proliferação de vasos colaterais. Células progenitoras endoteliais (EPC) e células-tronco da medula óssea (MSC-MO) mostraram ser capazes de aumentar eficientemente o fluxo sanguíneo e a revascularização após a isquemia tecidual. Contudo, essa abordagem terapêutica requer um alto número de células e como consequência grandes quantidades de aspirados medulares. O desenvolvimento de uma rede capilar é requerido para o remodelamento do tecido adiposo, evidenciando uma ligação crucial entre adipogênese e angiogênese. Deste modo, a proposta desse estudo é verificar e comparar o potencial angiogênico das BM-MSC e células-tronco de tecido adiposo (MSC-TA) em um modelo murino de isquemia de membros. Células isoladas do tecido adiposo subcutâneo murino foram testadas quanto a capacidade de diferenciação *in vitro* para as linhagens adipogênica e osteogênicas, e, em seguida seu potencial angiogênico foi analisado no modelo murino de isquemia de membros inferiores. Ambas as células promoveram angiogênese, embora apenas o Grupo TA foi capaz de aumentar a densidade arteriolar. No entanto, enquanto 80% dos animais tratados com as AT-MSC (Grupo TA) apresentaram necrose no membro, apenas 20% dos animais tratados com MSC-MO (Grupo MO) apresentaram a mesma aparência. Não houve recuperação da força contrátil do músculo e observou-se a presença de adipócitos intramusculares, fibras musculares degeneradas e cicatriz tecidual. Os resultados sugerem que as MSC-TA murina estimulam a angiogênese, contudo não é suficiente para proteger e promover o reparo do tecido isquêmico.

ABSTRACT

Therapeutic angiogenesis has emerged as one of the most promising therapies developed to treat tissue ischemia by promoting the proliferation of collateral vessels. Endothelial progenitor cells (EPC) and bone marrow mesenchymal stem cells (MSC-MO) were shown to efficiently increase blood flow and revascularization after tissue ischemia. However, this therapeutic approach requires high number of cells and the consequent need of large amounts of bone marrow aspirates. Development of the capillary network is required for adipose tissue remodeling, underlining a crucial link between adipogenesis and angiogenesis. Thus, the purpose of this study is to verify and compare the angiogenic potential of MSC-MO and adipose tissue- mesenchymal stem cells (MSC-TA) in a mouse model of hindlimb ischemia. Cells derived from murine subcutaneous fat tissue were tested in relation to their potential to differentiate in vitro towards the adipogenic and osteogenic lineages and then their angiogenic potential were evaluated in a mouse model of hindlimb ischemia. Both cells promoted angiogenesis although just AT-MSC increased arteriolar density. However, while 80% of the animals treated with MSC-TA (TA Group) showed limb necrosis, only 20% of the animals treated with MSC-MO (MO Group) showed the same appearance. There was no recovery of the muscular force. and intramuscular adipocytes, degenerated muscular fibers and tissue scar were observed. The results suggest that murine MSC-TA stimulate angiogenesis that is not sufficient to protect and promote repair of ischemic tissues.

LISTA DE ABREVIATURAS

α -SMA = Alfa- Actina de Músculo Liso, *Alpha-Smooth Muscle Actin*

Ang 1 = Angiopietina 1

BMC = Célula de Medula Óssea, *Bone Marrow Cell*

BMP-2 = Proteína Morfogenética Óssea, *Bone Morphogenetic Protein*

CMN-MO = Células Mononucleares de Medula Óssea

CXCR4 = Receptor 4 de Quimiocinas CXC , *CXC Chemokine Receptor 4*

EC = Células Endoteliais, *Endothelial Cell*

EDTA= Ácido etilendiamino tetra-acético, *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

EGF = Fator de Crescimento Epidérmico, *Epidermal Growth Factor*

EGFR = Receptor de EGF, *EGF Receptor*

EPC = Célula Progenitora Endotelial, *Endothelial Progenitor Cell*

FGF = Fator de Crescimento de Fibroblastos, *Fibroblast Growth Factor*

G-CSF = Fator Estimulador de Colônia de Granulócito, *Granulocyte -Colony Stimulator Factor*

GM-CSF = Fator Estimulador de Colônia de Granulócito/Macrófago,
Granulocyte/Macrophage -Colony Stimulator Factor

HGF = Fator de Crescimento de Hepatócito, *Hepatocyte Growth Factor*

HIF = Fator Indutor de Hipóxia, *Hypoxia Inducible Factor*

IBMX= Isobutil-metil-xantina

IGF-1 = Fator de Crescimento similar a Insulina, *Insulin-Like Growth Factor*

MCP-1 = Proteína Quimioatratadora de Monócitos - 1, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*

MMP = Metaloproteinases de Matriz, *Matrix Metalloproteinases*

MO = Medula Óssea

MSC = Células Tronco Mesenquimais, *Mesenchymal Stem Cells*

NCS= Soro Bovino de Recém Nato, *Newborn Calf Serum*

ON = Óxido Nítrico

PAX 3; 7 = Gene Pareado- 3;7, *Paired Box- 3; 7*

PBS= Solução Salina Tamponada com Fosfato, *Phosphate Buffered Saline*

PDGF = Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas, *Platelet-derived Growth Factor*

PPAR γ 1; 2 = Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomos - Gama 1; 2,
Peroxisome Proliferator- Activated Receptor- Gamma 1; 2

SDF-1 = Fator Derivado de Células Estromais – 1, *Stromal Cell- derived Factor-1*

SMC = Célula Muscular Lisa, *Smooth Muscle Cell*

SOX 9 = Região Y determinante do Sexo – Gene 9, *Sex Determining Region Y- Box 9*

TA = Tecido Adiposo

TGF- α = Fator de Crescimento Transformador – Alfa, *Transforming Growth Factor – Alpha*

VEGF = Fator de Crescimento Vascular Endotelial, *Vascular Endothelial Growth Factor*

vWF = Fator de Von Willebrand, *Von Willebrand Factor*

SUMÁRIO

1. Introdução:	1
1.1. Reparo Tecidual.....	2
1.1.1. Tecido Muscular e Regeneração.....	2
1.1.1.a. Células Satélites.....	3
1.1.1.b. Medula Óssea e Reparo Muscular.....	6
1.1.2. Reparo Tecidual e Neovascularização.....	7
1.1.2.a. Estrutura Vascular.....	7
1.1.2.b. Angiogênese.....	10
1.1.2.b.i. Processo Angiogênico.....	11
1.1.2.b.ii. Moléculas Reguladoras da Angiogênese.....	12
1.1.2.c. Arteriogênese.....	14
1.1.2.c.i. Moléculas Reguladoras da Arteriogênese.....	14
1.1.2.d. Vasculogênese.....	15
1.1.2.d.i. Fatores Reguladores da Vasculogênese.....	16
1.2. EPCs e Reparo Tecidual	17
1.3. Doenças Vasculares Periféricas.....	18
1.4. Medula Óssea e Células-Tronco Mesenquimais.....	19
1.4.1. Potencial Angiogênico das Células de Medula Óssea.....	22
1.5. Tecido Adiposo e as Células-Tronco Mesenquimais.....	23
1.5.1. Potencial Angiogênico das Células de Tecido Adiposo.....	24
2. Objetivos:	26
3. Metodologia:	27
3.1. Animais.....	27
3.2. Isolamento e Cultura de Células.....	27
3.2.1. Obtenção de Células Mesenquimais de Medula Óssea.....	27
3.2.2. Obtenção de Células Mesenquimais de Tecido Adiposo.....	28
3.3 Diferenciação Para as Vias Osteogênica e Adipogênica.....	28

3.3.1. Para a Via Osteogênica.....	28
3.3.2. Para a Via Adipogênica.....	29
3.4. Modelo Murino de Isquemia Unilateral de Membro Inferior.....	29
3.5. Avaliação do Grau de Integridade do Membro Isquêmico e Determinação da Força Muscular.....	30
3.6. Histopatologia.....	31
3.6.1 Análises Histológicas.....	31
3.6.2 Análise Histoquímica.....	32
3.7. Quantificação da Angiogênese.....	32
3.8 Quantificação de Área de Gordura Intramuscular.....	34
3.9 Quantificação de Fibras Musculares Necróticas.....	34
3.10 Análise Estatística.....	35
4. Resultados:.....	36
4.1. As MSC de TA murino são capazes de se diferenciar nas linhagens adipogênica e osteogênica.....	36
4.2. As MSC de TA murino estimulam a angiogênese pós-isquemia.....	36
4.3. Efeito do transplante <i>in vivo</i> de MSC de TA ou MO.....	39
4.4. Os animais tratados com MSC de MO ou TA apresentam redução do peso do músculo isquêmico.....	40
4.5. Após quatro semanas, os animais tratados com MSC de MO ou TA murino possuem função muscular semelhante aos animais isquêmicos não tratados.....	42
4.6. Presença de células adiposas intramusculares nos músculos isquêmicos dos animais tratados com as MSC-TA e –MO.....	42
4.7. Os animais isquêmicos tratados com MSC de TA apresentaram maior número de fibras musculares degeneradas do que os animais tratados com MSC de MO.....	45
4.8. As MSC de TA e MO são capazes de promover a regeneração das fibras musculares no membro isquêmico lesado.....	47

4.9. Presença de tecido conjuntivo cicatricial nos animais tratados com as MSC derivadas de TA ou de MO.....	48
5. Discussão:.....	51
6. Conclusões:.....	61
7. Considerações Finais:.....	62
8. Referências:.....	63
9. Anexos:.....	82
9.1. Colorações.....	82
9.1.1. Colorações Especiais.....	82
9.1.1.a. <i>Von Kossa</i>	82
9.1.1.b. <i>Oil Red O</i>	83
9.1.2. Colorações Histológicas.....	84
9.1.2.a Hematoxilina e Eosina.....	84
9.1.2.b. Tricrômico de Masson.....	85
9.1.2.c. Vermelho de Pricrossirius.....	87
9.2 Comitê de Ética em Pesquisa.....	89

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Corte histológico de língua corado por HE.....	3
FIGURA 2 - Localização das Células Satélites.....	4
FIGURA 3 - Interação pericito/células endoteliais nos microvasos.....	8
FIGURA 4 - Representação esquemática da arteriogênese, angiogênese e vasculogênese.....	10
FIGURA 5 - Algumas vias de diferenciação das MSC de MO.....	20
FIGURA 6 - Fluxograma representativo da metodologia utilizada para obtenção das culturas de MSC de TA murino induzidas para as vias osteogênica e adipogênica.....	30
TABELA 1 - Classificação dos membros isquêmicos segundo o grau de necrose.....	31
FIGURA 7 - Determinação da força muscular.....	33
TABELA 2 - Classificação dos músculos isquêmicos segundo o número de fibras necróticas.....	34
FIGURA 8 - Fluxograma representativo da metodologia utilizada para a avaliação do efeito das MSC de MO e TA na isquêmica de membros posteriores.....	35
FIGURA 9 - MSC-TA são capazes de se diferenciar <i>in vitro</i> para as linhagens osteogênica e adipogênica.....	37
FIGURA 10 - Imagem representativa de imunohistoquímica para lectina BSL-1 nos músculos isquêmicos.....	38
FIGURA 11 - As MSC-TA e MSC-MO são capazes de estimular a angiogênese no músculo isquêmico.....	39
FIGURA 12 - As MSC de TA apresentam menor capacidade de recuperação da atrofia do membro que as MSC de MO.....	41
TABELA 3 - Peso dos animais e dos músculos isquêmicos após quatro semanas.....	41
TABELA 4 - Correlação entre a força muscular e o peso dos músculos isquêmicos.....	42
FIGURA 13 - Efeito das MSC de TA e MO na função muscular.....	43
FIGURA 14 - Histopatologia dos músculos isquêmicos dos animais experimentais após quatro semanas da injeção das células.....	44
FIGURA 15 - Quantificação da área de tecido adiposo no músculo esquelético após quatro semanas de isquemia.....	45

FIGURA 16 - Animais tratados com MSC-TA ou -MO apresentam fibras musculares degeneradas.....	46
FIGURA 17 - Quantificação das fibras degeneradas presentes do músculo esquelético isquêmicos após quatro semanas de isquemia.....	47
FIGURA 18 - As MSC de TA ou MO são capazes de promover a regeneração de fibras musculares esqueléticas.....	49
FIGURA 19 - Os animais isquêmicos tratados com MSC-TA ou –MO apresentam tecido cicatricial intramuscular.....	50

1. INTRODUÇÃO:

Doenças vasculares periféricas são um dos maiores problemas de saúde em uma sociedade que está envelhecendo. Em estágios avançados estas enfermidades resultam em hipoperfusão tecidual, gangrena e amputação do membro afetado. A revascularização do órgão isquêmico é essencial para a restauração da função fisiológica (KIM et al., 2007). Como a cirurgia vascular, tratamento usado atualmente para essas enfermidades, não é eficaz em todos os casos, estratégias terapêuticas usando terapias celulares se tornaram promissoras.

As células-tronco mesenquimais (MSC, *Mesenchymal Stem Cells*) além de presentes em vários tecidos, incluindo a medula óssea (MO), possuem capacidade de se diferenciarem em células da linhagem mesenquimal, musculares esqueléticas e endoteliais (PITTENGER et al., 1999; ZUK et al., 2001; REYES et al., 2002). É considerada uma fonte ideal para terapias celulares, uma vez que, seu isolamento é considerado simples, apresenta capacidade de expansão e multipotencialidade (PITTENGER et al., 1999; MOON et al., 2006). Ensaios pré-clínicos mostraram que as MSC de MO (MSC-MO) são capazes de induzir a revascularização em modelo de rato de isquemia de membros inferiores (AL-KHALDI et al., 2004).

As MSC de tecido adiposo (TA) possuem propriedades semelhantes a sua correspondente medular (LEE et al., 2004; KIM et al., 2005), porém maior frequência tecidual, assim foram eleitas importante fonte alternativa as células da MO (revisado em BAPTISTA et al., 2007). As MSC de TA (MSC-TA) também demonstraram efeitos pró-angiogênicos em modelo murino de isquemia de membros inferiores (PLANAT-BENARD et al., 2004).

É importante ressaltar que não há trabalhos onde as MSC-TA e MO são comparadas quanto ao potencial angiogênico *in vivo*, além da maior parte dos trabalhos utilizarem células humanas em modelo de xenoenxerto. A proposta deste estudo foi comparar diretamente o efeito da aplicação *in vivo* de MSC-TA e MO murinas em modelo de isquemia de membros inferiores.

1.1. Reparo Tecidual

Os tecidos em geral possuem atividade regenerativa intrínseca, responsável por renovar continuamente as células mortas, mantendo a homeostasia tecidual. Em tecidos como o linfo-hematopoético e aqueles expostos a agressões externas contínuas, como os epitélios intestinal e cutâneo, a taxa de renovação celular é constante. Em outros tecidos como o muscular estriado e o nervoso esta renovação celular parece ocorrer raramente.

Após uma lesão, células responsáveis pelo restabelecimento da homeostase do tecido, que hoje, acredita-se sejam as células tronco adultas, tecido-específicas (SUN et al., 2003, DA SILVA-MEIRELLES, CHAGASTELLES & NARDI, 2006) são ativadas, reconstituindo a área lesada. Frequentemente, este processo ocorre em associação com a ativação do tecido conjuntivo-vascular. Este processo, denominado reparo tecidual, nos casos de tecidos onde há menor capacidade de regeneração, como o tecido muscular estriado, se desenvolvem com formação principalmente de uma cicatriz fibrosa (ROBBINS & COTRAN, 1999; MONACO & LAURENCE, 2003).

Para que haja um reparo eficiente de qualquer tecido vascularizado, além das células que o compõem, é necessário que haja o restabelecimento do suprimento sanguíneo normal pela formação de novos vasos funcionais. Este processo é denominado revascularização. Os aspectos desse processo serão descritos detalhadamente mais adiante.

1.1.1. Tecido Muscular e Regeneração

No indivíduo adulto, existem três tipos de tecido muscular, classificados de acordo com as suas características morfológicas e funcionais, são eles: músculo estriado cardíaco, e esquelético e músculo liso.

O músculo cardíaco é formado por células alongadas, com estriações transversais e ramificadas, que se unem através de estruturas denominadas discos intercalares. Esta classe de tecido muscular possui capacidade de regeneração limitada. Na ocorrência de estresse isquêmico, o músculo cardíaco ativa mecanismos de sobrevivência celular resultando em condições fisiológicas de adaptação a isquemia, conhecida como miocárdio hibernante (RASHED & DEPRE, 2006).

O músculo esquelético, por sua vez, é formado por feixes de células cilíndricas, longas e multinucleadas, com presença de estriações transversais (Fig. 1). Esta classe de tecido muscular possui capacidade regenerativa que parece ser dependente das células satélites (revisado em CHARGE & RUDINICKI, 2004).

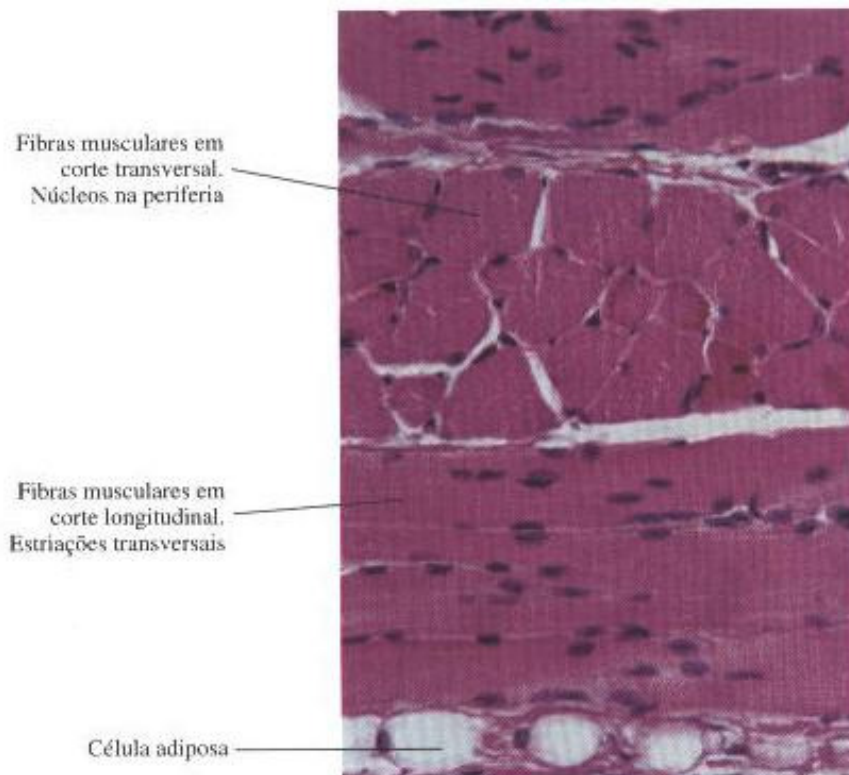


Figura 1. Corte histológico de língua corado por HE. Fibras musculares estriadas esqueléticas seccionadas transversal e longitudinalmente. Observar as estriações, no corte longitudinal, e a disposição periférica dos núcleos das fibras musculares, no corte transversal. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Já o músculo liso é um tecido formado por células fusiformes não estriadas. Neste, a resposta regenerativa é mais eficiente. No caso da musculatura da parede dos vasos sanguíneos, as células murais, que parecem estar intimamente ligadas aos pericitos, atuam ativamente auxiliando na regeneração do tecido. A identidade dos pericitos e seu papel no reparo tecidual serão discutidos posteriormente.

1.1.1.a. Células Satélites

As células satélites foram primeiramente identificadas por microscopia eletrônica pela sua posição anatômica única, situada entre a lâmina basal e a membrana celular

das fibras musculares adultas (MAURO, 1961) (Fig. 2). No músculo adulto, a renovação de mionúcleos raramente ocorre, desta maneira as células satélites se encontram em estado de quiescência. Uma vez ativadas, elas proliferam, iniciam sua diferenciação para a linhagem miogênica se tornando mioblastos, que se fundem formando miofibras nascentes. Posteriormente, essas miofibras se unem entre si ou com outros mioblastos dando origem a miofibras maduras, que promovem o reparo do tecido (PARTRIDGE, 2004; EHRHARDT & MORGAN, 2005;).

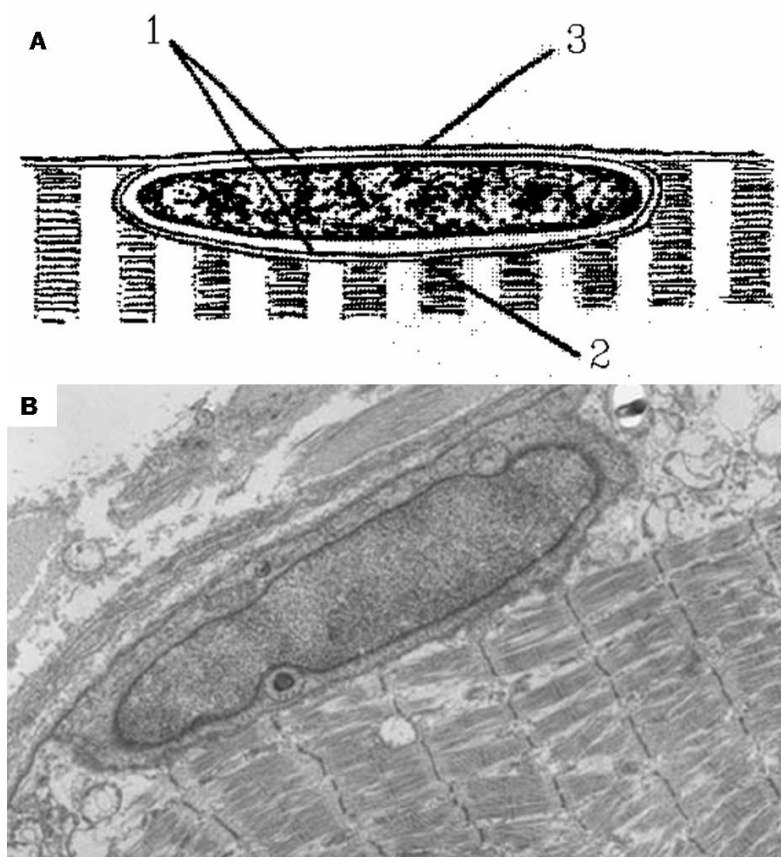


Figura 2. Localização das Células Satélites. (A) Esquema representativo da localização das células satélites em associação com as fibras musculares. 1- Célula satélite, 2- Depressão na membrana da fibra muscular, 3- endomísio envolvendo as fibras musculares e suas células satélites. (http://www.aps.uoguelf.ca/~swatland/ch7_6.htm) (B) Fotomicrografia eletrônica de uma célula satélite em um músculo inervado. Notar a íntima associação entre as fibras musculares e as células satélites. Aumento 6000X. (CAMILLO, ROCHA & CHOPARD, 2004).

A ativação das células satélites é um processo complexo. O primeiro passo é o resgate do estado celular de quiescência, ou seja, passagem do estágio G0 para o G1 do ciclo celular (DHAWAN & RANDO, 2005). Fatores extrínsecos atuam nesse processo.

O fator de crescimento de hepatócito (HGF, *Hepatocyte Growth Factor*) parece ser crucial nos estágios iniciais de regeneração (HAYASHI et al., 2004), sendo expresso na sua forma inativa na matriz celular circundante as células satélites (CORNELISON & WOLD, 1997; TATSUMI et al., 1998). Atua no aumento da

quimiotaxia dos precursores musculares (BANDOW et al., 2004; KAWAMURA et al., 2004; VILENA & BRANDAN, 2004). Mioblastos C2C12 tratados com HGF reorganizam seu citoesqueleto de actina, desenvolvem um formato celular polarizado (KAWAMURA et al., 2004) e mostram migração direcional e não-direcional ao gradiente de HGF (KAWAMURA et al., 2004; VILENA & BRANDAN, 2004).

Outros fatores, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, estimulam a ativação das células satélites podendo servir como um caminho adicional ao HGF. Diferentes membros da família de fatores de crescimento de fibroblastos (FGF, *Fibroblast Growth Factor*) estão presentes no músculo e podem ser liberados na ocorrência da lesão (JOHNSON & ALLEN, 1995), e vários receptores de FGF, principalmente FGF-R1 e -R4, são expressos nas células satélites (KASTNER et al., 2000; CORNELISON et al., 2001), estando envolvidos na sua ativação, proliferação e diferenciação. A isoforma 2 do FGF parece ser tão potente quanto o HGF em resgatar as células satélites da quiescência fazendo-as entrar na fase proliferativa (YABLONKA-REUVENI, SEGER & RIVERA, 1999). A expressão de FGF-6 nas células C2C12 induz mudanças morfológicas, diferenciação e reduz a adesão celular (ISRAELI et al., 2004).

A ativação da via de sinalização de Notch é também um potente ativador das células satélites. A inibição da via de Notch previne as células de ativarem e proliferarem (CONBOY & RANDO, 2002). Em resposta a injúria, ocorre a superexpressão do ligante de Notch, Delta 1, ativando o receptor Notch e induzindo a proliferação celular (DHAWAN & RANDO, 2005).

Trabalhos recentes mostram que o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) também atua na regeneração muscular. A injeção de um adeno-vírus associado codificando VEGF-A, melhora significativamente a regeneração muscular (ARSIC et al., 2004).

Uma vez que entrem no ciclo celular, as células satélites progridem para um estado progenitor altamente proliferativo (WATT, 1998; SANCHO, BATLLE & CLEVERS, 2004), caracterizado por altos níveis de Pax 3 (*Paired Box- 3*), que juntamente com Pax 7 (*Paired Box- 7*) controla a ativação do gene *Myo D*, gene *master* da diferenciação miogênica (CONBOY & RANDO, 2002, RELAIX et al., 2006). Em seguida chegam ao estado de mioblasto, completando a progressão de um progenitor

indiferenciado para a célula que irá continuar diferenciação miogênica (DHAWAN & RANDO, 2005).

Durante a regeneração, as modificações decorrentes da ativação das células satélites se refletem na morfologia do tecido. As fibras musculares necróticas severamente danificadas que não são capazes de se recuperarem, tanto funcionalmente quanto morfológicamente, são fagocitadas e posteriormente substituídas. Em algumas fibras observa-se presença de gotas lipídicas intracitoplasmáticas (ALLBROOK, BAKER & KIRKALDY-WILLIS, 1966). Em modelo experimental em ratos foi mostrado que, dentro de doze horas, ocorre a invasão de neutrófilos polimorfonucleares, células com capacidade fagocítica, do sistema vascular para a área danificada (BINTLIFF & WALKER, 1960). De quatro a seis dias após a invasão dessas células, o músculo lesionado, agora livre de debris celulares, apresenta mioblastos arranjados em colunas, com citoplasma basofílico e núcleo grande, características de células em atividade regenerativa (MUIR, KANJI & ALLBROOK, 1965). Em poucos dias, as miofibrilas se arranjam ao redor de um núcleo central, formando os miotubos, que se mantêm até catorze dias após a lesão. Ao fim de três semanas, as fibras em regeneração apresentam aparência e tamanho normais (ALLBROOK, BAKER & KIRKALDY-WILLIS, 1966).

1.1.1.b. Medula Óssea e Reparo Muscular

O status das células satélites como únicas células-tronco musculares tem sido posto a prova pela demonstração que células da MO podem contribuir para regenerar as fibras musculares esqueléticas (FERRARI et al., 1998; GUSSONI et al., 1999).

Artigos recentes demonstram uma variável contribuição das células derivadas da MO na regeneração muscular. Para que haja migração das células de medula, circulantes (SHERWOOD et al., 2004) ou diretamente injetadas (BOSSOLASCO et al., 2004) para o músculo, é necessário que este esteja lesado (SHERWOOD et al., 2004). Em 2004, Doyonnas e colaboradores demonstraram que precursores mielóides jovens, mas não células hematopoéticas maduras, possuem a habilidade de contribuir para a regeneração muscular (DOYONNAS et al., 2004).

O mecanismo pelo qual a contribuição das células da MO se dá tem sido uma área de intensa pesquisa. Inicialmente, acreditava-se que as células da MO contribuíam através da transdiferenciação direta em células satélites (FUKADA et al., 2002; LABARGE & BLAU, 2002), porém estudos mais recentes indicaram que na verdade ocorre fusão das células hematopoéticas com as fibras musculares lesadas (CAMARGO et al., 2003; DOYONNAS et al., 2004; SHERWOOD et al., 2004).

Ao se considerar o mecanismo pelo qual os precursores mielóides jovens se fundem as células musculares, é importante lembrar que normalmente os mioblastos têm a habilidade de se fundir uns aos outros ou com fibras lesadas multinucleadas (WAGERS & CONBOY, 2005). Assim, os macrófagos e outras células inflamatórias, capazes de se infiltrar no tecido lesado, estão, certamente, expostas a estímulos fisiológicos de fusão (STAUBER et al., 1988). Notadamente, os macrófagos por si só já sofrem o processo de fusão celular tanto fisiologicamente, para gerar osteoclastos, quanto patologicamente, para gerar células gigantes multinucleadas (VIGNERY, 2000).

1.1.2. Reparo Tecidual e Neovascularização

Conforme mencionado anteriormente, a neovascularização possui um papel importante, tanto na fisiologia do tecido, quanto no reparo de lesões teciduais e alterações deste processo encontram-se na base de diversas doenças (VAN WEEL et al., 2008). Por exemplo, a insuficiência no crescimento vascular está associada a doenças isquêmicas do coração, membro ou cérebro; a neurodegeneração; a preeclampsia; e a osteoporose (CARMELIET, 2003).

Para compreender melhor o processo de neovascularização é necessário primeiramente conhecer os componentes e a estrutura dos vasos sanguíneos, peça chave deste processo.

1.1.2.a. Estrutura Vascular

Os vasos sanguíneos são formados por células endoteliais arranjadas em estruturas tubulares entorno da qual a parede vascular se organiza. A estrutura da parede vascular é variável, dependente do calibre do vaso. Os de pequeno calibre e capilares possuem uma parede vascular formada por células denominadas pericitos

(Fig. 3), enquanto que as paredes vasculares das artérias e veias são formadas por algumas camadas de células musculares lisas (KARAMYSHEVA, 2008).

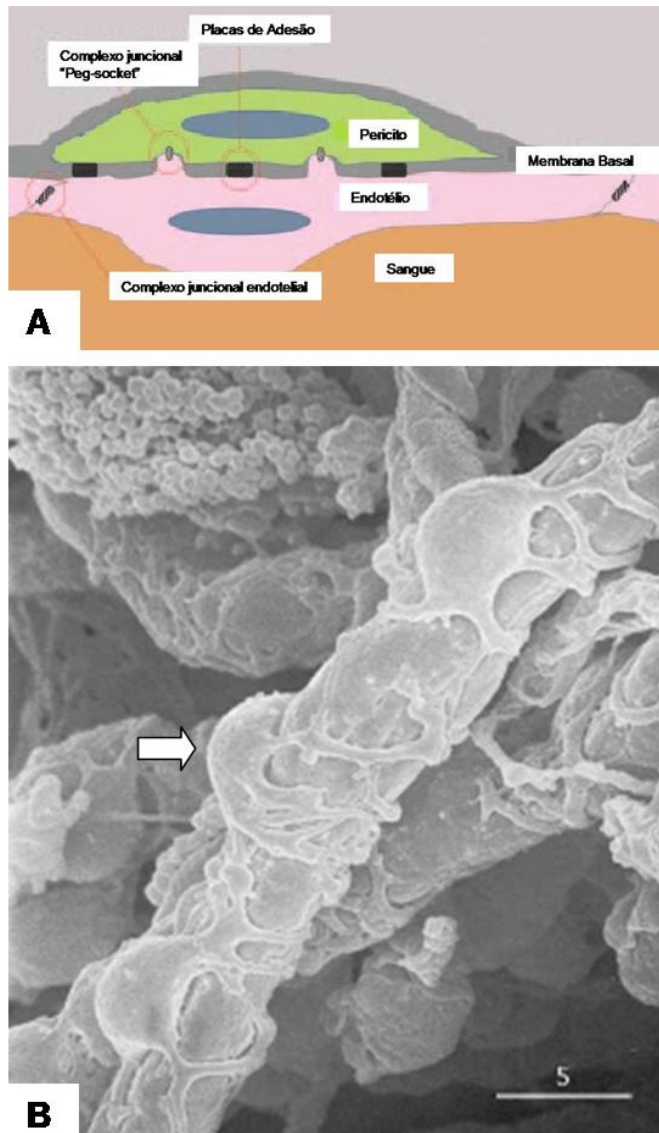


Figura 3. Interação pericito/células endoteliais nos microvasos. (A) Esquema representativo de pericitos ao redor das células endoteliais, compartilhando da mesma membrana basal. O contato direto dos pericitos com as células endoteliais é estabelecido por complexos juncionais denominados “peg-socket” onde não há membrana basal (adaptado de ARMULIK, ABRAMSSON & BETSHOLTZ, 2005); (B) Microscopia eletrônica de varredura mostrando a localização dos pericitos ao redor de um vaso. Seta evidenciando um pericito. Barra de aumento 5 μ m. (PEPPIATT et al., 2006).

Os pericitos não têm ainda a ontogenia bem esclarecida. Inicialmente, acreditava-se que sua origem fosse exclusivamente mesenquimal, contudo, estudos recentes mostraram que há pericitos, originários da crista neural no timo adulto (MULLER et al., 2008). Possuem capacidade de diferenciação em vários tipos celulares mesenquimais, como células musculares lisas, fibroblastos e osteoblastos (GERHARDT & BETSHOLTZ, 2003).

Diferem das células musculares lisas vasculares por sua localização relativa ao endotélio, sua morfologia e, em alguns casos, por seus marcadores de superfície (ARMULIK, ABRAMSSON & BETSHOLTZ, 2005), porém também possuem a capacidade de se diferenciar neste tipo celular (NEHLS & DRECKHAHN, 1993). Alguns marcadores, dentre eles α -SMA (*Alpha-Smooth Muscle Actin*), desmina, NG-2, são usados para a identificação de pericitos, contudo nenhum deles é absolutamente específico ou é capaz de reconhecer os pericitos de todos os órgãos (HELLSTROM et al., 1999; GERHARDT & BETSHOLTZ, 2003; CHAN-LING et al., 2004; HUGHES & CHAN-LING, 2004).

Os pericitos têm grande relevância na angiogênese, atuando no reconhecimento da presença do estímulo angiogênico e das forças hemodinâmicas dentro do vaso; depositando e degradando matriz extracelular; controlando a proliferação e diferenciação das células endoteliais dependentes do contato célula-célula e efeito parácrino; além de integrar os sinais ao longo do comprimento do vaso, devido aos seus numerosos contatos com as células endoteliais (GERHARDT & BETSHOLTZ, 2003) (Fig. 3B).

As células endoteliais e pericitos são interdependentes, assim fatores liberados pelas primeiras têm conseqüências nos segundos (ARMULIK, ABRAMSSON & BETSHOLTZ, 2005). Por exemplo, o endotélio é uma fonte crítica de fator de crescimento derivado de plaquetas-B (PDGF-B, *Platelet-derived Growth Factor-B*), inicialmente isolado em plaquetas, mas queratinócitos, fibroblastos e outros tipos celulares também o expressam em certas condições. A expressão deste fator leva ao recrutamento de células murais PDGFR-B-positivas, como demonstrado pela ablação específica de PDGF-B no endotélio, que leva a deficiência de pericitos (ENGE et al., 2003; BJARNEGÅRD et al., 2004;). Já a deleção desta molécula em neurônios e células hematopoéticas, não tem efeito na vasculatura (BUETOW & COSTER 2001; ENGE et al., 2003).

Vários mecanismos atuam na formação de vasos sanguíneos tanto na fase adulta quanto no período embrionário. Didaticamente, a neovascularização foi dividida em 3 diferentes aspectos que atuam em um processo integrado, que são: angiogênese, arteriogênese e vasculogênese (Fig. 4).

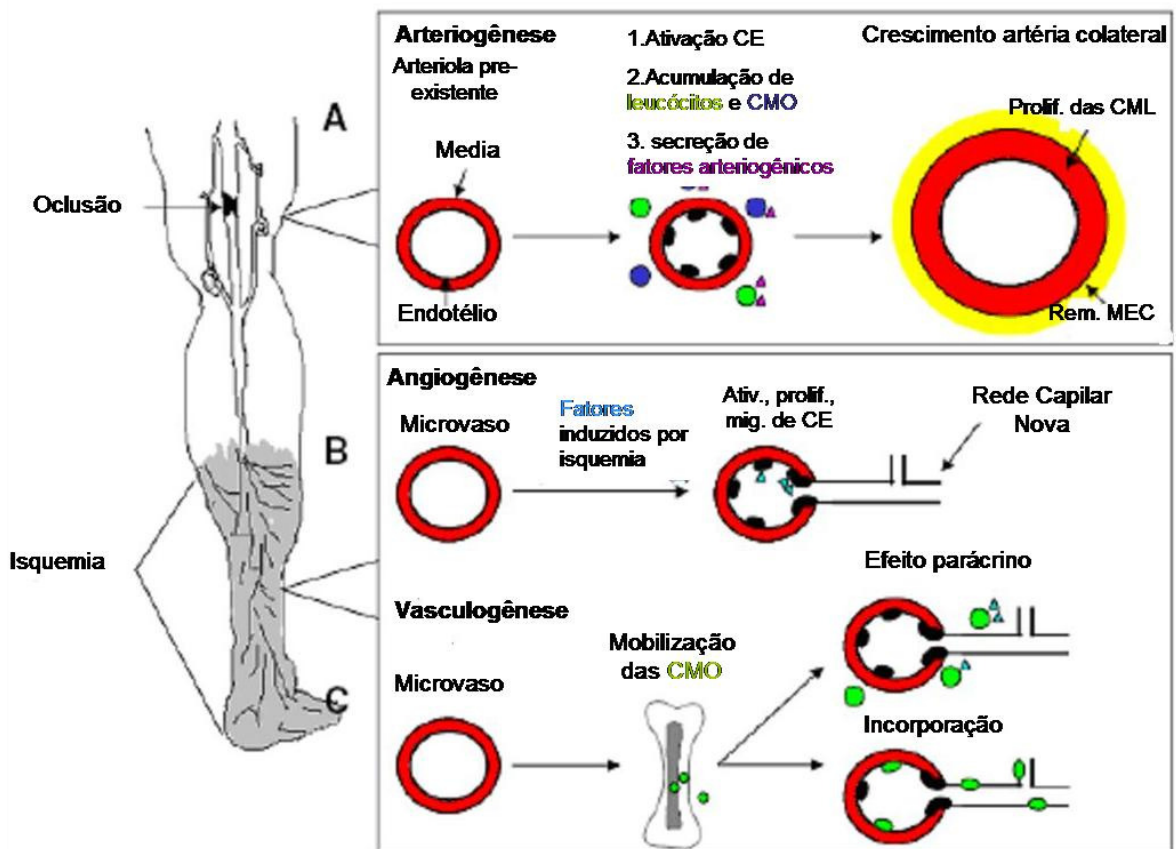


Figura 4. Representação esquemática da arteriogênese, angiogênese e vasculogênese. (A) arteriogênese, (B) angiogênese, (C) vasculogênese; CE= Células endoteliais; CMO= Células de Medula Óssea; CML= Células Musculares Lisas. (adaptado de VAN WEEL et al., 2008).

1.1.2.b. Angiogênese

A angiogênese, dos 3 processos, é o mais bem conhecido e descrito na literatura. É o processo pelo qual ocorre formação de novos vasos capilares a partir de uma rede preexistente. Complexo, envolve ativação, migração e proliferação de células endoteliais (TOMANEK & SCHATTEMAN, 2000) (Fig. 4B). É essencial tanto para a reprodução, o desenvolvimento e o reparo, quanto para o desenvolvimento de doenças angiogênicas, como artrite, psoríase, hemangiomas e retinopatia diabética (TOMANEK & SCHATTEMAN, 2000).

É um processo decorrente, na maioria dos casos, de uma isquemia local. A diminuição da tensão de oxigênio local induz a expressão de genes induzidos pela hipóxia, como o fator de transcrição fator induzível pela hipóxia-1 (HIF-1, *Hypoxia*

Inducible Factor -1), que por sua vez, leva a superexpressão de um grande número de genes pro-angiogênicos, como VEGF e seu receptor VEGF-R2; fator derivado de células estromais -1 (SDF-1, *Stromal Cell-derived Factor*) e seu receptor CXCR4 (*CXC Chemokine Receptor*); Angiopietina -2 (Ang-1) e Eritropoietina (VAN WEEL et al., 2008).

1.1.2.b.i. Processo Angiogênico

O processo angiogênico, por sua vez, é um complexo processo biológico que requer a atuação precisa dos diferentes tipos celulares componentes dos vasos sanguíneos, seguindo uma cascata rígida de acontecimentos. Sua regulação se dá pelo balanço de uma variedade de moléculas efetoras agonistas e antagonistas.

O primeiro passo na angiogênese é a vasodilatação dos vasos preexistentes e o óxido nítrico (ON) possui papel importante nesse processo (CARMELIET, 2000). O VEGF induz a atividade da ON sintase nas células endoteliais, aumentando sua permeabilidade. Como resultado, o aumento do nível do ON leva ao relaxamento das células musculares lisas. Em consequência, o transporte de proteínas plasmáticas, como fibrinogênio e plasminogênio, da corrente sanguínea para os tecidos circundantes aumenta, atuando como arcabouço para a migração das células endoteliais (DISTLER et al., 2003).

O segundo passo é a degradação da membrana basal endotelial e remodelamento do estroma perivascular. Os maiores efetores nesses processos são a angiopietina 2 e as metalo-proteínases de matriz (MMP, *Matrix Metalloproteinases*) (MOSES, 1997). O tipo de protease ativada durante a angiogênese depende da composição da matriz extracelular que circunda o vaso (STETLER-STEVENSON, 1999).

O terceiro passo é a migração e proliferação das células endoteliais, consequência da atuação de moléculas angiogênicas. Estas incluem membros da família do VEGF e FGF, angiopietina 1 e 2, angiogenina, fator de crescimento epidérmico (*EGF, epidermal growth factor*), CXC-quimiocinas e fator de crescimento semelhante a insulina-1 (*IGF-1, Insulin-Like Growth Factor-1*). VEGF e angiopietinas atuam como fatores específicos para as células endoteliais, enquanto os FGF,

angiogenina, EGF, CXC-quimiocinas e IGF-1 induzem a proliferação de uma variedade de tipos celulares (DISTLER et al., 2003). As células endoteliais proliferativas migram obedecendo a um gradiente dessas moléculas.

O quarto e último passo é a formação do lúmen e estabilização dos vasos. Quando atingem a área com reduzida densidade vascular, as células endoteliais se arranjam em monocamada, que, posteriormente, tem suas extremidades unidas para formar a estrutura tubular. Finalmente, o tubo vascular tem que ser estabilizado pelas células murais. Para isso, as células mesenquimais dos tecidos circundantes proliferam e migram para a face abluminal dos vasos prematuros, dando origem aos pericitos, localizados internamente a membrana basal, ou as células vasculares musculares lisas, localizadas externamente a membrana basal (KURTZ, 2000).

1.1.2.b.ii. Moléculas Reguladoras da Angiogênese

O brotamento angiogênico é controlado por um delicado balanço entre moléculas pro e anti-angiogênicas (KOCH, 1998; CARMELIET, 2000). Fatores solúveis ou ligados à membrana, interação célula-matriz e efeitos hemodinâmicos, como pressão sanguínea, estão envolvidos na regulação da angiogênese.

De todos os indutores de angiogênese, o VEGF é o melhor caracterizado e provavelmente a molécula mais importante. Um defeito em um único alelo em camundongos, resultando em uma redução de 50% da expressão de VEGF, causa um defeito grave na vasculatura e resulta na morte do embrião (KOCH, 1998; CARMELIET, 2000).

O *splicing* alternativo desse gene produz seis isoformas (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆), que diferem em suas propriedades e funções. VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆ estão normalmente associadas com a superfície celular ou matriz extracelular devido suas afinidades com heparan sulfato, enquanto VEGF₁₂₁ continua livre no fluido extracelular (HOUCK et al., 1992). Além disso, estas isoformas podem apresentar efeitos contrários no diâmetro do vaso durante sua formação.

VEGF está envolvido na regulação de múltiplos passos da angiogênese. Conforme mencionado anteriormente, VEGF contribui para a vasodilatação inicial pelo ON e aumenta a permeabilidade das células endoteliais pelo aumento do transporte via

organelas vesiculo-vasculares (KOHN et al., 1992). Além disso, VEGF induz a síntese de ativadores de plasminogênio e MMP-1 em células endoteliais (PEPPER et al., 1991) e dessa maneira atua no remodelamento da matriz perivascular. O VEGF também induz a proliferação das células endoteliais *in vitro*, estimulando a sua migração e prevenindo a apoptose (CONNOLLY et al., 1989; GERBER et al., 1999; DIMMELER et al., 2000).

Outro fator atuante na angiogênese é o PDGF. Atua na proliferação *in vitro* das células endoteliais, sendo expresso por células endoteliais não-angiogênicas (BATTEGAY et al., 1994). No momento em que são estimuladas a formar estruturas tubulares, as células endoteliais não-angiogênicas deixam de expressar PDGF-B e passam a expressar seu receptor, PDGFR-B (BATTEGAY et al., 1994). Além disso, PDGF-BB é um mitógeno para células musculares lisas e pericitos (EDELBERG et al., 1998), induz a expressão de VEGF e VEGF-R2 nas células endoteliais cardíacas (BATTEGAY et al., 1994) e quando injetado em modelos de isquemia de membro promove a angiogênese (DISTLER et al., 2003).

Camundongos deficientes em PDGF-B ou na subunidade β do receptor PDGF morrem de edema e hemorragia logo após o nascimento, causada pela ausência de células vasculares murais, indicando que PDGF é essencial para a estabilização dos vasos (LINDAHL et al., 1997).

Por fim, ambos os fatores EGF e TGF- α (TGF- α , *Transforming Growth Factor – Alpha*) se ligam ao receptor de EGF (EGFR, *EGF receptor*) e atuam na angiogênese. A ativação da sinalização do EGFR em células cancerosas está relacionado com o aumento da proliferação, angiogênese e metástase, além de redução da apoptose (BASELGA, 2002). Ainda em células cancerosas, a estimulação com EGF resulta em um aumento de VEGF concentração-dependente em diferentes linhagens de câncer de próstata (RAVINDRANATH et al., 2001). Além desse efeito indireto, as moléculas EGF e TNF- α são mitogênicas para as células endoteliais e demonstraram ser capazes de promover angiogênese *in vivo* (SCHREIBER, WINKLER & DERYNCK, 1986).

Várias outras moléculas estão ligadas a angiogênese, mas seus papéis ainda não estão totalmente caracterizados.

1.1.2.c. Arteriogênese

Em 2001, a arteriogênese foi descrita por Schaper e colaboradores como o desenvolvimento de artérias colaterais a partir de uma rede pré-existente (VAN ROYEN et al., 2001). É um mecanismo natural que ocorre ao redor da artéria ocluída, na região proximal da oclusão (Fig. 4A). Comparativamente a angiogênese e a vasculogênese, a arteriogênese parece ser estimulada por estímulos mecânicos e não pela hipóxia (VAN WEEL et al., 2008). Forças longitudinais, circunferenciais e radiais na parede dos vasos, causados pelo aumento da pressão sanguínea, desencadeiam a proliferação das células musculares lisas formadoras da parede arteriolar (SCHEEL et al., 1979).

De fato, em experimentos com coelhos, angiografias mostram que o crescimento de colaterais em artérias não está associado com a produção de metabólitos intermediários indicativos de isquemia ou expressão de genes induzidos pela hipóxia, como VEGF ou HIF-1 (DEINDL et al., 2001; HERSHEY et al., 2001). O curso temporal entre o crescimento de capilares e arteríolas, por sua vez, foi distinto. Capilares se formaram 5 dias depois da remoção da artéria, estando associado com o aumento de lactato no sangue e expressão de VEGF no músculo. Já as arteríolas se formaram 10 dias após a remoção da artéria, sem os sinais de isquemia mencionados (DEINDL et al., 2001; HERSHEY et al., 2001).

1.1.2.c.i. Moléculas Reguladoras da Arteriogênese

Especialmente importante na mediação da arteriogênese, estão um grupo de genes heterogêneos relacionados com quimio-atração e infiltração de células circulantes. Sharper e colaboradores descreveram a ligação de monócitos ao endotélio dos vasos colaterais e ainda notaram a acumulação de macrófagos no espaço perivascular (SCHAPER et al., 1976).

Uma das mais potentes citocinas pro-arteriogênicas é o MCP-1 (MCP-1, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*). Ito e colaboradores infundiram-na localmente na circulação colateral em crescimento, após a ligação da artéria femoral (ITO et al., 1997). Como resultado obtiveram um significativo aumento da condutância colateral, comparado com o grupo controle. Esses achados renderam ao MCP-1, tanto como a outras CC-quimiocinas com potencial arteriogênico, potencial uso para clínica.

Outro grupo de citocinas que exercem efeito na arteriogênese são os fatores estimuladores de colônia de granulócito/macrófago e de granulócito (GM- e G-CSF, *Granulocyte/Macrophage-* e *Granulocyte -Colony Stimulator Factor*). Diferentemente do MCP-1, cuja eficácia é dependente de infusão intra-arterial, tanto a aplicação intravascular (BUSCHMANN et al., 2001) quanto a subcutânea (SCHNEELOCH et al., 2004) tiveram efeito na arteriogênese de animais experimentais. Devido a possibilidade de uma rota de administração sistêmica, ensaios clínicos aplicando GM-CSF em pacientes com doenças na artéria coronária e doenças vasculares periféricas foram iniciados (ZBINDEN et al., 2005; VAN ROYEN et al., 2005).

Outro fator atuante na arteriogênese é a família do fator FGF. Durante o crescimento arteriolar colateral, os macrófagos peri-vasculares, fonte importante para a isoforma 2 de FGF, estimulam a proliferação das células vasculares lisas via ativação do receptor FGF-R1 (DEINDL et al., 2003).

Além de fatores diretos, outras estratégias são capazes de estimular a arteriogênese. A mais curiosa é o exercício físico (NIEBAUER et al., 1995; PRIOR et al., 2003). Zbinden e colaboradores demonstraram que o exercício proporciona crescimento colateral da coronária em corredores saudáveis de maratona (ZBINDEN et al., 2004). Em 2007, o mesmo grupo verificou efeito semelhante em pacientes com doenças arteriais coronárias, demonstrando uma relação de dose-resposta entre ganho na capacidade de exercício e aumento do fluxo sanguíneo colateral (ZBINDEN et al., 2007).

1.1.2.d. Vasculogênese

A emergência do sistema sanguíneo vascular, também conhecida como vasculogênese, é um dos eventos primordiais da embriogênese. Durante o desenvolvimento embrionário, as células mesodermis se diferenciam em hemangioblastos, progenitores tanto da linhagem hematopoética quanto endotelial, que posteriormente darão origem aos vasos sanguíneos. Em seguida, a vasculogênese é completada com a formação do plexo vascular primário, e todas as transformações seguintes que acontecem na rede vascular seriam consequência do processo angiogênico (KARAMYSHEVA, 2008).

Até alguns anos atrás, pensava-se que não ocorria vasculogênese no adulto e a formação de vasos na vida pós-natal era consequência apenas da angiogênese. Contudo, estudos recentes sugerem a persistência de precursores endoteliais na vida adulta, que contribuiriam para a revascularização (ASAHARA et al., 1997). Estes precursores endoteliais, denominados células progenitoras endoteliais (EPC, *Endothelial Cell Progenitor*), tem sido isolados da MO e do sangue periférico circulante (PEICHEV et al., 2000). A incorporação substancial de EPC na parede de vasos é raramente reportada (HATTORI et al., 2001; GARCIA-BARROS et al., 2003) e, freqüentemente, tem uma contribuição mínima (WAGERS et al., 2002; RAJANTIE et al., 2004; ZIEGELHOEFFER et al., 2004; PETERS et al., 2005), levando a crer que sua atuação seja através da secreção de fatores angiogênicos (KINNAIRD et al., 2004; URBICH & DIMMELER, 2004) (Fig. 4C).

1.1.2.d.i. Fatores Reguladores da Vasculogênese

Didaticamente, os fatores reguladores da vasculogênese podem ser divididos em duas classes: os que a regulam durante a embriogênese e os que a regulam durante a vida adulta.

Durante a vasculogênese embrionária, a ativação de FGF-2, a isoforma A de VEGF e seus receptores, VEGF-R1 e -R2, possuem papel decisivo (RISAU & FLAMME, 1995; FLAMME et al., 1997). O FGF-2 secretado pelas células endodermis é responsável por induzir, no mesoderma vizinho, sua diferenciação para hemangioblasto e a expressão de VEGF-R2 (RISAU & FLAMME, 1995; WILTING & CHRIST, 1996; FLAMME et al., 1997). VEGF-R2 é o mais específico e o mais anteriormente expresso marcador e mediador para a determinação de células mesodermis em angioblastos (RISAU & FLAMME, 1995; NISHIKAWA et al., 1998; SAHA, COX & SIPE, 2004). Tem alta afinidade pelo VEGF-A, expresso pelo mesoderma e endoderma do embrião durante o crescimento, levando ao aumento de sua expressão nos progenitores endoteliais (KOTCH et al., 1999; MIQUEROL et al., 1999; EMA et al., 2003).

O sistema VEGF-A/ VEGF-R2 tem papel importante na expansão e migração de angioblastos, sua diferenciação em células endoteliais e manutenção da integridade do

endotélio vascular (FERRARA, 1999; HIDAKA et al., 1999; SCHUH et al., 1999; VOKES & KRIEG, 2002). Outros fatores, como TGFs, moléculas de matriz extracelular e de adesão estão envolvidas na vasculogênese pré-natal (PATAN, 2000; GORDON & BLOBE, 2008).

O conhecimento acerca dos mecanismos que controlam a vasculogênese no adulto é ainda bastante restrito. No desenvolvimento de certas desordens, como cardiopatias, doenças arteriais obstrutivas e reparo tecidual, tem sido observada a presença rápida de progenitores endoteliais na circulação associados com a expressão de fatores de crescimento, como VEGF e SDF-1 (ASAHARA et al., 1999; CAPLICE & DOYLE, 2005; LUTTUN, CARMELIET & CARMELIET, 2002; EGUCHI et al., 2007).

O VEGF-A é um fator chave na cinética de progenitores endoteliais da MO, sua presença controla, em diferentes níveis, a expressão de VEGF-R2 e neuropilina 1 nas células progenitoras da MO (PEICHEV et al., 2000; TORDJMAN et al., 2001; RABBANY et al., 2003), levando, através da ligação com seu receptor, a proliferação e migração destas células.

Já o G-CSF é um potente mobilizador de células-tronco derivadas da MO e mostrou ser capaz de reduzir danos no miocárdio e disfunção ventricular, ambos conseqüências do infarto (IWANAGA et al., 2004). Estudos em pacientes reportaram que, após a injeção de G-CSF, há melhora da função ventricular esquerda, efeito benéfico que foi corroborado por 3 diferentes estudos independentes (ENGELMANN et al., 2006; RIPA et al., 2006; ZOHLNHOFER et al., 2006).

Recentemente foi descoberto que o estrogênio tem capacidade de neovascularização e mobilização das células progenitoras endoteliais (STREHLOW et al., 2003; SUGAWARA et al., 2005; MASUDA et al., 2007). Sua secreção atinge o máximo no período pré-ovulatório, e induz a proliferação e migração de células progenitoras endoteliais, além de protegê-las da apoptose (IWAKURA et al., 2003).

1.2. EPCs e Reparo Tecidual

A contribuição de EPCs para a neovascularização no adulto tem sido documentada em vários estudos. Atuando, por exemplo, na isquemia, cicatrização,

aterosclerose e vascularização tumoral (CARMELIET, 2004; KHAKOO & FINKEL, 2005).

Apesar de amplamente demonstrados no sangue periférico, ainda existe alguma controvérsia quanto à identificação e origem dos EPC (INGRAM et al., 2004; ELSHEIKH et al., 2005; FADINI et al., 2005; WALENTA, FRIEDRICH & SEHNER, 2005; YODER et al., 2007). Esta controvérsia se deve ao fato de que diferentes populações celulares, presentes na fração mononuclear do sangue periférico ou MO, são capazes de aderir ao plástico e, quando cultivadas em meios seletivos podem adquirir o fenótipo endotelial (URBICH & DIMMELER, 2004). No entanto, este aspecto não impediu o desenvolvimento de estratégias terapêuticas com este tipo celular visando a neovascularização de tecidos isquêmicos.

Em 1997, Asahara e colaboradores, além de isolar e expandir *in vitro* EPCs a partir de sangue periférico humano, testaram, com sucesso, o potencial dessas células na indução da revascularização de tecidos isquêmicos em modelo de isquemia crítica de membros (ASAHARA et al., 1997; KALKA et al., 2000). Este modelo é bastante utilizado e elucidativo, uma vez que, os resultados são nítidos e bem definidos, culminando ou com a amputação do membro, como ocorre nos pacientes, ou com a recuperação do mesmo (IWAI, 2004).

O sucesso obtido com os EPCs expandidos *in vitro*, levou a se propor a utilização destas células como terapia angiogênica, porém devido a sua raridade no sangue periférico, sua aplicação clínica é limitada (TATEISHI-YUYAMA et al., 2002).

1.3. Doenças Vasculares Periféricas

Doenças vasculares periféricas são o maior problema de saúde em uma sociedade que está envelhecendo. Caracteriza-se por dor forte e persistente em repouso, que, em estágios tardios, pode se acompanhar de úlceras ou mesmo gangrena de dedos e pés. Frequentemente, o processo evolui para a necessidade de amputação em 1/3 dos pacientes (OURIEL, 2001).

A principal causa de isquemia periférica é a obstrução arterial, em geral como consequência da aterosclerose, ou seja, deposição de placas de gordura, que frequentemente levam à trombose e consequente obstrução da luz do vaso

(NICOLAIDES, 2000). Não existem muitos dados sobre a incidência desta afecção, principalmente no Brasil, mas a claudicação, sintomas associados a esta doença, é observada em 1,8% dos pacientes acima de 60 anos, tornando-se mais comum nas idades mais avançadas. Doenças como diabetes e obesidade, que pode levar a diabetes resistente a insulina, além de maus hábitos, como o tabagismo, podem triplicar a incidência desta enfermidade (MATSI et al., 1993; IWAI, 2004).

Com o progressivo envelhecimento da população mundial, aliado ao aumento da incidência de diabetes e obesidade, deve-se imaginar que esta patologia poderá afetar um número considerável de pacientes, com perda da qualidade de vida e freqüentes complicações associadas, além de um grande ônus para o governo.

Os tratamentos convencionais não são eficazes em todos os casos, em função disto, inúmeros protocolos de terapia gênica e medicina regenerativa têm sido propostos (IWAI, 2004).

1.4. Medula Óssea e Células-Tronco Mesenquimais

Na medula óssea, co-existem e cooperam ao menos dois tipos de células-tronco: as células-tronco hematopoéticas e as MSC sendo estas responsáveis pela manutenção da população celular não hematopoética que constitui o estroma da medula. *In vivo*, as células hematopoéticas são continuamente formadas, enquanto que as células estromais estão mais quiescentes (BIANCO & ROBEY, 2000).

O estroma medular é composto de vários tipos celulares, que incluem osteoblastos, células reticulares ou adventiciais, células acumuladoras de gordura, miofibroblastos, células endoteliais, células musculares lisas da parede vascular, células dendríticas e macrófagos (VERFAILLIE, 2000; BIANCO et al., 2001). As MSCs, também chamadas de células-tronco estromais, também residem na fração estromal da MO, possuem capacidade proliferativa, de auto-renovação e de diferenciação para fenótipos terminalmente diferenciados, como osteoblastos, condrócitos, adipócitos, neurônios, células musculares esqueléticas, células endoteliais e células musculares lisas vasculares (WAKITANI, SAITO & CAPLAN, 1995; PITTENGER et al., 1999; MINGUELL, ERICES & CONGET, 2001; REYES et al., 2002). Algumas das vias de

diferenciação das MSCs, além das moléculas reguladoras da diferenciação nestas linhagens celulares, estão representadas na Fig. 5.

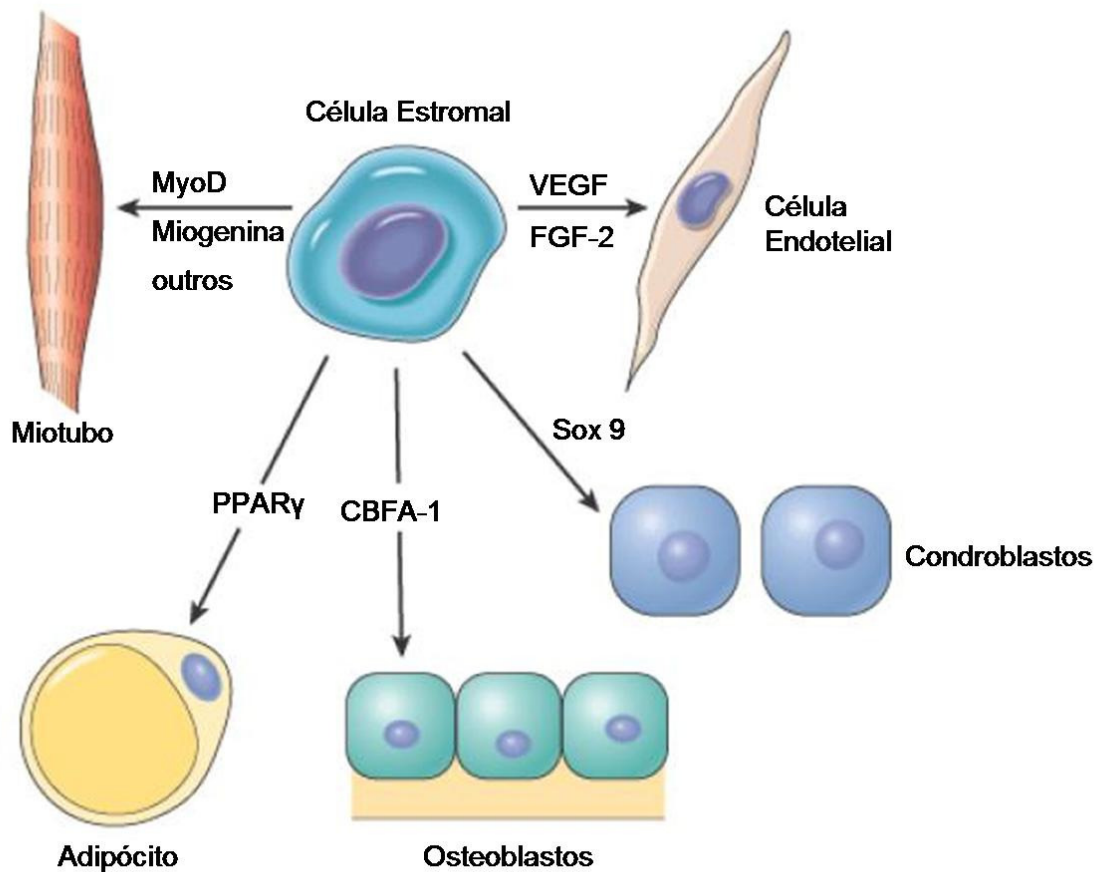


Figura 5. Algumas vias de diferenciação das MSC de MO. A ativação de proteínas regulatórias chave, por fatores de crescimento, citocinas e componentes da matriz extracelular, leva ao comprometimento das células estromais para linhagens celulares específicas (adaptado de ROBBINS & COTRAN, 1999).

Ainda não há um consenso entre os pesquisadores sobre a definição e localização da MSC ou sobre como elas devem ser isoladas e expandidas *in vitro*. (HERZOG et al., 2003). O fato das MSC estarem presentes em todos os tecidos e órgãos sugere uma localização perivascular, como os pericitos, que foi recentemente confirmada (SACCHETTI et al., 2007; CRISAN et al., 2008; SHI & GRONTHOS, 2003; DA SILVA-MEIRELLES, CHAGASTELLES & NARDI, 2006; DA SILVA-MEIRELLES, CAPLAN & NARDI, 2008).

Sachetti e colaboradores demonstraram a existência na MO de um tipo celular que expressa CD146, marcador característico de células perivasculares, além das propriedades de auto-renovação e multipotencialidade, características das MSCs (SACCHETTI et al., 2007). Assim, a associação das MSC aos vasos faria delas uma fonte para reparo e regeneração de lesões locais (DA SILVA-MEIRELLES, CHAGASTELLES & NARDI, 2006; DA SILVA-MEIRELLES, CAPLAN & NARDI, 2008).

A atuação das MSC/pericitos no reparo de um tecido lesado, seria não apenas pela reposição de células diferenciadas, mas também pela liberação de fatores (DA SILVA-MEIRELLES, CAPLAN & NARDI, 2008). Tais fatores contribuiriam para promoção de sobrevivência e proliferação de células locais (MAHMOOD, LU & CHOPP, 2004), indução de angiogênese (SHYU et al., 2006), e redução da apoptose (HUNG et al., 2007). Contudo, somente para MSC de MO e polpa dendária (SHI & GRONTHOS, 2003), sistema nervoso central (DORE-DUFFY et al., 2006) e TA (TRAKTUEV et al., 2008; ZANNETTINO et al., 2008) o nicho perivascular foi descrito.

Observações recentes sugerem que as MSCs não só estariam presentes no nicho perivascular como na verdade teriam identidade de pericitos, que, como mencionado anteriormente tem papel importante na angiogênese (HIRSCHI & D'AMORE, 1996; LU et al., 2008). Estes achados recentes estão de acordo com as observações de que pericitos isolados de microvasculatura de retina bovina apresentam, além do potencial de sustentar a hematopoese (TINTUT et al., 2003), capacidade de diferenciação em osteoblastos (SCHOR et al., 1990), condroblastos e adipócitos (FARRINGTON-ROCK et al., 2004). Para Caplan (2008), o fato de células de diversos órgão expressarem marcadores de células mesenquimais e de pericitos, além do potencial de diferenciação osteo-, condro- e adipogênico leva a conclusão que MSC são pericitos (CRISAN et al., 2008).

Assim, a sua capacidade de diferenciação, intrínseca relação com vasos sanguíneos e participação no reparo de tecidos fizeram das MSC fontes promissoras para uso em protocolos de terapia celular (BAPTISTA et al., 2007).

1.4.1. Potencial Angiogênico das Células de Medula Óssea

As primeiras aplicações das células de MO em tecidos isquêmicos foram realizadas com as células mononucleares de MO (CMN-MO) autólogas, que levaram a reperfusão do membro isquêmico, tanto em estudo pré-clínico (IBA et al., 2002), quanto em pacientes, onde se verificou cicatrização das lesões ulcerativas (TATEISHI-YUYAMA et al., 2002). Desta maneira, as CMN-MO foram estabelecidas como ferramentas para a terapia celular para esses tipos de enfermidades.

Contudo, são requeridas grandes quantidades de células da MO, que no momento da obtenção do aspirado medular, poderia ocasionar complicações severas, como isquemia do miocárdio, falha cardíaca, doenças cerebrais ou falha renal; logo outros tipos celulares com a capacidade semelhante foram investigados. (IWASE et al., 2005). Além disso, as CMN-MO são uma população heterogênea não se podendo precisar qual tipo celular foi o responsável pelo fenômeno observado.

Como já referido anteriormente, os EPCs persistem da vida adulta, podendo circular, diferenciar e contribuir para a formação de novos vasos (ASAHARA et al., 1997; PELOSI et al., 2002). O desencadeamento da neovascularização se inicia pelo recrutamento de EPCs. Apesar dos trabalhos anteriores apontarem as EPCs como prováveis responsáveis pelo efeito angiogênico observado e a lesão do tecido ser um ambiente permissivo necessário para o recrutamento de EPCs, a introdução de progenitores exógenos podem facilitar a revascularização (MOON et al., 2006).

Em 2003, o potencial das MSC-MO de promover revascularização foi testado em modelo de isquemia de membros inferiores, obtendo grande sucesso (AL-KHALDI et al., 2003). Posteriormente, um estudo pré-clínico comparativo do potencial angiogênico das CMN-MO e MSC-MO, mostrou que estas promoviam melhor reperfusão, bem como maior densidade capilar, e reduzida necrose e auto-amputação do membro (IWASE et al., 2005).

As MSC são pouco freqüentes na MO, porém possuem técnicas simples de isolamento, alta expansividade em cultura e pluripotência (KIM et al., 2007). Entretanto, para se obter número suficiente de células pra transplantes, são necessários grandes volumes de aspirado medular, além de longo tempo de

manipulação *ex vivo*. Sendo assim, a investigação sobre fontes alternativas as MSC-MO se fez necessária.

1.5. Tecido Adiposo e as Células-Tronco Mesenquimais

O tecido adiposo (TA) branco é um tecido especializado no armazenamento energético (HAHN & NOVAK, 1975) e, hoje em dia tem sido considerado também um órgão endócrino (CASTEILLA & DANI, 2006). Seu desenvolvimento em humanos tem início no segundo terço do período gestacional com a agregação de uma densa massa de células mesenquimais indiferenciadas, orquestrada com o início da organização vascular. As células desses agregados diferenciam-se para células adiposas primitivas, adjacentes a capilares. Estágios mais avançados do desenvolvimento do TA estão relacionados ao crescimento dos agregados e a maturação das células adiposas (HAUSMAN & RICHARDSON, 2004).

A fração estromal oriunda do TA é constituída de pré-adipócitos (precursores dos adipócitos), células endoteliais, macrófagos e fibroblastos (WELLEN & HOTAMISLIGIL, 2003; CASTEILLA & DANI, 2006), além de células-tronco mesenquimais com propriedades semelhantes as da MO, dentre elas a capacidade de diferenciação em fenótipos mesenquimais (Fig. 5). Assim, este tecido se torna uma excelente alternativa para terapias celulares, embora raros trabalhos tenham conduzido experimentos controlados comparando o potencial das células isoladas da MO com as do TA (BAPTISTA et al., 2007).

Agravante é o fato de que, assim como as MSC-MO, as MSC do TA (MSC-TA) são isoladas pela sua propriedade de adesão ao plástico e deve-se, portanto, considerar que esta população aderente é heterogênea, pois pelo menos dois tipos celulares estariam presentes: pré-adipócitos, com limitada capacidade de auto-renovação e de diferenciação, e células mesenquimais multipotentes e capazes de se auto-renovar ilimitadamente (CASTEILLA & DANI, 2006). O procedimento cirúrgico simples, o fácil acesso ao TA subcutâneo, assim como a baixa complexidade para seu isolamento, fazem das MSC-TA uma fonte atrativa para a pesquisa e a clínica (CASTEILLA et al., 2005)

Alguns pesquisadores acreditam que essas células são bastante semelhantes as MSC-MO (ZUK et al., 2001; WAGNER et al., 2005; IZADPANA et al., 2006; KERN et al., 2006), porém outros crêem em suas propriedades únicas, principalmente em relação ao potencial adipogênico (CASTEILLA et al., 2005; BAPTISTA et al., 2007; LIU et al., 2007)

A localização das MSC-MO é perivascular, podendo ser chamados de pericitos especializados (BIANCO et al., 2001; SACCHETTI et al., 2007). Este nicho perivascular também foi descrito para as MSC-TA (ZANNETTINO et al., 2008) e de todos os órgãos no organismo adulto (DA SILVA-MEIRELLES, CHAGASTELLES & NARDI, 2006). Esta localização é de importância capital no momento da lesão tecidual, facilitando a mobilização das MSC para o sítio do reparo tecidual (DA SILVA-MEIRELLES, CHAGASTELLES & NARDI, 2006; LAMAGNA & BERGERS, 2006).

1.5.1. Potencial Angiogênico das Células de Tecido Adiposo

O requerimento do desenvolvimento de uma rede de capilares para o remodelamento do tecido adiposo (CASTELLOT, 1990; BOULOUMIE et al., 1998) e o fato de agentes anti-angiogênicos promoverem a perda do mesmo (RUPNICK et al., 2002), nos faz crer numa ligação crucial entre as células adiposas e a rede vascular circundante.

As MSC-TA são produtoras de potentes fatores angiogênicos, como VEGF e HGF (DOBSON et al., 1990; BOULOUMIE et al., 1998; SIERRA-HONIGMANN, NATH & MURAKAMI, 1998), além de capacidade de diferenciação em células endoteliais. De fato, Casteilla e colaboradores, em 2004, demonstraram, que as MSC-TA humanas se diferenciavam espontaneamente em células com fenótipo endotelial, que formavam estruturas tubulares em Matrigel (PLANAT-BENARD et al., 2004).

Em 2005, Cao e colaboradores mostraram que células isoladas da fração estromal do TA subcutâneo humano, quando injetadas no músculo isquêmico de camundongos, apresentavam grande potencial angiogênico (CAO et al., 2005). Curiosamente, comparando-se seu potencial com o de CMN-MO, os autores observaram que apesar da maior densidade capilar no músculo injetado com as MSC-TA, a reperfusão foi significativamente maior no injetado com CMN-MO (MIRANVILLE

et al., 2004). Resultado diferente foi obtido por Sumi e colaboradores, mostrando que as CMN-MO proporcionam perfusão semelhante as MSC-TA e maior que os adipócitos maduros. O mesmo foi observado quanto a densidade capilar (SUMI et al., 2007).

Foi proposto que o estímulo angiogênico promovido pelas MSC-TA se devia a uma regulação parácrina, com secreção de fatores angiogênicos, como VEGF, Ang -1 e -2, HGF e FGF (REHMAN et al., 2004; NAKAGAMI et al., 2005) e foi demonstrado que o meio condicionado destas células era capaz de aumentar a proliferação e manter a viabilidade de células endoteliais maduras (REHMAN et al., 2004; MOON et al., 2006). O meio condicionado das MSC-TA, quando mantidas em condições de hipóxia, se mostrou mais eficiente, demonstrando aumento da produção de fatores angiogênicos (REHMAN et al., 2004), o que mostra que estas células são capazes de responder às condições de oxigenação dos tecidos. Assim, essas células se tornam ainda mais interessantes para aplicação clínica no tratamento de isquemias.

Considerando-se estes aspectos, as MSC-TA podem ser vistas como uma excelente fonte para terapias que visem a revascularização de tecidos, não somente pelas suas propriedades pró-angiogênicas, mas também por serem relativamente mais freqüentes que sua correspondente da MO, a saber, 5.000 CFU-F por grama de tecido adiposo, enquanto a medula óssea tem 100- 1000 CFU-F por mililitro de aspirado medular (STREM et al., 2005); possuir fácil acesso e sua obtenção promove desconforto mínimo para o paciente (ZUK et al., 2001).

2. OBJETIVOS: ---

- **Principal.**

Verificar e comparar o potencial angiogênico de células mesenquimais derivadas do estroma da medula óssea e do tecido adiposo murinos em modelo de isquemia de membros posteriores.

- **Intermediários.**

1) Investigar a multipotencialidade de células mesenquimais de tecido adiposo inguinal murino.

2) Comparar o potencial angiogênico *in vivo* das células mesenquimais murinas derivadas da medula óssea e do tecido adiposo em modelo murino de isquemia de membros posteriores.

3) Comparar o potencial de MSC de TA e de MO na recuperação da força contrátil dos músculos cronicamente isquêmicos.

3) Avaliar, através de histopatologia, a capacidade das MSC de MO e de TA de proteger as fibras musculares da degeneração e da necrose pós-isquemia, de promover regeneração muscular ou de formar cicatriz fibrosa.

3. METODOLOGIA:

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos Balb/c de 10-12 semanas de vida, mantidos nos biotérios da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, São Paulo, SP ou no Departamento de Histologia e Embriologia – ICB/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ. Os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) do Hospital São Paulo – número 0729/08 (Item 9.2 dos anexos).

3.2. Isolamento e Cultura de Células

3.2.1. Obtenção de Células Mesenquimais de Medula Óssea

Os camundongos tiveram seus fêmures e tíbias dissecados íntegros. Em seguida, suas epífises foram cortadas para a realização da lavagem do canal medular com meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (LGC, Cotia, SP). A suspensão celular foi centrifugada a 375 g por 10 minutos.

O sedimento resultante foi ressuspenso em DMEM suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab, Campinas, SP), 100U/mL de Penicilina sódica (Gibco BRL, Rockville, MD) e 100µg/mL Estreptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri), para a quantificação em hemocitômetro. Em seguida, foram distribuídas em garrafas de cultura na concentração de $6-8 \times 10^5$ células/cm² e mantidas em estufa úmida nas condições padrão, 37°C com 5% de CO₂, de um dia para o outro.

Após esse período, as células não aderentes foram removidas pela lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS, *phosphate buffered saline*) e mantidas na estufa de cultura nas condições anteriores. Quando as células aderentes atingiram a confluência foram retiradas enzimaticamente, pela utilização de uma solução de Tripsina 0,125% (Gibco) e 0,78mM de EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*, Invitrogen, Gibco), e posteriormente redistribuídas em garrafas de cultura para proliferação. Este processo foi denominado passagem (#). Nos experimentos que se seguem as células foram utilizadas nas # 3 ou #4.

3.2.2. Obtenção de Células Mesenquimais de Tecido Adiposo

O tecido adiposo subcutâneo da região inguinal foi retirado e cortado com auxílio de bisturi em pequenos fragmentos de 1-2 mm², como descrito (PLANAT-BENARD et al., 2004). Resumidamente, os fragmentos de tecido adiposo foram dissociados enzimaticamente, adicionando-se 1mL de uma solução de Colagenase tipo II (Sigma Chemical Co.) 2mg/mL, para cada grama de tecido. O material foi incubado, sob agitação orbital, em banho-maria a 37°C por 20 minutos.

Após esse período, adicionou-se DMEM F12 (LGC) suplementado com 10% de soro bovino de recém nato (NCS, *Newborn Calf Serum*, Cultilab) e antibióticos, sendo, em seguida, centrifugado a 280 g por 10 minutos. O sedimento resultante foi ressuspenso novamente em DMEM F12 suplementado, em seguida, a suspensão celular foi filtrada em malha de nylon de poro de 150µm. As células foram quantificadas em hemocítmetro e distribuídas em garrafas de cultura na concentração de 0,8-1,2 x 10⁵ células/cm² e mantidas nas condições padrão, de um dia para o outro.

Após esse período, as células não aderentes foram removidas pela lavagem com PBS e mantidas na estufa de cultura nas mesmas condições anteriores. Quando as células aderentes atingiram a confluência foram retiradas enzimaticamente, pela utilização de uma solução de Tripsina 0,125% e 0,78mM de EDTA, quantificadas e redistribuídas em garrafas de cultura para expansão. Este processo foi denominado passagem (#). Nos experimentos que se seguem as células foram utilizadas nas # 3 ou #4.

3.3. Diferenciação Para as Vias Osteogênica e Adipogênica

3.3.1. Para a Via Osteogênica

As MSC-TA em semi-confluência foram induzidas por 3 semanas com meio osteogênico, contendo DMEM F12 suplementado com 10% de NCS, 250µM de Ácido Ascórbico (Sigma Chemical Co.), 10mM de β-glicerofosfato (Sigma Chemical Co.), 2,5µM de Ácido Retinóico all-trans (Sigma Chemical Co.) e antibióticos. O meio foi trocado a cada 3 dias.

Foram realizados controles pareados, mantendo as células em meio não indutor (DMEM F12 suplementado com 10% NCS e antibióticos). A diferenciação foi

acompanhada pela revelação de depósitos de cálcio, através da coloração de **Von Kossa**, observada em microscópio óptico (Leica DC300). O preparo dos reagentes e a metodologia utilizada estão descritos no item 9.1.1.a. dos anexos.

3.3.2. Para a Via Adipogênica

As MSC-TA em semi-confluência foram induzidas por 3 dias com meio indutor adipogênico, contendo DMEM F12 suplementado com 10% de NCS, 10µg/mL de Insulina (Biohulin[®], Montes Claros, MG), 1µM de Dexametasona (Sigma Chemical Co.), 0,5µM de Isobutil-metil-xantina (IBMX, Sigma Chemical Co.), 200µM de Indometacina (Sigma Chemical Co.) e antibióticos. Em seguida, o meio foi trocado para o meio de manutenção adipogênica, contendo DMEM F12 suplementado com 10% de NCS, 1µg/mL de Insulina e antibióticos, até completar 3 semanas. O meio foi trocado a cada 3 dias.

Foram realizados controles pareados mantidos em meio não indutor de composição igual ao descrito do item anterior. A diferenciação foi acompanhada pela presença de acúmulos lipídicos citoplasmáticos, através da coloração de **Oil Red O**, observada em microscópio óptico (Leica DC300). O preparo dos reagentes e a metodologia utilizada estão descritos no item 9.1.1.b. dos anexos.

3.4. Modelo Murino de Isquemia Unilateral de Membro Posterior

A cirurgia de indução de isquemia foi realizada em camundongos machos anestesiados intraperitonealmente com uma solução de ketamina (66 mg/kg) e xilazina (33 mg/kg).

O modelo de isquemia foi estabelecido pela remoção completa da artéria femoral direita e pelo fechamento de suas ramificações (artérias femoral profunda, epigástrica, safena e poplítea). Logo após a cirurgia, foi realizada a injeção intramuscular de 5×10^5 MSC de TA ou de MO em tampão PBS estéril. O tempo médio de cirurgia foi de 30 minutos.

Animais não-isquêmicos e isquêmicos, injetados com PBS estéril sem a presença de células, foram considerados como controle dos experimentos. O número

de animais utilizados foi de 10 por grupo, exceto para o grupo isquêmico não-tratado com células, em que foram utilizados 5 animais.

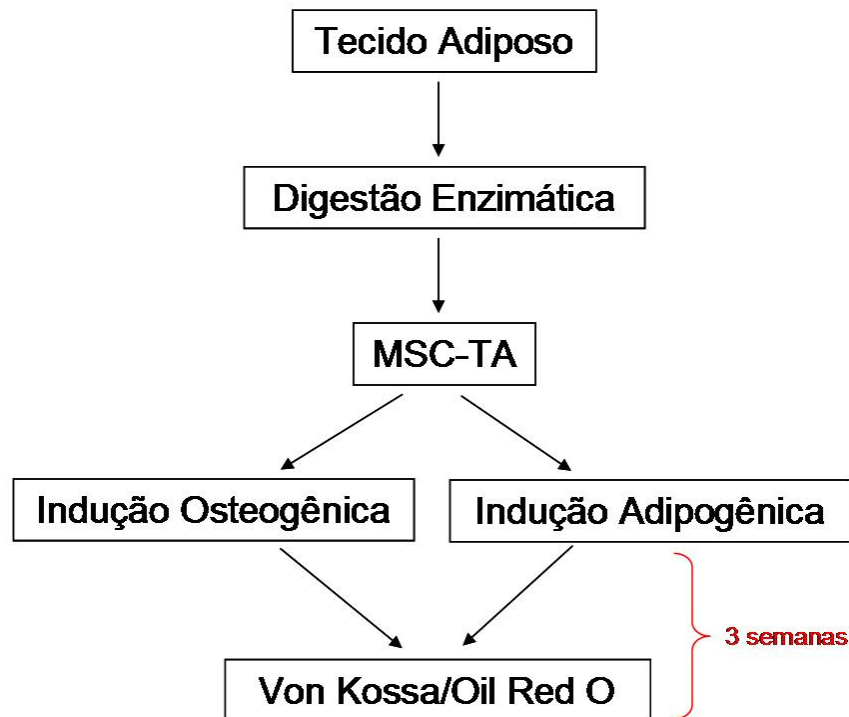


Figura 6. Fluxograma representativo da metodologia utilizada para obtenção das culturas de MSC de TA murino induzidas para as vias osteogênica e adipogênica. O tecido adiposo inguinal dos animais foi dissociado mecânica e enzimaticamente. A suspensão celular resultante foi centrifugada, o sedimento foi ressuspensão em meio de cultura suplementado e as células foram colocadas em cultura para a proliferação. Após 3 passagens, as células foram quantificadas e separadas em dois grupos para a indução para as vias osteogênica e adipogênica. Ao término de 3 semanas, as induções foram avaliadas por *Von Kossa* e *Oil Red O*, respectivamente.

3.5. Avaliação do Grau de Integridade do Membro Isquêmico e Determinação da Força Muscular

Quatro semanas após a cirurgia, os animais foram analisados visualmente para avaliação do grau de necrose do membro isquêmico, seguindo classificação já descrita na literatura (SACRAMENTO et al., 2009). Os resultados foram expressos como número de animais por escala. Foram adotados quatro níveis de classificação, sendo 1 o maior, onde há hipofuncionalidade do membro sem necrose, e 4 o menor nível, onde há atrofia total do mesmo. Os níveis estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos membros isquêmicos segundo o grau de necrose.

Escala	
1	Hipofuncional sem necrose
2	Necrose falangeal
3	Necrose acima do tornozelo
4	Atrofia total

Para avaliação da força muscular, foi utilizado método já descrito na literatura (SACRAMENTO et al., 2009). Resumidamente, os animais foram anestesiados conforme descrito anteriormente e o músculo gastrocnêmico dissecado (Fig. 7A). Em seguida o tendão de aquiles foi seccionado e ligado a um a fio inextensível que será conectado a um transdutor de força (iWorx/CB Science, Inc. Dover, USA) (Fig. 7B e C). O nervo ciático foi isolado e colocado em contato com um eletrodo ligado a um estimulador (Grass S88, Grass Instruments, Quince, Mass, USA), a estimulação seguiu um protocolo de 3 estímulos de 3 volts com frequência de 60 hertz (Fig. 7D). Em seguida, houve novo estiramento do músculo e nova estimulação elétrica até o momento que a redução do acoplamento actino-miosina ocasiona a diminuição da força mensurada.

No final do experimento, todos os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical para mensuração do peso total do animal e do músculo gastrocnêmico. Os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão da força, em gramas, realizada por cada grupo.

Para as análises histopatológicas, os músculos gastroquinêmicos foram fixados em formol 10% tamponado por 24 horas à temperatura ambiente.

3.6. Histopatologia

3.6.1. Análises Histológicas

Os fragmentos de músculo fixados foram desidratados em gradientes crescentes de álcool etílico (Vetec), clarificados em xilol (Vetec), sendo então impregnados com parafina purificada 54-56 °C (Vetec). Os cortes foram obtidos em micrótomo (LUPE, 820 Spencer) na espessura de 5 μ m e foram corados pelos protocolos estabelecidos de Hematoxilina-Eosina (H-E), Tricrômico de Masson (TC), para observação das fibras

musculares degeneradas, e Vermelho de Picrossírius (PS) modificado (DOLBER & SPACH, 1993), para a visualização de fibras colágenas. O preparo dos reagentes e a metodologia utilizada estão descritos item 9.1.2. dos anexos.

Foram avaliadas cerca de 5 secções histológicas de cada animal, sendo realizada a análise nos cortes histológicos com maior superfície de lesão.

3.6.2. Análise Histoquímica

Os cortes obtidos por microtomia foram desparafinizados, em banhos sucessivos de xilol, e hidratados, em banhos decrescentes de álcool etílico. Em seguida, as lâminas foram sujeitas à recuperação antigênica, a 98°C em tampão citrato 0,1M (pH 6.0), por 20 minutos em panela à vapor. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado pela incubação com PBS-BSA 5%: leite molico 4% por uma hora.

A biotina endógena foi bloqueada pelo kit de bloqueio avidina/biotina da Vector (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, Cat. SP-2001). As células endoteliais vasculares foram identificadas pela reação com Lectina BSL-1 (1:150, Vector), já ligada à biotina, a 4°C por 12-16 horas. A revelação foi realizada pela reação com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Dako Cytomation, Glostrup, DK).

Em seguida, os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris, desidratados em banho crescentes de álcool etílico, clarificados em banhos de xilol e selados com Entellan para posterior análise ao microscópio óptico (Zeiss Axioplan).

3.7. Quantificação da Angiogênese

A densidade dos vasos sanguíneos foi determinada em duas diferentes secções transversais do músculo isquêmico, separadas por 50 µm entre elas. O número de capilares e arteríolas foram determinados pela quantificação dos vasos Lectina BSL-1⁺ em quinze campos de cada secção, documentados utilizando-se o microscópio ótico (Zeiss Axioplan) acoplado a uma câmera digital (Evolution MP 5.0).

Para a obtenção da área de cada campo foi utilizado o programa Image-Pro Plus. A diferenciação entre capilares e arteríolas foi realizada morfológicamente. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão entre o número de vasos por área da fotografia, nas duas diferentes secções de cada músculo.

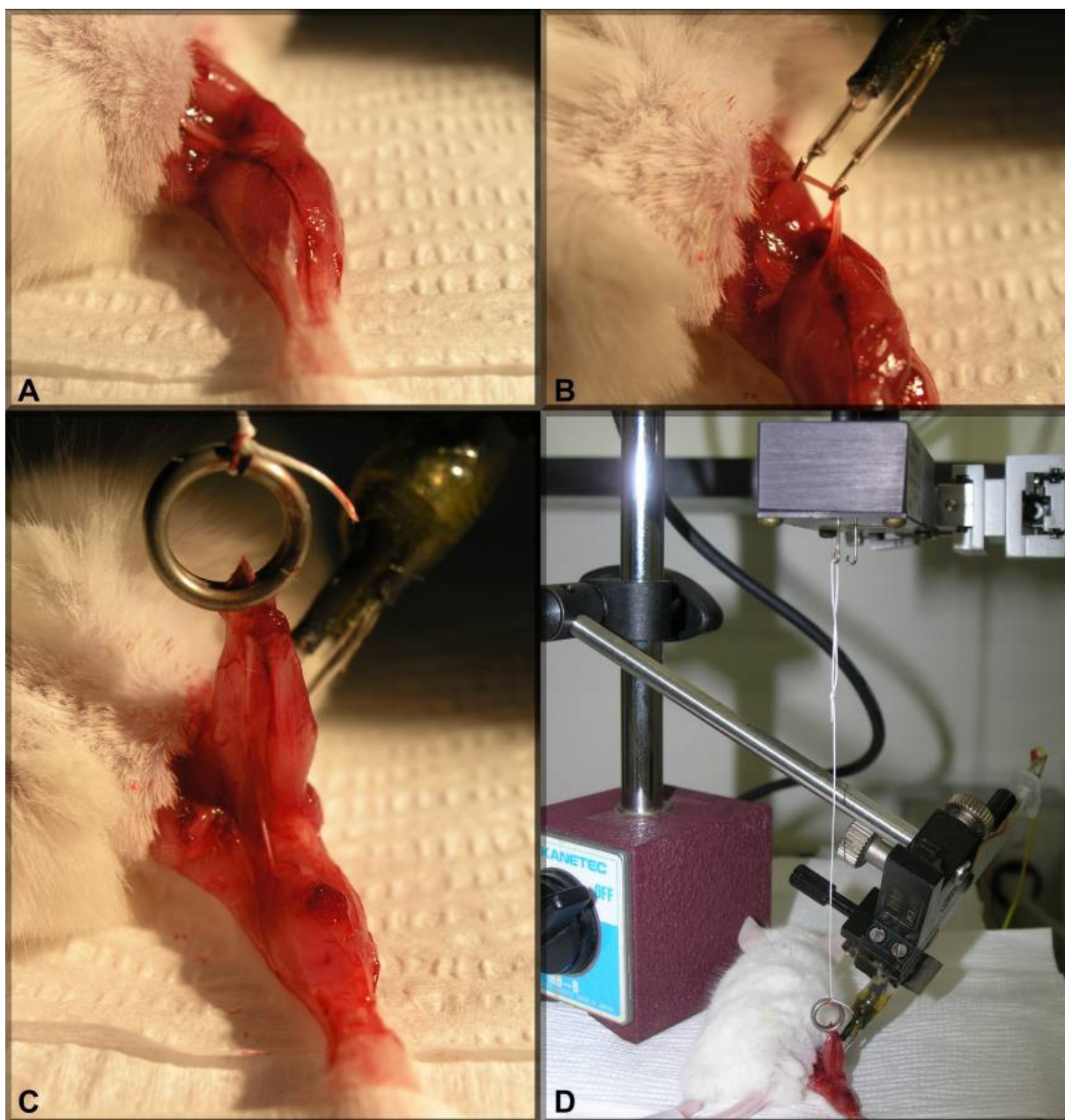


Figura 7. Determinação da força muscular. (A) Dissecção do músculo gastroquinêmico do membro isquêmico; (B) Secção do tendão de Aquiles; (C) Conexão ao transdutor de força; (D) Estimulação do nervo Ciático.

3.8 Quantificação de Área de Gordura Intramuscular

A área de gordura intramuscular foi determinada em duas diferentes seções transversais do músculo isquêmico, separadas por 50 μm e coradas pela H-E. Utilizando o programa Image-Pro Plus, foram mensuradas as áreas de tecido adiposo intramuscular e de fibras musculares em cada uma dos vinte campos documentados usando microscópio óptico (Zeiss Axioplan) acoplado a uma câmera digital (Evolution MP 5.0).

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da razão entre a área de tecido adiposo e a área das fibras musculares, nas duas diferentes seções de cada músculo.

3.9 Quantificação de Fibras Musculares Necróticas

O número de fibras necróticas foi determinado nas seções coradas pela metodologia de Tricrômico de Masson. A diferenciação das fibras musculares necróticas foi possível devido a sua afinidade tintorial diferenciada, ficando coradas em azul pálido enquanto as não-necróticas em vermelho intenso.

Os resultados foram expressos como número de animais por categoria. Foram adotadas quatro categorias, sendo 3 a pior, onde há mais de 40 fibras degeneradas por campo, e 0 a melhor, onde não há fibras musculares degeneradas. As diferentes categorias estão descritas na tabela 2. Foi utilizada a amplificação de 200X para a classificação.

Tabela 2. Classificação dos músculos isquêmicos segundo o número de fibras necróticas.

Categoria	
0	Sem fibras degeneradas
1	Menos de 20 fibras degeneradas
2	De 20 a 40 fibras degeneradas
3	Mais de 40 fibras degeneradas

3.10 Análise Estatística

Comparações entre grupos foram realizadas pelo uso do teste não-paramétrico, não-pareado, ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

A correlação entre as variáveis força e peso do músculo isquêmico foi obtida pelo uso do teste de correlação de Pearson. Valores do coeficiente de correlação (r) próximos a 1 ou -1 indicam forte correlação positiva ou negativa, respectivamente. Valores próximos de 0, tanto positivos quanto negativos, indicam fraca correlação.

Todos os gráficos e as análises estatísticas foram realizados usando o programa Prism 3.0.

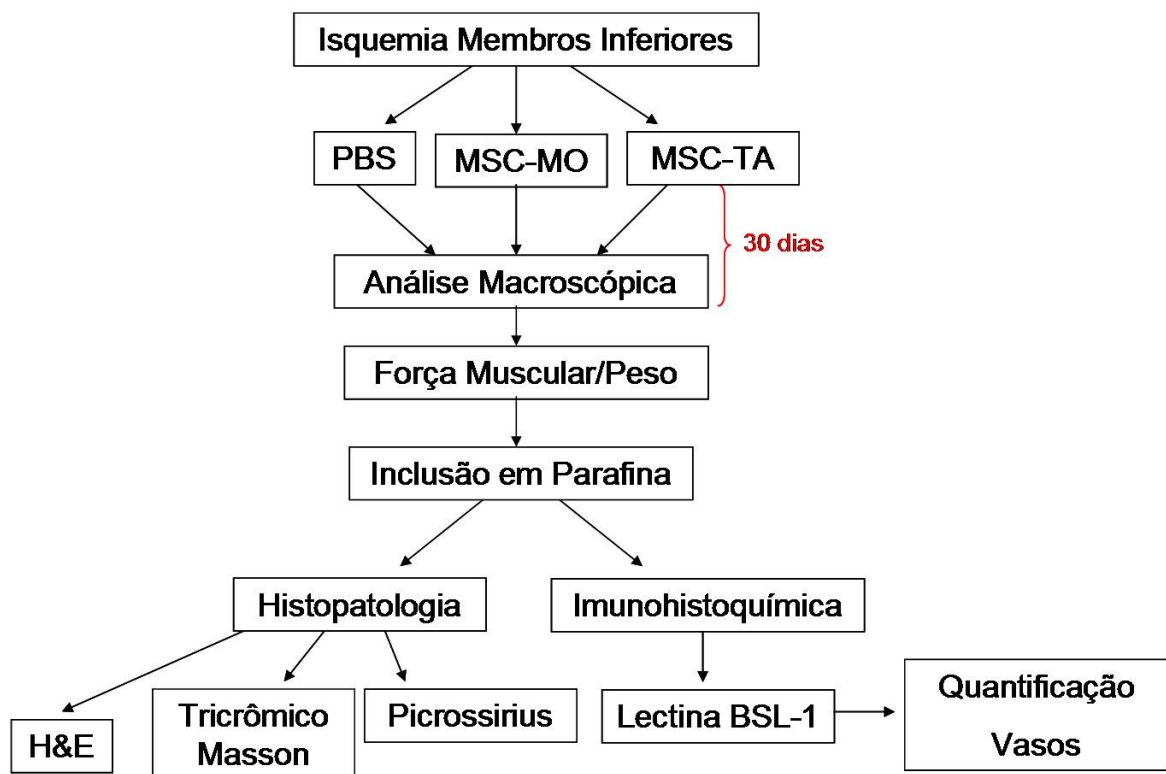


Figura 8. Fluxograma representativo da metodologia utilizada para a avaliação do efeito das MSC de MO e TA na isquemia de membros posteriores. Na ocasião da indução da isquemia foi realizada a injeção intramuscular de PBS, MSC de MO ou de TA. Após 30 dias, foi realizada a avaliação macroscópica do membro isquêmico, seguida da determinação da força muscular. Posteriormente, os animais foram eutanasiados para a medição do peso total e do músculo isquêmico que, em seguida, foi fixado, processado para inclusão em parafina e microtomizado. Parte do material foi utilizada na análise histopatológica, pelas colorações de H-E, Tricrômico de Masson e Picrossirius, e a outra parte foi utilizada na histoquímica para células endoteliais vasculares, Lectina BSL-1+, seguindo-se da quantificação dos vasos.

4. RESULTADOS:

4.1. As MSC de TA murino são capazes de se diferenciar nas linhagens adipogênica e osteogênica.

Uma das condições para uma população celular ser denominada de célula-tronco mesenquimal é a sua capacidade de diferenciação para linhagens mesenquimais, como adipócitos, osteoblastos e condrócitos, dentre outros (MINGUELL et al., 2001). Para nos certificarmos de que a população celular aderente derivada do TA inguinal de camundongos Balb/c apresentava propriedade de célula tronco mesenquimal, esta foi induzida por três semanas *in vitro* para as linhagens mesenquimais osteogênica e a adipogênica.

Verificou-se que estas células são capazes de se diferenciar para ambas as linhagens testadas (Fig. 9). Contudo, poucos depósitos de cálcio foram observados nas culturas induzidas para a linhagem osteogênica (Fig. 9B, seta branca). Vacúolos lipídicos intracitoplasmáticos foram observados nas culturas induzidas para a via adipogênica (Fig. 9C, seta) e em menor proporção nas culturas induzidas para a via osteogênica (Fig. 9B, seta preta) e nas culturas controle, não induzidas (Fig. 9A, seta), sugerindo que a população celular isolada do tecido adiposo subcutâneo murino apresenta comprometimento para a via adipogênica e limitada capacidade de diferenciação para a via osteogênica.

4.2. As MSC de TA murino estimulam a angiogênese pós-isquemia.

A análise imunohistoquímica dos músculos isquêmicos dos Grupos MO e TA demonstrou que ambos os tipos celulares são capazes de promover aumento do número de vasos sanguíneos (Fig. 10 e 11), o mesmo não ocorrendo nos animais que não receberam tratamento com células (Grupo Isquêmico - ISQ) (Fig. 10 e 11)

Embora o número de capilares no músculo dos animais tratados fosse semelhante, notou-se uma tendência no Grupo TA de apresentar maior número de capilares (Fig. 11A), porém a diferença encontrada não foi significativa. Curiosamente, o Grupo TA apresentou um número significativamente maior de arteríolas que o Grupo MO (Fig. 11B).

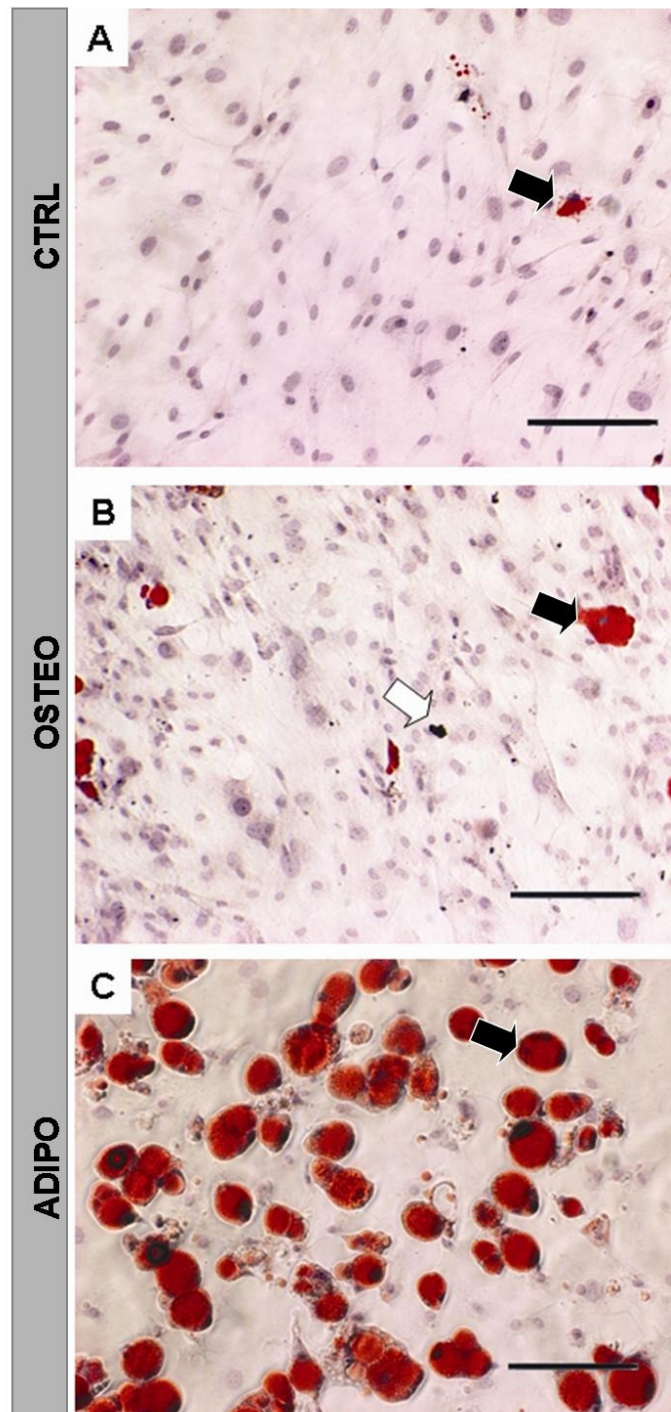


Figura 9. MSC de TA são capazes de se diferenciar *in vitro* para as linhagens osteogênica e adipogênica. As células foram mantidas por três semanas com meio controle não indutor (CTRL, A), osteogênico (OSTEO, B) ou adipogênico (ADIPO, C). A seta branca evidencia depósitos de cálcio e as setas pretas evidenciam lipídios intracitoplasmáticos. Notar a presença de acúmulos lipídicos nos grupos controle e induzido para a via osteogênica. Von Kossa e Oil Red O. Barra de aumento 50 μm . (n=3).

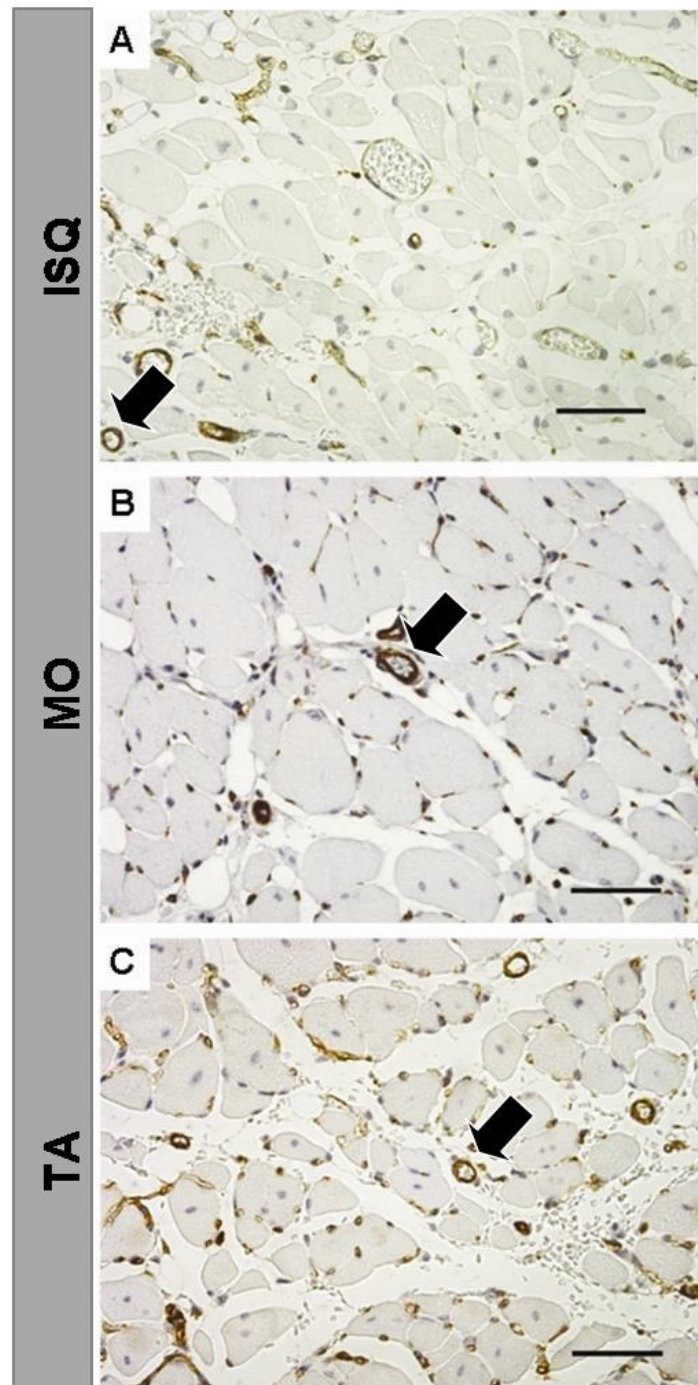


Figura 10. Imagem representativa de imunohistoquímica para lectina BSL-1 nos músculos isquêmicos. Barra de aumento 50 μ M. Grupo controle isquêmico (ISQ, A), grupo tratado com MSC-MO (MO, B) e grupo tratado com MSC-TA (TA, C). Notar a ocorrência de arteríolas, evidenciadas pelas setas pretas, nos três grupos experimentais, com destaque para maior quantidade nos animais tratados com as MSC de TA.

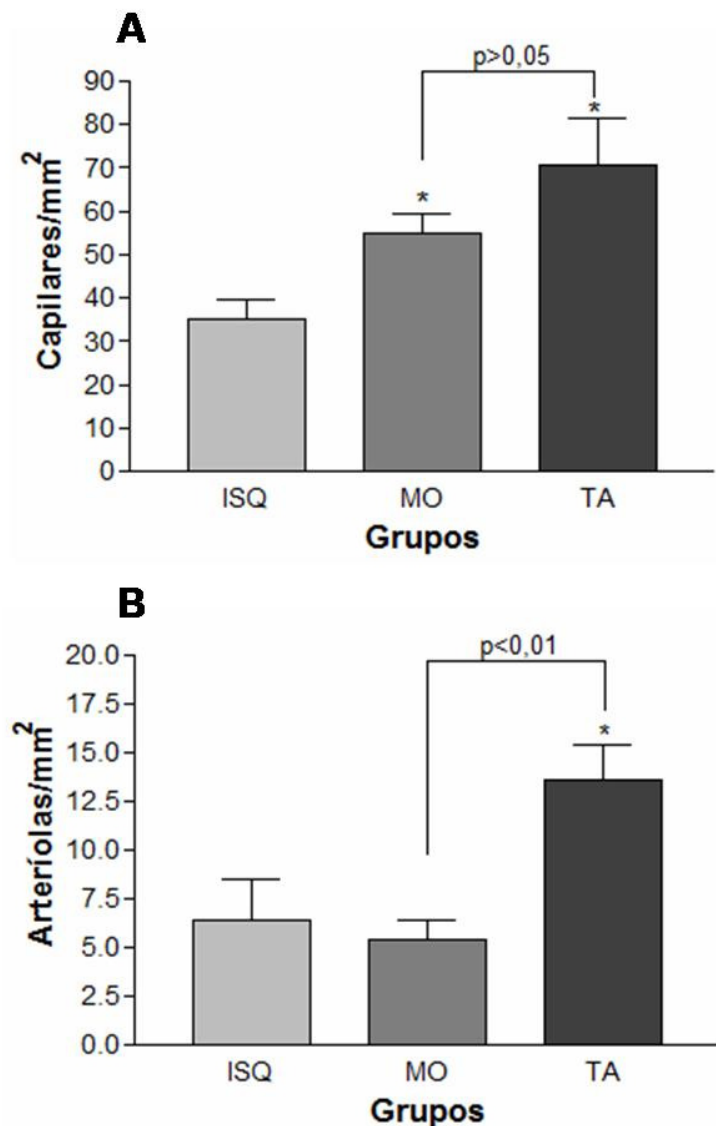


Figura 11. As MSC-TA e MSC-MO são capazes de estimular a angiogênese no músculo isquêmico. Quantificação do número de capilares (A) e arteríolas (B) por área de tecido. Barras de erro representam desvio padrão da média. (n=5) * $p < 0,01$, em relação ao grupo ISQ.

4.3. Efeito do transplante *in vivo* de MSC de TA ou MO.

Após quatro semanas da cirurgia e injeção das células, os membros dos animais foram avaliados macroscopicamente, uma vez que, como consequência da isquemia, o membro necrosa e atrofia, o que se acompanha de autoamputação. Os animais foram classificados segundo a tabela 1 do item 3.5 da metodologia, novamente representada na Fig. 12.

No grupo tratado com as MSC de MO (Grupo MO), 80% dos animais obtiveram classificação 1, enquanto que no grupo tratado com as MSC-TA (Grupo TA), 80% dos animais obtiveram classificação 2 e 3, distribuídos equitativamente entre os dois níveis (Fig. 12). Apenas 10% dos animais do Grupo TA apresentaram classificação máxima 1. Nenhum dos animais do Grupo MO apresentou a classificação mínima 4, que foi observada no Grupo TA, onde 10% dos animais obtiveram esta classificação (Fig. 12).

Já no grupo isquêmico não tratado com células (Grupo Isquêmico - ISQ), 50% dos animais obtiveram classificação 3, enquanto que 30% obtiveram classificação 2 e 20% classificação 1. Nenhum dos animais do Grupo ISQ obteve classificação mínima 4 (Fig. 12).

Curiosamente, os valores obtidos no Grupo TA se assemelharam aos obtidos no Grupo isquêmico não tratado com células. Portanto, as MSC de TA parecem não ter a mesma capacidade que as MSC de MO de proteger o músculo isquêmico da autoamputação, embora fossem capazes de promover, em grau comparável, a angiogênese pós-isquemia (Fig.11).

4.4. Os animais tratados com MSC de MO ou TA apresentaram redução do peso do músculo isquêmico.

A análise do peso dos animais e dos músculos isquêmicos, após quatro semanas, mostrou que, embora o peso dos animais de todos os grupos fosse semelhante, o dos seus músculos isquêmicos variou, notando-se uma diminuição principalmente nos animais que receberam MSC de TA ou de MO (Tab. 3). Nos animais tratados com MSC de TA, o peso do músculo isquêmico era significativamente menor do que o dos animais que não receberam células ou que receberam MSC de MO (Tab. 3).

Escola	
1	Hipofuncional sem necrose
2	Necrose falangeal
3	Necrose acima do tornozelo
4	Atrofia total

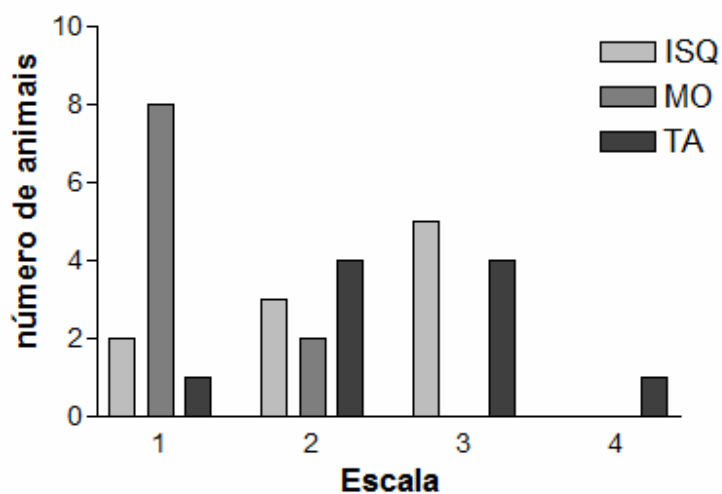


Figura 12. As MSC de TA apresentam menor capacidade de recuperação da atrofia do membro que as MSC de MO. Avaliação visual dos membros isquêmicos dos animais experimentais, quatro semanas após a injeção das células. Grupo isquêmico (ISQ), Grupo MO (MO) e Grupo TA (TA) (n=10).

Tabela 3. Peso dos animais e dos músculos isquêmicos após quatro semanas de isquemia.

Peso	Grupo NÃO-ISQ	Grupo ISQ	Grupo MO	Grupo TA
Total (g)	24,75 ± 2,31	25,29 ± 1,03	23,46 ± 1,65	24,09 ± 0,65
Músculo Isquêmico (mg)	176,29 ± 23,83	100,34 ± 29,37	79,95 ± 24,54	69,90 ± 16,62 *

* Significativamente diferente (p<0,05)

4.5. Após quatro semanas, os animais tratados com MSC de MO ou TA murino possuem função muscular semelhante aos animais isquêmicos não tratados.

A análise funcional do músculo isquêmico mostrou que não houve recuperação da força tensora nos animais tratados com MSC de TA ou de MO (Fig. 13). A redução da tensão foi semelhante à observada no grupo que sofreu isquemia, mas não recebeu tratamento com células.

Para se obter a relação linear entre a força tensora e o peso dos músculos isquêmicos foi realizada a correlação de Pearson. Os valores do coeficiente de correlação (r) obtidos pelos grupos NÃOISQ e MO foram 0,47 e 0,73, respectivamente, indicando uma correlação positiva forte, com valores de r próximo a 1 (Tab. 4). Já os Grupos TA e ISQ apresentaram valores de r iguais a 0,07 e -0,12, respectivamente, indicando uma correlação fraca entre as variáveis. Curiosamente, o Grupo ISQ apresentou valor de r negativo, ou seja, as variáveis apresentam correlação inversa, quando uma aumenta a outra diminui (Tab. 4).

Tabela 4. Correlação entre a força muscular e o peso dos músculos isquêmicos.

	Coeficiente de Pearson (r)
Grupo ISQ	-0.12
Grupo NÃO-ISQ	0.47
Grupo MO	0.73
Grupo TA	0.07

4.6. Presença de células adiposas intramusculares nos músculos isquêmicos dos animais tratados com as MSC de TA ou MO.

A atrofia muscular pós-isquemia frequentemente está associada a degeneração gordurosa, ou infiltração adiposa (revisado em WAGATSUMA, 2007). Com o intuito de verificar se a injeção de MSC modificou o grau de degeneração adiposa, foi realizada análise histopatológica e a relação entre a área de adipócitos maduros e de fibras musculares foi determinada como descrito anteriormente.

A histopatologia do músculo isquêmico mostrou, em todos os grupos experimentais, inúmeros adipócitos maduros, univacuolares, de permeio às fibras

musculares esqueléticas (Fig. 14). Embora os animais do grupo TA tendessem a apresentar uma relação maior entre área ocupada por adipócitos e área muscular esquelética do que os animais do grupo MO, esta diferença não foi significativa (Fig. 15). A presença de tecido adiposo é compatível com a diminuição do peso e da tensão do músculo dos animais que receberam estas células (Tab.3 e Fig. 14).

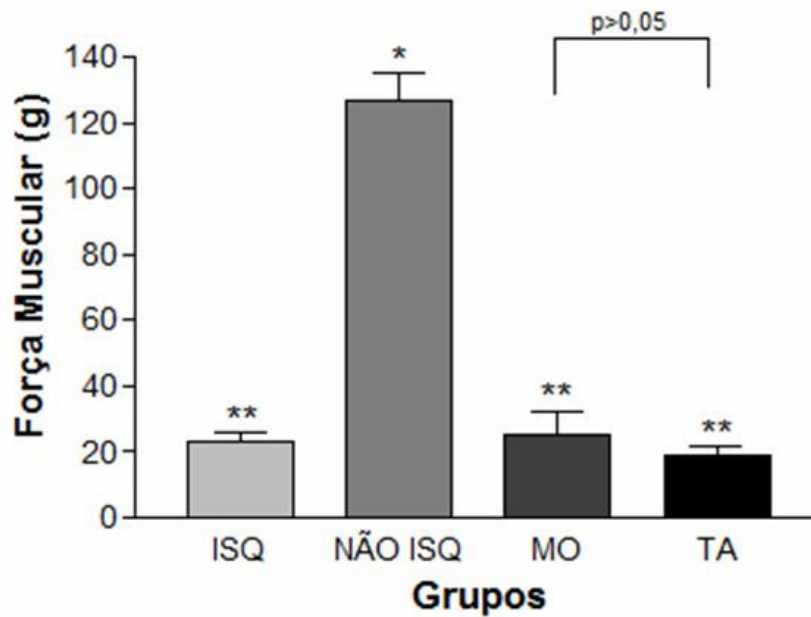


Figura 13. Efeito das MSC de TA e MO na função muscular. Após quatro semanas de isquemia, o músculo gastrocnêmio foi dissecado e a força muscular, em gramas, determinada. Grupo isquêmico (ISQ), Grupo não-isquêmico (NÃOISQ), Grupo MO (MO) e Grupo TA (TA). Barras de erro representam desvio padrão da média. (n=10) * $p < 0,05$, em relação a todos os grupos; ** $p > 0,05$.

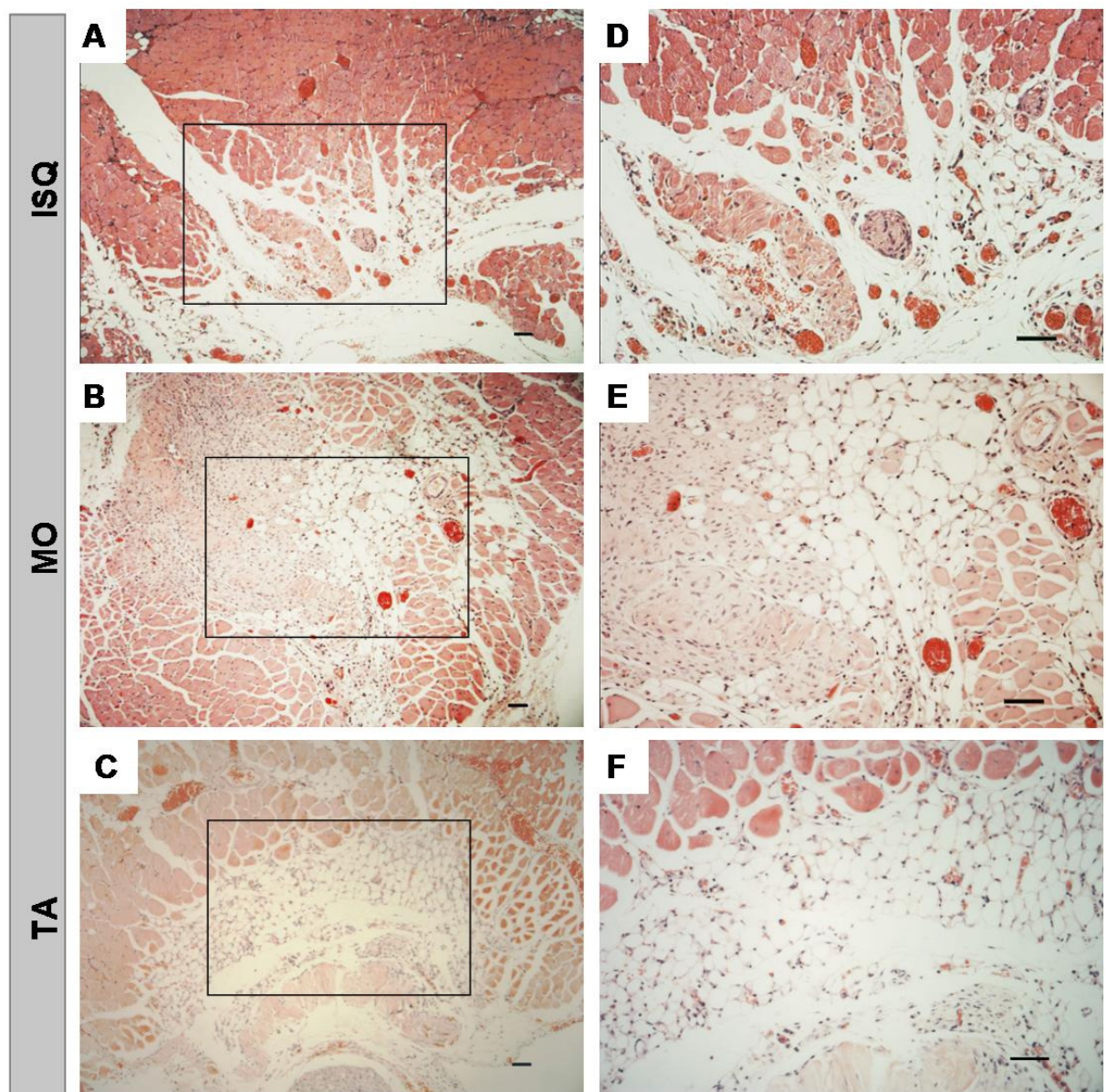


Figura 14. Histopatologia dos músculos isquêmicos dos animais experimentais após quatro semanas da injeção das células. Grupo Isquêmico (ISQ, A), Grupo MO (MO, B) e Grupo TA (TA, C). As imagens à direita (D, E e F) representam a ampliação das áreas demarcadas nas imagens à esquerda (A, B e C, respectivamente). Notar a grande quantidade de adipócitos permeando as fibras musculares nos Grupos MO (B, E) e TA (C, F), e menor quantidade no Grupo ISQ (A, D). Hematoxilina e Eosina. Barra de aumento 50 μ m.

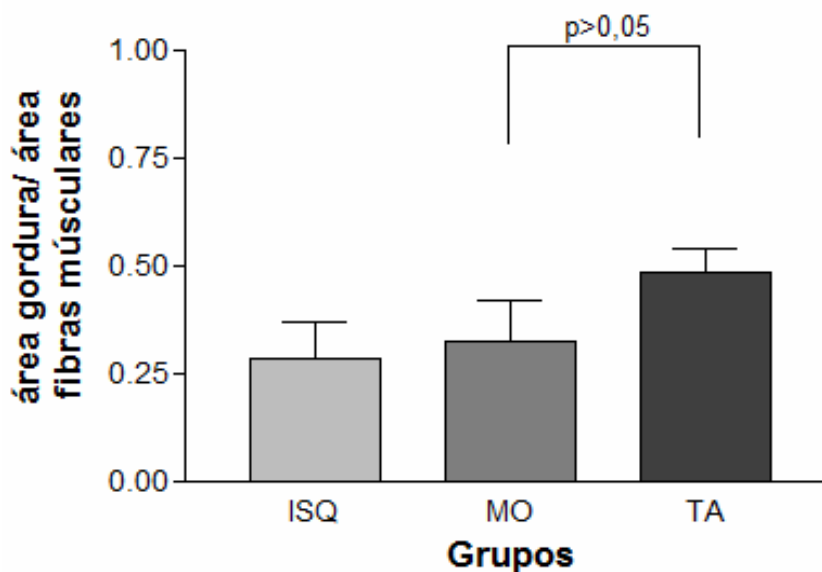


Figura 15. Quantificação da área de tecido adiposo no músculo esquelético após quatro semanas de isquemia. A razão entre a área de adipócitos e a área de fibras musculares em cada grupo experimental é apresentada. Grupo isquêmico (ISQ), Grupo MO (MO) e Grupo TA (TA). Barras de erro representam desvio padrão da média. (n=5)

4.7. Os animais isquêmicos tratados com MSC de TA apresentaram maior número de fibras musculares degeneradas do que os animais tratados com MSC de MO.

A presença de maior número de adipócitos de permeio às fibras musculares esqueléticas nos animais dos grupos TA e MO sugeriu uma incidência maior de necrose ou degeneração das fibras musculares nestes animais. Efetivamente, foi observada a presença de inúmeras fibras musculares degeneradas (Fig. 16). As fibras degeneradas foram quantificadas e os animais separados em categorias, de acordo com a tabela 2 do item 3.9 da metodologia (Fig. 16 e 17). Após quatro semanas de isquemia, enquanto na maioria (60%) dos animais isquêmicos não tratados, o número de fibras musculares degeneradas era elevado (mais de 40 por campo), a maioria dos animais tratados com MSC de MO ou TA (100% e 80%, respectivamente) apresentou pouco ou nenhum sinal de degeneração muscular. Contudo, 20% dos animais que receberam MSC-TA apresentaram se distribuíram nas categorias 2 e 3, ou seja, com mais de 20 fibras degeneradas por campo, fato que não foi observado em nenhum dos animais tratados com MSC-MO (Fig. 17).

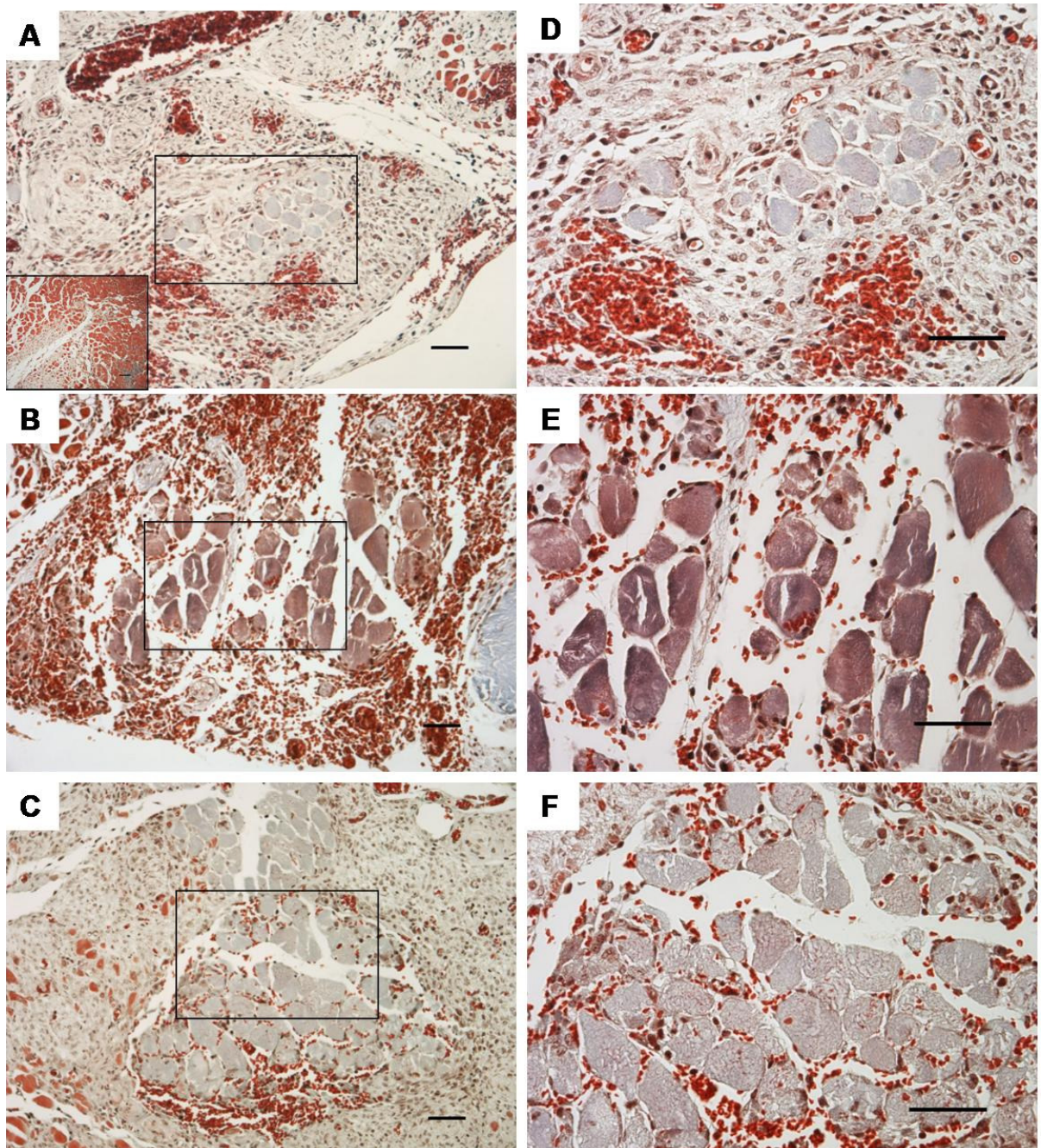


Figura 16. O animais tratados com MSC de TA ou MO apresentam fibras musculares degeneradas. Imagens representativas das quatro diferentes categorias utilizadas na classificação. (A) Categoria 1, inserto demonstrativo da categoria 0, (B) Categoria 2, (C) Categoria 3. As imagens à direita (D, E e F) representam a ampliação das áreas demarcadas nas imagens à esquerda (A, B e C, respectivamente). Tricrômico de Masson. Barra de aumento 50 μ m.

Categoria	
0	Sem fibras degeneradas
1	Menos de 20 fibras degeneradas
2	De 20 a 40 fibras degeneradas
3	Mais de 40 fibras degeneradas

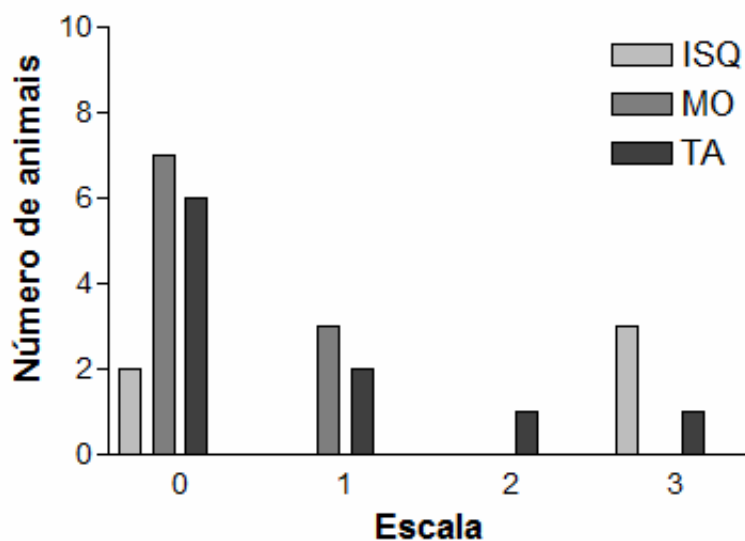


Figura 17. Quantificação das fibras degeneradas presentes do músculo esquelético isquêmico após quatro semanas de isquemia. Os animais experimentais foram classificados segundo o número de fibras degeneradas apresentadas. Grupo isquêmico (ISQ), Grupo MO (MO) e Grupo TA (TA) (Grupo ISQ, n=5; Grupo MO ou TA, n=10).

4.8. As MSC de TA e MO são capazes de promover a regeneração das fibras musculares no membro isquêmico lesado.

Uma vez que a degeneração muscular era observada em menor grau nos animais tratados, levantou-se a hipótese de que, embora não tivesse sido observada uma recuperação marcante da força muscular, as MSC de TA e de MO poderiam estar não só protegendo as fibras de lesão, mas estimulando sua regeneração. De fato, em associação às células adiposas maduras que permeavam as fibras musculares, foram observadas áreas que apresentavam fibras musculares em processo regenerativo (Fig.

18). Nessas zonas de regeneração, as fibras musculares eram menores com núcleo centralizado, características presentes em miofibras nascentes (Fig. 18, setas).

Embora não tenha sido feita uma análise quantitativa, após quatro semanas, as zonas de regeneração eram mais evidentes no músculo dos animais tratados com MSC derivadas da MO (Fig. 18B) ou de TA (Fig. 18C), do que no dos animais isquêmicos que não receberam tratamento com células (Fig. 18A).

4.9. Presença de tecido conjuntivo cicatricial nos animais tratados com as MSC derivadas de TA ou de MO.

Além da ocorrência de adipócitos e fibras musculares necróticas, os animais experimentais também apresentaram tecido conjuntivo cicatricial (Fig. 19). Embora não tenha sido feita uma análise quantitativa, as fibras colágenas eram mais evidentes no músculo dos animais tratados com MSC derivadas da MO (Fig. 19B) ou de TA (Fig. 19C) do que dos animais que não receberam tratamento com células (Fig. 19A).

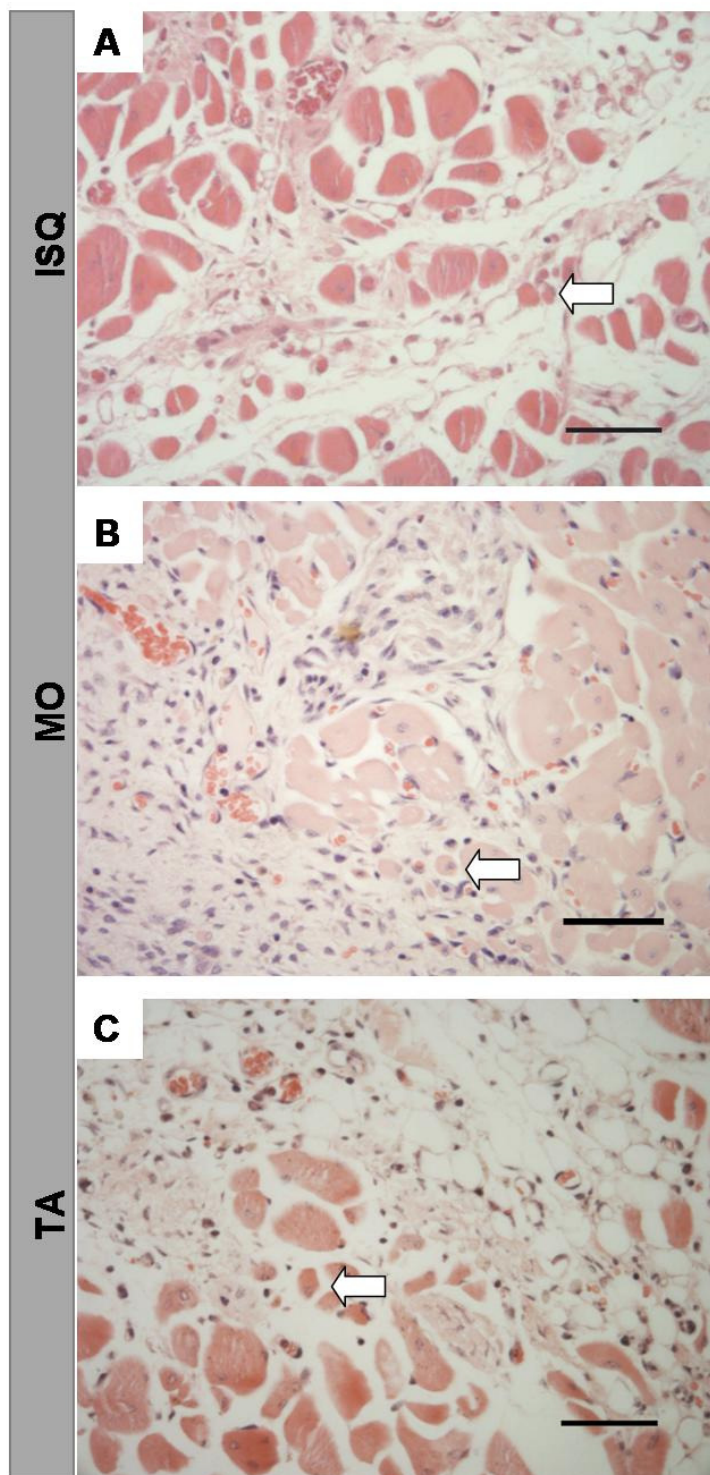


Figura 18. As MSC de TA ou MO são capazes de promover a regeneração de fibras musculares esqueléticas. Grupo Isquêmico (ISQ, A), Grupo MO (MO, B), Grupo TA (TA, C). As setas indicam fibras musculares recém formadas. Notar a grande quantidade deste tipo de fibra nos animais tratados com MSC de MO (B) ou TA (C). Hematoxilina e Eosina. Barra de aumento 50 μ m.

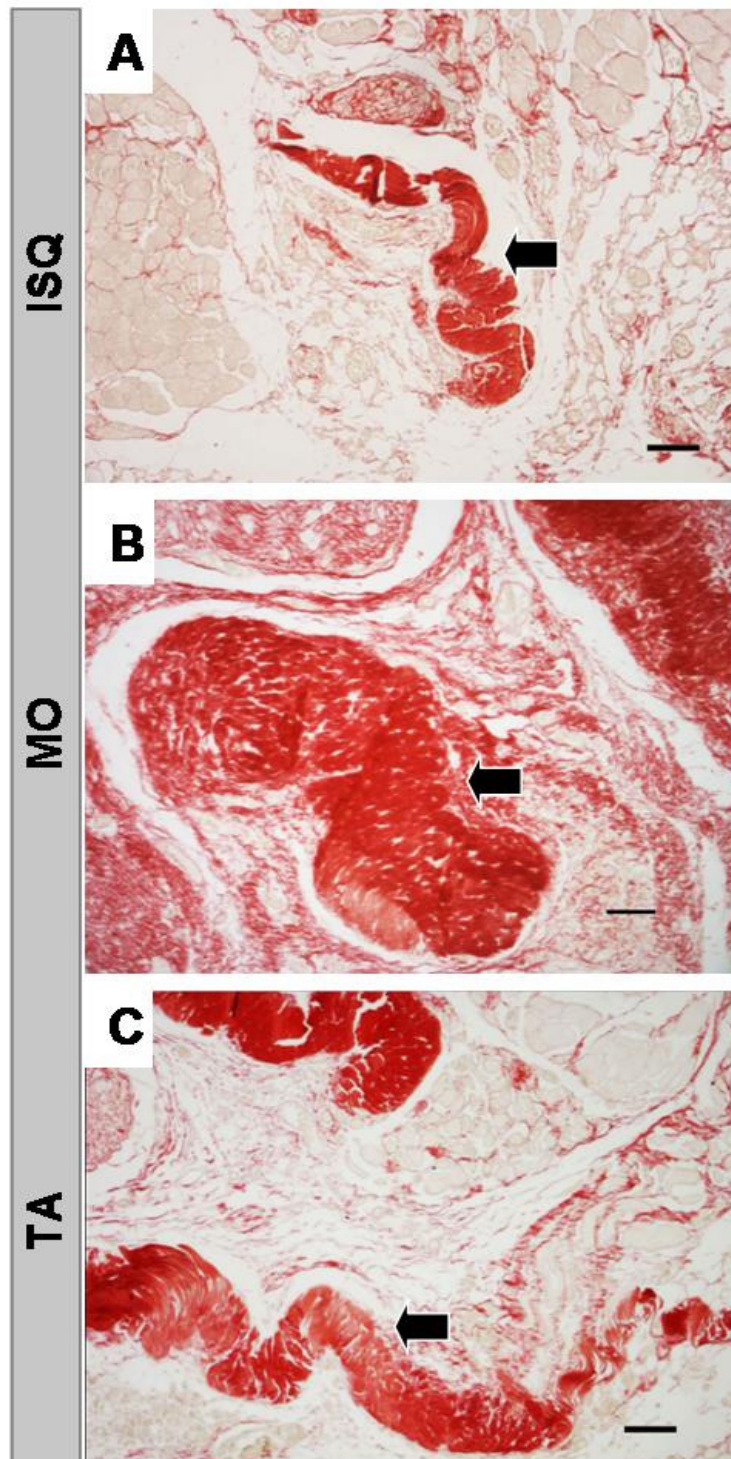


Figura 19. Os animais isquêmicos tratados com MSC de TA ou MO apresentam tecido cicatricial intramuscular. Grupo Isquêmico (A), Grupo MO (B) e Grupo TA (C). Notar a grande quantidade de fibras colágenas densas, evidenciadas pelas setas pretas, presentes entre as fibras musculares dos Grupos MO e TA e, em menor proporção, no Grupo isquêmico não tratado. Vermelho de Picrosirius. Barra de aumento 50 μ m.

5. DISCUSSÃO:

As MSC de MO tem sido, desde a descrição de seu potencial de diferenciação para diversas linhagens mesodérmicas (PITTENGER et al., 1999), amplamente utilizadas em protocolos de terapia celular. Uma vez que nestes protocolos o número de células pode ser um fator de restrição na utilização deste tipo celular, fontes alternativas de MSC foram identificadas, entre elas, as isoladas de TA, que forma apresentadas como potencialmente semelhantes às de MO (ZUK et al., 2001) No entanto, raros estudos compararam diretamente o potencial das MSC de MO e de TA em protocolos de terapia.

O presente estudo analisou a capacidade das MSC-TA de murino de promover a angiogênese no modelo murino de isquemia de membros inferiores, comparando-a às de MO. Os resultados sugerem que ambas as populações são capazes de estimular a angiogênese no tecido lesado. No entanto, diferenças quanto ao potencial de promover a recuperação funcional do músculo isquêmico foram observadas.

O método de isolamento das MSC-TA, assim como da MO, é baseado em sua capacidade de adesão ao plástico e multipotencialidade, ou seja, sua capacidade de diferenciação nas linhagens mesenquimais, incluindo osteoblastos, condrócitos, adipócitos, células endoteliais, entre outros (WAKITANI, SAITO & CAPLAN, 1995; PITTENGER et al., 1999; MINGUELL, ERICES & CONGET, 2001; REYES et al., 2002). Sendo assim, a população mesenquimal obtida do TA subcutâneo murino foi testada quanto ao potencial de diferenciação para duas linhagens mesenquimais: a linhagem osteogênica e adipogênica.

As MSC-TA mostraram serem capazes de se diferenciar para ambas as linhagens (Fig. 9B-C), sendo que a indução para a linhagem adipogênica foi mais pronunciada (Fig. 9C), além de terem sido observados acúmulos lipídicos mesmo nas células que não foram submetidas a nenhum estímulo indutor (Fig. 9A). Uma das explicações para o fato pode ser a variedade de tipos celulares presentes no TA. Uma vez que não há marcadores específicos para as MSC e o método de isolamento é baseado na adesão ao plástico de cultura, leva-se a crer que a população obtida não seja homogênea.

A fração estromal oriunda do TA é constituída de pré-adipócitos (precursores dos adipócitos), células endoteliais, macrófagos e fibroblastos (WELLEN & HOTAMISLIGIL, 2003; CASTEILLA & DANI, 2006). Devido a predisposição a diferenciação adipogênica, supõe-se que a população celular isolada tenha contaminação de pré-adipócitos.

Aliado a isso, a explicação para o potencial de diferenciação observado poderia ser o método de indução utilizado. A indução osteogênica com meio indutor padrão para células humanas, contendo soro fetal bovino, ácido ascórbico, β -glicerofosfato e antibióticos, não foi capaz de induzir diferenciação das MSC-TA murinas para esta via (dados não mostrados e WAN et al., 2006). Apenas com adição de ácido-retinóico e/ou BMP-2 (*Bone Morphogenetic Protein*), a esse meio indutor padrão, é observada diferenciação (WAN et al., 2006). O efeito indutor é potencializado pela adição dos 2 fatores ao mesmo tempo. O ácido-retinóico e o BMP-2 atuam promovendo a expressão de moléculas reguladoras da osteogênese, como Cbfa1/Runx2, osterix, fosfatase alcalina, osteopontina, entre outros (revisado em OKI et al., 2008). Assim, a reduzida indução osteogênica obtida, pode ser devido a utilização de apenas um dos fatores mencionados acima, e não a obtenção de uma população diferente.

As MSC-TA foram então testadas quanto a sua capacidade de promover angiogênese em modelo de isquemia de membros inferiores, comparando-se o seu potencial com o de MSC isoladas da MO. Verificou-se que, embora as MSC de TA fossem capazes de estimular a angiogênese pós-isquemia de forma semelhante as MSC de MO (Fig. 10 e 11A), são capazes também de promover um aumento da densidade de arteríolas no tecido (Fig. 10, setas, e 11B), que não foi observado no grupo tratado com MSC-MO.

Relatos na literatura, apesar de não compararem diretamente MSC-MO e -TA, mostraram que ambas as células têm potencial angiogênico. O grupo de Planat-Benard e colaboradores, em 2004, mostrou, por angiografia, que as MSC-TA são capazes de aumentar a densidade dos vasos no membro isquêmico, porém a quantificação do número de capilares não foi realizada (PLANAT-BENARD et al., 2004). No ano seguinte, Iwase e colaboradores demonstraram que a injeção de MSC de MO promove uma angiogênese mais evidente, com maior densidade de capilares do que a injeção

de células mononucleadas de MO (CMN-MO) (IWASE et al., 2005). Já Sumi e colaboradores, em 2007, mostraram que as MSC-TA e as CMN-MO têm capacidades semelhantes de induzirem neoformação capilar (SUMI et al., 2007). Em 2007, Kim e colaboradores foram os primeiros a analisar a capacidade de revascularização das MSC-TA de forma comparada com as MSC-MO, porém os pesquisadores não quantificaram capilares no tecido isquêmico, mas apenas a taxa de reperfusão, ressaltando-se ainda que o modelo utilizado foi de xenoenxerto de células humanas em animal imunodeficiente (KIM et al., 2007).

Assim, o presente trabalho é inovador na medida que analisa comparativamente a capacidade das MSC de MO e de TA murinas de induzir neocapilares. Além disso, foi quantificada, neste estudo, a densidade de arteríolas no tecido isquêmico tratado com as diferentes populações celulares. Como falado anteriormente, as MSC-TA promoveram um aumento significativo ($p < 0,01$; Fig. 11B) do número de arteríolas, sugerindo que estas células, ao contrário das MSC-MO, são capazes de promover vasculogênese, com estímulos e moléculas reguladoras próprias (VAN WEEL et al., 2008).

Curiosamente, apesar de promoverem uma angiogênese comparável a induzida pelas MSC-MO, estas resgataram 80% dos animais da autoamputação, enquanto que apenas 10% dos animais tratados com as MSC-TA tiveram seus membros recuperados. Deve ser ressaltado que nenhum dos animais tratados com as MSC-MO apresentou atrofia total do membro, enquanto que 10% dos animais tratados com MSC-TA a apresentaram (Fig. 12).

Atrofia e autoamputação do membro isquêmico foram somente relatadas por Iwase e colaboradores, utilizando modelo experimental em ratos. Os autores observaram que, enquanto somente 20% dos animais isquêmicos tratados, com células mononucleadas obtidas de MO apresentavam necrose e autoamputação do membro lesado, este percentual era de 10% naqueles tratados com MSC de MO (IWASE et al., 2005), um valor muito semelhante ao obtido em nosso estudo. No entanto, não existem relatos sobre a ocorrência deste fenômeno em animais tratados com MSC-TA. Além disto, uma classificação segundo o grau de atrofia e necrose não foi relatada

anteriormente, sendo este o primeiro estudo comparando o efeito *in vivo* de MSC de TA e MO murinas no grau de recuperação do membro isquêmico.

O passo seguinte foi observar se o tratamento com MSC de TA ou de MO era capaz restabelecer a função muscular. Para tal, foi utilizada a metodologia de medição da força muscular. Os animais tratados com as MSC de MO ou TA não foram capazes de recuperar a capacidade contrátil do músculo isquêmico, atingindo níveis semelhantes aos observados nos animais isquêmicos não-tratados com células (Fig. 13). Este tipo de investigação não foi relatada na literatura, que considera apenas o restabelecimento do fluxo sanguíneo do membro isquêmico (IWASE et al., 2005; MOON et al., 2006; KIM et al., 2007). Deve ser ressaltado que em nosso modelo não foi feita uma avaliação da reperfusão do músculo isquêmico, assim é possível que o estímulo angiogênico induzido pelas MSC não tenha sido suficiente para promover uma circulação funcional e reperfusão muscular. Por outro lado, como não há comparação, na literatura, entre reperfusão e contração muscular, também pode-se questionar que o restabelecimento do fluxo sanguíneo não necessariamente se acompanha de recuperação da capacidade contrátil do músculo, o que deve ser investigado.

Outro fator que pode ter influenciado na ausência de restabelecimento da função muscular após a isquemia, é o tipo de fibra muscular regenerado. Em vertebrados, o músculo esquelético é formado por dois tipos de fibras musculares: as de contração lenta e de contração rápida (STOCKDALE, 1997), que diferem entre si pelo tipo de miosina e os mecanismos de suprimento de energia (MATSUOKA & INOUE, 2008). Pouco se sabe a respeito dos mecanismos que influenciam a determinação do subtipo de fibra formado durante o desenvolvimento ou a regeneração, porém Matsuoka e Inoue (2008) mostraram que fatores do microambiente possuem papel importante. Assim, o tratamento com as MSC de TA ou MO pode, através da secreção de fatores, proporcionar o microambiente favorável à regeneração de apenas um subtipo de fibra muscular, que pode não ser analisado no teste de determinação da força muscular utilizado.

Outro aspecto observado nesse trabalho foi o peso dos animais e seus músculos isquêmicos, relacionando-os com a força muscular mensurada. Os grupos injetados com MSC-MO ou MSC-TA apresentaram menor peso dos músculos isquêmicos, por

vezes inferiores aos observados pelo grupo isquêmico não-tratado com células, enquanto o peso total do animal se mantinha constante (Tab. 3). Em seguida, para se obter uma relação linear entre as variáveis peso e força muscular do músculo isquêmico foi realizado o teste de correlação de Pearson. Os valores de r dos grupos NÃO-ISQ e MO foram próximos a um (0,47 e 0,73, respectivamente) indicando uma correlação positiva entre eles. Já para os grupos ISQ e TA, os valores de r obtidos foram próximos a zero (-0,12 e 0,07, respectivamente), indicando uma fraca correlação entre as variáveis nesses grupos (Tab 4).

Isto sugere que a variação do peso e da força muscular dos animais tratados com as MSC-MO se comporta de maneira semelhante nos animais que não sofreram isquemia, o que não é observado nos animais tratados com as MSC-TA (Tab 4). Logo, nos músculos dos animais tratados com MSC-MO, da mesma maneira que nos animais não-isquêmicos, o aumento do peso do músculo é acompanhado do aumento da força muscular. O mesmo é observado nos animais tratados com MSC-TA, porém em uma intensidade menor (Tab. 4).

A redução do peso do músculo nos animais tratados com células foi investigada com maior atenção e, para tanto, foram realizadas análises histológicas dos tecidos musculares. Foi observada grande quantidade de adipócitos permeando as fibras musculares (Fig. 14), principalmente nos animais injetados com ambas as células, o que está de acordo com a diminuição do peso do músculo isquêmico destes animais. A área de adipócitos intramusculares por área de fibra muscular foi quantificada (Fig. 15) e verificou-se que os valores eram muito semelhantes para os animais injetados com MSC-TA ou -MO, embora o grupo injetado com MSC-TA apresentasse valores tendenciosamente maiores (Fig. 15).

Apesar de já descrito na literatura a ocorrência de infiltração gordurosa no tecido muscular pós-lesão (revisado em WAGATSUMA, 2007), nenhum dos grupos relatou o aparecimento de adipócitos. Tanto Moon et al. (2006) quanto Kim et al. (2007) não observaram a presença de adipócitos intramusculares pós isquemia e injeção de MSC de MO ou de TA, mas deve ser ressaltado que em ambos os trabalhos foram utilizadas células derivadas de tecidos humanos.

Os resultados descritos na literatura contradizem os obtidos no presente trabalho, provavelmente devido a dois fatores principais que podem estar interligados: a origem da célula utilizada e os fatores do microambiente aos quais as células estão submetidas. O tipo celular utilizado neste trabalho foi de origem murina, enquanto que nos trabalhos descritos anteriormente as células são de origem humana, o que poderia ocasionar respostas diferentes. Os fatores microambientais, por sua vez, podem ter contribuído para essas diferenças uma vez que, em 2007, Wagatsuma demonstrou que o potencial adipogênico poderia ser ativado durante a regeneração muscular, com pico de formação de células adiposas entre os dias 3 e 5 pós-criolesão (WAGATSUMA, 2007). Foi observado, após a lesão, um aumento de leptina, indutora da adipogênese, e dos fatores de transcrição PPAR γ 1 e 2 (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma* 1 e 2), este último sabidamente envolvido na diferenciação de adipócitos (WAGATSUMA, 2007).

Desta maneira, a despeito do fato de neste trabalho a lesão ter sido provocada por baixa temperatura e não isquemia, como em nosso modelo, pode-se especular que o mesmo fenômeno, ou seja, de aumento de estímulos adipogênicos estaria presente no tecido isquêmico, modulando, inclusive, as células injetadas. Porém, em trabalho muito elegante foi recentemente demonstrado que fatores espécie específicos podem alterar o comportamento de células humanas injetadas em animais imunodeficientes (MUGURUMA et al., 2006). Neste caso, os pesquisadores verificaram que as MSC de MO humanas injetadas na cavidade medular de camundongos imunodeficientes produziam manutenção da população de progenitores hematopoéticos humanos, injetados por via endovenosa, de forma mais eficiente. Portanto, é possível que fatores adipogênicos espécie específicos, liberados no tecido lesado, não sejam capazes de atuar em células humanas, o que explicaria a ausência de adipócitos observada no modelo de xenoinxerto (MOON et al., 2006; KIM et al., 2007).

A ausência de recuperação da força muscular nos levou a investigar o grau de degeneração das fibras musculares (Fig. 16 e 17). Verificou-se que embora o tratamento pós-isquemia com MSC fosse capaz de proteger maior número de fibras do processo degenerativo, diferenças entre o potencial das MSC de MO e de TA foram observadas. Todos os animais tratados com MSC de MO apresentaram menos do 20

fibras degeneradas por campo, enquanto somente 80% dos animais tratados com MSC de TA apresentaram o mesmo. Mais importante, alguns dos animais tratados com MSC-TA mostraram o mesmo grau de degeneração muscular que os animais controles isquêmicos, que não receberam qualquer tratamento. Estes resultados se correlacionam com a observação macroscópica de grau de necrose do membro (Fig. 12), mas estão em desacordo com a literatura.

Apesar de não ter sido observada recuperação funcional do músculo nos animais tratados com as MSC, a ocorrência de regeneração muscular foi investigada. Após quatro semanas de isquemia, em todos os grupos o músculo lesado apresentou evidências de fibras em regeneração, ou seja, fibras menores com núcleo centralizado (Fig. 18, setas), contudo os animais tratados com MSC de TA ou MO pareciam apresentar maior número destas fibras, porém não foi realizada quantificação (Fig. 18B e C).

A observação de que MSC de MO ou TA são capazes de promover a regeneração de fibras musculares lesadas já foi demonstrado na literatura. Moon e colaboradores (2006) descrevem a presença de fibras musculares em regeneração, catorze dias após o tratamento com as células (MOON et al., 2006). Kim e colaboradores (2007), por sua vez, descrevem o restabelecimento da estrutura muscular normal, com uma significativa preponderância das MSC-TA sobre as MSC-MO, porém não mencionam a ocorrência de miofibras nascentes (KIM et al., 2007).

Em seguida, foi realizada a coloração de Vermelho de Picrosirius, para investigar se há tecido conjuntivo cicatricial, evidenciado em vermelho. Como resultado, foi observada grande quantidade de tecido fibroso nos animais tratados tanto com as MSC-TA quanto de MO (Fig 19B e C, setas), número inferior, porém presente, de tecido fibroso também é observado nos animais isquêmicos não-tratados com células (Fig 19A, seta). Não foi realizada quantificação para área de fibrose.

Apenas Kim e colaboradores observaram a área de tecido lesionado, que compreende a área de tecido fibroso, demonstrando que há menor área lesada nos animais tratados com as MSC-TA que nos animais tratados com MSC-MO, ambas de origem humana (KIM et al., 2007).

Os nossos resultados divergem dos descritos na literatura, uma vez que mostram que há mais áreas de fibrose nos animais tratados com ambas as MSC do que nos animais não tratados com células. Da mesma maneira que a degeneração muscular, a explicação pode ser devido a origem das células injetadas, uma vez que, Kim e colaboradores utilizaram células humanas, podendo ocasionar resposta diferente da das células murinas.

Há bastante controvérsia a respeito de qual seria o papel das MSC na regeneração muscular. Alguns autores crêem na capacidade das MSC-TA de participarem diretamente na revascularização, se diferenciando em células endoteliais, o que foi demonstrado, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, por Planat-Benard e colaboradores (PLANAT-BENARD et al., 2004). No cultivo em Matrigel, conhecidamente responsável por favorecer o potencial endotelial, as MSC-TA formaram estruturas ramificadas semelhantes a tubos, sendo sua maioria positiva para os marcadores endoteliais CD31 e fator de Von Willebrand (vWF, Von Willebrand Factor) (PLANAT-BENARD et al., 2004). Já *in vivo*, uma pequena proporção dessas células, em torno de 1%, se diferencia em endotélio no modelo de isquemia de membros (MOON et al., 2006). Em 2007, Kim e colaboradores mostraram que as MSC-TA possuem maior capacidade de formação de estruturas tubulares em Matrigel do que as MSC-MO, porém uma comparação *in vivo* não foi realizada (KIM et al., 2007).

Em 2006, Da Silva-Meirelles e colaboradores, propuseram um modelo para o papel das MSC na manutenção do tecido. Neste modelo, as MSC residentes na membrana basal oposta às células endoteliais, sob a atuação de fatores microambientais progridem do fenótipo de células indiferenciadas para o de progenitores e células maduras. Já no momento da lesão tecidual, as MSC indiferenciadas são mobilizadas diretamente, sem que haja transição para a forma de progenitor (DA SILVA-MEIRELLES, CHAGASTELLES & NARDI, 2006).

Em 2005, Silva e colaboradores observaram que as MSC-MO injetadas co-localizavam com células endoteliais e musculares lisas, mas não com miofibras, em modelo de isquemia cardíaca (SILVA et al., 2005). Posteriormente, no mesmo ano e usando o mesmo modelo experimental, Matsumoto e colaboradores observaram que as MSC-MO co-localizavam com células musculares lisas e também com

cardiomiócitos (MATSUMOTO et al., 2005). Não há relatos da transdiferenciação de MSCs em fibras musculares em modelos de isquemia de membros inferiores. Ambos os grupos, além de Iwase e colaboradores e Nakagami e colaboradores, mostraram positividade das MSC injetadas para o marcador de células musculares lisas α -SMC, responsáveis por estabilizar vasos neoformados, atuando como células murais (IWASE et al., 2005; MATSUMOTO et al., 2005; NAKAGAMI et al., 2005; SILVA et al., 2005).

Apesar de algumas evidências da participação direta das MSC na formação de endotélio, células musculares lisas ou até mesmo fibras musculares, alguns autores sugeriram que as MSCs poderiam atuar na secreção de fatores pró-angiogênicos que atuariam nas células progenitoras do tecido muscular promovendo a formação de novas fibras. Rehman e colaboradores (2004) demonstraram que as MSC-TA produzem fatores pró-angiogênicos que, quando em contato com células endoteliais promovem o seu crescimento (REHMAN et al., 2004; NAKAGAMI et al., 2005). A atividade pró-angiogênica dessas células foi reafirmada em 2007, por Kim e colaboradores, onde se observou formação de estruturas tubulares pelas MSC-TA quando submetidas ao cultivo com meio condicionado das MSC-TA, o mesmo não sendo observado quando as células são cultivadas com o meio condicionado das MSC-MO (KIM et al., 2007).

Os resultados conflitantes deste estudo levantam algumas questões relacionadas à identidade e origem da própria célula (humana versus murina), quanto ao mecanismo de reparo. Os trabalhos citados utilizaram o modelo de xenoenxerto, onde células humanas foram injetadas em animais imunodeficientes. Deve ser ressaltado que embora estes animais apresentem deficiência na resposta imune adaptativa, a resposta imune inata se mantém (FOGH & GIOVANELA, 1982), o que significa que são capazes de desenvolver uma resposta inflamatória. Embora o papel imunomodulador das MSC seja conhecido (revisado em LE BLANC & RINGÉN, 2007), este se refere a ativação da imunidade adaptativa e não da imunidade inata.

Curiosamente, embora raramente relatado, as MSC parecem induzir uma resposta alogênica (BADILLO et al., 2007; PONCELET et al., 2007), possivelmente relacionada a forma e local de infusão das células, e alguns trabalhos (XIA et al., 2004 e 2006) e (dados não mostrados) sugerem que o xenotransplante pode suscitar uma

resposta imune inata. Células mesenquimais de medula óssea humana injetadas, com ou sem biomaterial inerte, em camundongos imunocomprometidos, NOD/SCID ou CB17 scid/beige, induziram uma reação inflamatória, que se caracterizou por infiltração de granulócitos e macrófagos, com formação de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho, levando a eliminação das células humanas após quatro semanas (XIA et al., 2004 e 2006).

A ocorrência de inflamação, com infiltração de macrófagos é um dado importante, pois o processo regenerativo tecidual pode ser favorecido por um ambiente inflamatório, com infiltração de monócitos e macrófagos (FERRARI, 2005; KITCHEN & BAZIN, 1998). Além disto, em 2007, Arnold e colaboradores mostraram o papel direto das células inflamatórias no reparo de tecidos, sendo que os monócitos inflamatórios recrutados após a isquemia, originaram macrófagos que sustentaram a miogênese (ARNOLD et al., 2007). O papel destas células na formação, por fusão celular, de miofibras novas foi documentado (CARMARGO et al., 2003; VIEYRA, JACKSON & GOODELL, 2005). Resultados preliminares do grupo reforçam a hipótese de associação entre a presença de células provenientes do sangue e a regeneração muscular, pois o tratamento dos animais, neste modelo, com células mononucleares de MO proporcionou melhora da força muscular do membro isquêmico (OCKE, 2009, comunicação pessoal).

6. CONCLUSÕES:

De acordo com os dados descritos neste trabalho, podemos concluir que:

- A população celular isolada do tecido adiposo subcutâneo murino contém células com potencial de diferenciação adipogênico e osteogênico, preenchendo um dos requisitos necessários para classificação como célula-tronco mesenquimal.
- As MSC-TA, assim como as MSC-MO, promovem estímulo angiogênico pós-isquemia, apresentando maior potencial de estímulo da arteriogênese, que não se acompanhou de recuperação da capacidade contrátil do músculo.
- As MSC-TA possuem capacidade inferior as MSC-MO de proteger o membro isquêmico da necrose e autoamputação no modelo de isquemia de membros posteriores;
- As MSC de TA e de MO promoveram acúmulo de adipócitos intramusculares após isquemia, embora, paradoxalmente também tenham estimulado a regeneração de fibras musculares no tecido lesado, o que não se correlacionou com a recuperação funcional

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Os resultados obtidos neste estudo estão em desacordo com a literatura. No entanto, na grande maioria dos estudos foi utilizado o modelo de xenoenxerto, onde células derivadas de medula óssea ou tecido adiposo humanos foram injetadas, após a lesão isquêmica, em camundongos imunocomprometidos. Isto levanta algumas questões relacionadas com as propriedades das células murinas versus as humanas. Alternativamente, pode-se supor que fatores espécie específicos, produzidos no microambiente após a lesão isquêmica, modulariam diferencialmente o comportamento biológico de células de diferentes espécies. Além disso, dados preliminares do próprio grupo (não mostrados e OCKE, 2009, comunicação pessoal) sugerem que os efeitos observados nos modelos de xenoenxerto poderiam estar relacionados a presença de células inflamatórias induzida pela resposta imune inata do animal experimental. Os dados atuais não são suficientes para responder a essas questões.

8. REFERÊNCIAS:

Al-Khaldi A, Al-Sabti H, Galipeau J, Lachapelle K. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann Thorac Surg.* 2004; 75:204-9.

Allbrook D, Baker Wde C, Kirkaldy-Willis WH. Muscle regeneration in experimental animals and in man. The cycle of tissue change that follows trauma in the injured limb syndrome. *J Bone Joint Surg Br.* 1966; 48:153-69.

Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/Pericytes Interactions. *Circ Res* 2005;97:512-23.

Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med.* 2007; 204:1057-69.

Arsic N, Zacchigna S, Zentilin L, Ramirez-Correa G, Pattarini L, Salvi A, Sinagra G, Giacca M. Vascular endothelial growth factor stimulates skeletal muscle regeneration in vivo. *Mol Ther .* 2004;10:844– 54.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science.* 1997; 275:964-7.

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.*1999; 85:221–8.

Auchincloss H Jr, Sachs DH. Xenogeneic transplantation. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:433-70.

Badillo AT, Beggs KJ, Javazon EH, Tebbets JC, Flake AW. Murine bone marrow stromal progenitor cells elicit an in vivo cellular and humoral alloimmune response. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007; 13:412-22.

Baptista LS, Pedrosa CSG, Silva KR, Otazú IB, Takiya CM, Dutra HS, Cláudio-da-Silva C, Borojevic R, Rossi MID. Bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: How close are they? *J Stem Cells.* 2007; 2:73-90.

Bandow K, Ohnishi T, Tamura M, Semba I, Daikuhara Y. Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates migration of muscle precursors in developing mouse tongue. *J Cell Physiol.* 2004; 201:236–43.

Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist*. 2002; 7:2-8.

Battegay EJ, Rupp J, Iruela-Arispe L, Sage EH, Pech M. PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis *in vitro* via PDGF beta-receptors. *J Cell Biol*. 1994; 125:917-28.

Bianco P, Robey PG. Marrow stromal cells. *J Clin Invest*. 2000; 105:1663-8.

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001; 19:180-92.

Bintliff S, Walker BE. Radioautographic study of skeletal muscle regeneration. *Am J Anat*. 1960; 106: 233.

Bjarnegård M, Enge M, Norlin J, Gustafsdottir S, Fredriksson S, Abramsson A, Takemoto M, Gustafsson E, Fässler R, Betsholtz C. Development. Endothelium-specific ablation of PDGF-B leads to pericyte loss and glomerular, cardiac and placental abnormalities. 2004; 131:1847-57.

Bossolasco P, Corti S, Strazzer S, Borsotti C, Del Bo R, Fortunato F, Salani S, Quirici N, Bertolini F, Gobbi A, Delilieri GL, Pietro Comi G, Soligo D. Skeletal muscle differentiation potential of human adult bone marrow cells. *Exp Cell Res*. 2004; 295:66–78.

Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res*. 1998; 83:1059- 66.

Buetow SA, Coster GD. Platelet-derived growth factor B-chain of hematopoietic origin is not necessary for granulation tissue formation and its absence enhances vascularization. *Plast Reconstr Surg*. 2001; 45:181-5.

Buschmann IR, Hoefler IE, van Royen N, Katzer E, Braun-Dulleaus R, Heil M, Kostin S, Bode C, Schaper W. GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis*. 2001; 159:343–56.

Camargo FD, Green R, Capetenaki Y, Jackson KA, Goodell MA. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat Med*. 2003; 9:1520–7.

Camillo AC, Rocha Rde C, Chopard RP. Structural and microvascular study of soleus muscle of Wistar rats after section of the sciatic nerve. *Arq Neuropsiquiatr*. 2004;62:835-8.

- Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Qin, Zhao RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 332:370–9.
- Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell.* 2008; 3:229-30.
- Caplice NM, Doyle B. Vascular progenitor cells: origin and mechanisms of mobilization, differentiation, integration, and vasculogenesis. *Stem Cells Dev.* 2005; 14:122–39.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000; 6:389-95.
- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003; 9:653-60.
- Carmeliet P. Manipulating angiogenesis in medicine. *J Int Med.* 2004; 255:538-61.
- Casteilla L, Planat-Bénard V, Cousin B, Silvestre JS, Laharrague P, Charrière G, Carrière A, Pénicaud L. Plasticity of adipose tissue: a promising therapeutic avenue in the treatment of cardiovascular and blood diseases? *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2005; 98:922-6.
- Casteilla L, Dani C. Adipose tissue-derived cells : from physiology to regenerative medicine. *Diabetes Metab.* 2006; 32:393-401.
- Castellot JJ Jr. Heparan sulfates: physiologic regulators of smooth muscle cell proliferation? *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990; 2:11-2.
- Chan-Ling T, Page MP, Gardiner T, Baxter L, Rosinova E, Hughes S. Desmin ensheathment ratio as an indicator of vessel stability: evidence in normal development and in retinopathy of prematurity. *Am J Pathol.* 2004; 165:1301-13.
- Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004; 84:209–38.
- Conboy IM, Rando TA. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell.* 2002; 3:397–409.
- Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest.* 1989; 84:1470-8.
- Cornelison DD, Wold BJ. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol.* 1997; 191:270–83.
- Cornelison DD, Filla MS, Stanley HM, Rapraeger AC, Olwin BB. Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration. *Dev Biol.* 2001; 239:79–94.

Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008; 3:229-30.

Da Silva-Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006; 119:2204-13.

Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008; 26:2287-99.

Deindl E, Buschmann I, Hofer IE, Podzuweit T, Boengler K, Vogel S, van Royen N, Fernandez B, Schaper W. Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ Res*. 2001; 89:779-86.

Deindl E, Hofer IE, Fernandez B, Barancik M, Heil M, Strniskova M, Schaper W. Involvement of the fibroblast growth factor system in adaptive and chemokine-induced arteriogenesis. *Circ Res*. 2003; 92:561–8.

Dhawan J, Rando TA. Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol*. *Trends Cell Biol*. 2005; 15:666-73.

Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett*. 2000; 477:258-62.

Distler JW, Hirth A, Kurowska-stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med*. 2003; 47:149-61.

Dobson DE, Kambe A, Block E. 1- Butyryl-glycerol: a novel angiogenesis factor secreted by differentiating adipocytes. *Cell*. 1990; 61:223-30.

Dolber PC, Spach MS. Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart.. *J Histochem Cytochem*. 1993;41:465-9.

Dore-Duffy P, Katychev A, Wang X, Van Buren E. CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006; 26:613-24.

Doyonnas R, LaBarge MA, Sacco A, Charlton C, Blau HM. Hematopoietic contribution to skeletal muscle regeneration by myelomonocytic precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 2004; 101:13507–12.

- Edelberg JM, Aird WC, Wu W, Rayburn H, Mamuya WS, Mercola M, Rosenberg RD. PDGF mediates cardiac microvascular communication. *J Clin Invest.* 1998; 102:837-43.
- Eguchi M, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Clin Exp Nephrol.* 2007; 11:18–25.
- Ehrhardt J, Morgan J. Regenerative capacity of skeletal muscle. *Current Opinion in Neurology.* 2005; 18:548–53.
- Elsheikh B, Uzunel M, He Z, holgersson J, Nowak G, Sumitran-Holgersson S. Only a specific subset of human peripheral-blood monocytes has endothelial-like functional capacity. *Blood.* 2005; 106:2647-55.
- Ema M, Faloon P, Zhang WJ, Hirashima M, Reid T, Stanford WL, Orkin S, Choi K, Rossant J. Combinatorial effects of Flk1 and Tal1 on vascular and hematopoietic development in the mouse. *Genes Dev.* 2003; 17:380–93.
- Enge M, Wilhelmsson U, Abramsson A, Stakeberg J, Kühn R, Betsholtz C, Pekny M. Neuron-specific ablation of PDGF-B is compatible with normal central nervous system development and astroglial response to injury. *Neurochem Res.* 2003; 28:271-9.
- Engelmann MG, Theiss HD, Hennig-Theiss C, Huber A, Wintersperger BJ, Werle-Ruedinger AE, Schoenberg SO, Steinbeck G, Franz WM. Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization: final results from the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48:1712–21.
- Fadini GP, Agostini C, Avogaro A. Characterization of endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 336:1-2.
- Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int.* 1999; 56:794–814.
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998; 279:1528–30
- Ferrari RJ. Processo de Regeneração na Lesão Muscular: uma revisão. *Phys Ther Mov.* 2005; 18:63-71.
- Scheel KW, Fitzgerald EM, Martin RO, Larsen RA. The possible role of mechanical stresses on coronary collateral development during gradual coronary occlusion, in Schaper W (eds.): *The Pathophysiology of Myocardial Perfusion.* Amsterdam: Elsevier/North- Holland; 1979:489–518.

Flamme I, Frolich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol.* 1997; 73: 206–10.

Fogh J, Giovanella BC. *The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research (Vol.2)*. London: Academic Press, 1982.

Fukada S, Miyagoe-Suzuki Y, Tsukihara H, Yuasa K, Higuchi S, Ono S, Tsujikawa K, Takeda S, Yamamoto H. Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice. *J Cell Sci.* 2002; 115:1285–93.

Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic *in vivo* distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *CellsTissues Organs.* 2001; 169:12–20.

Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science.* 2003; 300:1155-9.

Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalsky J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med.* 1999; 5:623-8.

Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericytes interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 2003; 314:15-23.

Gordon KJ, Blobel GC. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys.* 2008; 1782:197–228.

Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature.* 1999; 401:390–4.

Hahn P, Novak M. Development of brown and white adipose tissue. *J Lipid Res.* 1975; 16:79-91.

Hattori K, Dias S, Heissig B, Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tateno M, Hicklin DJ, Zhu Z, Witte L, Crystal RG, Moore MA, Rafii S. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2001; 193:1005-14.

Hausman GJ, Richardson RL. Adipose tissue angiogenesis. *J Anim Sci.* 2004; 82:925-34.

Hayashi S, Aso H, Watanabe K, Nara H, Rose MT, Ohwada S, Yamaguchi T. Sequence of IGF-I, IGF-II, and HGF expression in regenerating skeletal muscle. *Histochem Cell Biol.* 2004; 122:427-34.

Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Development. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. 1999; 126:3047-55.

Hershey JC, Baskin EP, Glass JD, Hartman HA, Gilberto DB, Rogers IT, Cook JJ. Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between capillary sprouting and arteriogenesis. *Cardiovasc Res.* 2001; 49:618-25.

Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood.* 2003; 102:3483-93.

Hidaka M, Stanford WL, Bernstein A. Conditional requirement for the Flk-1 receptor in the in vitro generation of early hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96:7370-5.

Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res.* 1996; 32:687-98.

Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem.* 1992; 267:26031-7.

Hughes S, Chan-Ling T. Characterization of smooth muscle cell and pericyte differentiation in the rat retina in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45:2795-806.

Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, Hsu SC, Prockop DJ. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells.* 2007; 25:2363-70.

Iba O, Matsubara H, Nozawa Y, Fujiyama S, Amano K, Mori Y, Kojima H, Iwasaka T. Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation.* 2002; 106:2019-25.

Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood.* 2004; 104:2752-60.

Irvin TT. Wound healing. *Arch Emerg Med.* 1985; 2:3-10.

- Israeli D, Benchaouir R, Ziaei S, Rameau P, Gruszczynski C, Peltekian E, Danos O, Garcia L. FGF6 mediated expansion of a resident subset of cells with SP phenotype in the C2C12 myogenic line. *J Cell Physiol.* 2004; 201:409–19.
- Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res.* 1997; 80:829–37.
- Iwai T. Critical limb ischemia. *Ann Thorac Cardiovascular Surg.* 2004; 10:211-12.
- Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, Hanley A, Kearney M, Aikawa R, Isner JM, Asahara T, Losordo DW. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation.* 2003; 108:3115-21.
- Iwanaga K, Takano H, Ohtsuka M, Hasegawa H, Zou Y, Qin Y, Odaka K, Hiroshima K, Tadokoro H, Komuro I. Effects of G-CSF on cardiac remodeling after acute myocardial infarction in swine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 325:1353–9.
- Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T, Kangawa K, Kitamura S. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res.* 2005; 66:543-51.
- Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem.* 2006; 99:1285-97.
- Johnson SE, Allen RE. Activation of skeletal muscle satellite cells and the role of fibroblast growth factor receptors. *Exp Cell Res.* 1995; 219:449–53.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica (10ª Edição)*. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2004.
- Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kerney M, Li T, Isner JM, Asahara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97:3422-27.
- Karamysheva AF. Mechanisms of Angiogenesis. *Biochemistry.* 2008; 73:751-762.
- Kästner S, Elias MC, Rivera AJ, Yablonka-Reuveni Z. Gene expression patterns of the fibroblast growth factors and their receptors during myogenesis of rat satellite cells. *J Histochem Cytochem.* 2000; 48:1079–96.
- Kawamura K, Takano K, Suetsugu S, Kurisu S, Yamazaki D, Miki H, Takenawa T, Endo T. N-WASP and WAVE2 acting downstream of phosphatidylinositol 3-kinase are

required for myogenic cell migration induced by hepatocyte growth factor. *J Biol Chem.* 2004; 279:54862–71.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 2006; 24:1294-301.

Khakoo AY, Finkel T. Endothelial progenitor cells. *Annu Rev Med.* 2005; 56:79-101.

Kim SJ, Cho HH, Kim YJ, Seo SY, Kim HN, Lee JB, Kim JH, Chung JS, Jung JS. Human adipose stromal cells expanded in human serum promote engraftment of human peripheral blood hematopoietic stem cells in NOD/SCID mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 329:25-31.

Kim YJ, Kim HK, Cho HH, Bae YC, Suh KT, Jung JS. Direct Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Cell Physiol Biochem.* 2007; 20:67-76.

Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Epstein SE. Bonemarrow- derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences. *Circ Res.* 2004; 95:354-63.

Kitchen S, Bazin S (eds): *Eletroterapia de Clayton.* 10. ed. São Paulo: Manole, 1998.

Koch AE. Review: amgiogenesis: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1998;41:952-62.

Kohn S, Nagy JA, Dvorak HF, Dvorak AM. Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small veins. Structural basis for the hypermeability of tumor blood vessels. *Lab Invest.* 1992; 67:596-607.

Kotch LE, Iyer NV, Laughner E, Semenza GL. Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol.* 1999; 209:254–67.

Kurtz H. Physiology of angiogenesis. *J Neurooncol.* 2000; 50:17-35.

LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell.* 2002; 111:589–601.

Lamagna C, Bergers G. The bone marrow constitutes a reservoir of pericyte progenitors. *J Leukoc Biol.* 2006; 80:677-81.

Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med.* 2007; 262:509-25.

Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue.. *Cell Physiol Biochem*. 2004; 14:311-24.

Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*. 1997; 277:242-5.

Liu TM, Martina M, Hutmacher DW, Hui JH, Lee EH, Lim B. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells*. 2007; 25:750-60.

Lu C, Thaker PH, Lin YG, Spannuth W, Landen CN, Merritt WM, Jennings NB, Langley RR, Gershenson DM, Yancopoulos GD, Ellis LM, Jaffe RB, Coleman RL, Sood AK. Impact of vessel maturation on antiangiogenic therapy in ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 198:477.e1-9; discussão 477.e9-10.

Luttun A, Carmeliet G, Carmeliet P. Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med*. 2002; 12:88–96.

Mahmood A, Lu D, Chopp M. Neurosurgery. Marrow stromal cell transplantation after traumatic brain injury promotes cellular proliferation within the brain. 2004; 55:1185-93.

Masuda H, Kalka C, Takahashi T, Yoshida M, Wada M, Kobori M, Itoh R, Iwaguro H, Eguchi M, Iwami Y, Tanaka R, Nakagawa Y, Sugimoto A, Ninomiya S, Hayashi S, Kato S, Asahara T. Estrogen-mediated endothelial progenitor cell biology and kinetics for physiological postnatal vasculogenesis. *Circ Res*. 2007; 101:598–606.

Matsi PJ, Manninen HI, Suhonen MT, Pirinen AE, Soimakallio S. Chronic critical lower-limb ischemia : prospective trial of angioplasty with 1-36 months follow-up. *Radiology*. 1993; 188:381-87.

Matsumoto R, Omura T, Yoshiyama M, Hayashi T, Inamoto S, Koh KR, Ohta K, Izumi Y, Nakamura Y, Akioka K, Kitaura Y, Takeuchi K, Yoshikawa J. Vascular endothelial growth factor-expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25:1168-73.

Matsuoka Y, Inoue A. Controlled differentiation of myoblast cells into fast and slow muscle fibers. *Cell Tissue Res*. 2008; 332:123-32.

Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*. 1961; 9:493-5.

Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med*. 2001; 226:507-20.

Miquerol L, Gertsenstein M, Harpal K, Rossant J, Nagy A. Multiple developmental roles of VEGF suggested by a LacZtagged allele. *Dev Biol.* 1999; 212:307–322.

Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation.* 2004; 110:349-55.

Monaco JL, Lawrence WT. Acute wound healing an overview. *Clin Plast Surg.* 2003; 30:1-12.

Moon MH, Kim SY, Kim YJ, Kim SJ, Lee JB, Bae YC, Sung SM, Jung JS. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem.* 2006; 17:279-90.

Moses MA. The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells.* 1997;15:180-9.

Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, Kato S, Ito M, Hotta T, Ando K. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood.* 2006; 107:1878-87.

Muir AR, Kanji AH, Allbrook D. The structure of the satellite cells in skeletal muscle. *J Anat.* 1965; 99:435-44.

Müller SM, Stolt CC, Terszowski G, Blum C, Amagai T, Kessaris N, Iannarelli P, Richardson WD, Wegner M, Rodewald HR. Neural crest origin of perivascular mesenchyme in the adult thymus. *J Immunol.* 2008; 180:5344-51.

Muñoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP, Spees JL, Prockop DJ. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102:18171–6.

Nakagami H, Meda K, Morishita R. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:2542-47.

Nehls V, Drenckhahn D. The versatility of microvascular pericytes: from mesenchyme to smooth muscle? *Histochemistry.* 1993; 99:1-12.

Nicolaides AN. Investigation of chronic venous insufficiency: A consensus statement. *Circulation.* 2000; 102:E126-63.

Niebauer J, Hambrecht R, Marburger C, Hauer K, Velich T, von Hodenberg E, Schlierf G, Kübler W, Schuler G. Impact of intensive physical exercise and low-fat diet on

collateral vessel formation in stable angina pectoris and angiographically confirmed coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1995; 76:771–5.

Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, Kodama H. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development.* 1998; 125:1747–57.

Ohtaki H, Ylostalo JH, Foraker JE, Robinson AP, Reger RL, Shioda S, Prockop DJ. Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:14638-43.

Oki Y, Watanabe S, Endo T, Kano K. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells can trans-differentiate into osteoblasts in vitro and in vivo only by all-trans retinoic acid. *Cell Struct Funct.* 2008; 33:211-22.

Ouriel K. Peripheral arterial disease. *Lancet.* 2001; 358:1257-64.

Partridge T. Reenthronement of the muscle satellite cell. *Cell.* 2004; 119:447–8.

Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol.* 2000; 50:1–15.

Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000; 95:952–8.

Pelosi E, Valtieri M, Coppola S, Botta R, Gabbianelli M, Lulli V. Identification of hemangioblast in postnatal life. *Blood.* 2002; 100:3203-8.

Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 181:902-6.

Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature.* 2006; 443:700-4.

Peters BA, Diaz LA, Polyak K, Meszler L, Romans K, Guinan EC, Antin JH, Myerson D, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW, Lengauer C. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med.* 2005; 11:261-2.

Pitterger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284:143-7

Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Pénicaud L, Casteilla L.

Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells. Physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004; 109:656-63.

Poncelet AJ, Vercruyssen J, Saliez A, Gianello P. Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracardiac injection elicits an immune response in vivo. *Transplantation*. 2007; 83:783-90.

Prior BM, Lloyd PG, Yang HT, Terjung RL. Exercise-induced vascular remodeling. *Exerc Sport Sci Rev*. 2003; 31:26–33.

Rabbany SY, Heissig B, Hattori K, Rafii S. Molecular pathways regulating mobilization of marrow-derived stem cells for tissue revascularization. *Trends Mol Med*. 2003; 9:109–117.

Rajantie I, Ilmonen M, Alminante A, Ozerdem U, Alitalo K, Salven P. Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood*. 2004; 104:2084-6.

Rashed E, Depre C. *Arch Mal Coeur Vaiss*. Cardiac cell survival and reversibility of myocardial ischemia. 2006; 99:1236-43.

Ravindranath N, Wion D, Brachet P, Djakiew D. Epidermal growth factor modulates the expression of vascular endothelial growth factor in the human prostate. *J Androl*. 2001; 22:432-43.

Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells. *Circulation*. 2004; 19:1292-98.

Relaix F, Montarras D, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S, Mansouri A, Cumano A., Buckingham M. Pax3 and Pax 7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol*. 2006; 172:91–102.

Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest*. 2002; 109:337-46.

Ripa RS, Jorgensen E, Wang Y, Thune JJ, Nilsson JC, Sondergaard L, Johnsen HE, Køber L, Grande P, Kastrup J. Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial. *Circulation*. 2006; 113:1983–92.

Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995; 11:73–91.

Robbins & Cotran (eds). Pathologic Basis of Disease (Sexta edição). Philadelphia: Elsevier, 1999.

Rupnick MA, Panigrahy D, Zhang CY. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:10730-5.

Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, Tagliafico E, Ferrari S, Robey PG, Riminucci M, Bianco P. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007; 131:324-36.

Sacramento CB, Cantagalli VD, Grings M, Carvalho LP, Baptista-Silva JC, Beutel A, Bergamaschi CT, de Campos Junior RR, de Moraes JZ, Takiya CM, Samoto VY, Borojevic R, da Silva FH, Nardi NB, Dohmann HF, Junior HS, Valero VB, Han SW. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene based therapy for acute limb ischemia in a mouse model. *J Gene Med*. 2009 [*in print*].

Saha MS, Cox EA, Sipe CW. Mechanisms regulating the origins of the vertebrate vascular system. *J Cell Biochem*. 2004; 93:46–56.

Sancho E, Batlle E, Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004; 20:695–723.

Schaper J, Koenig R, Franz D, Schaper W. The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined SEM TEM study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. 1976; 370:193–205.

Scheel KW, Fitzgerald EM, Martin RO, Larsen RA. The possible role of mechanical stresses on coronary collateral development during gradual coronary occlusion, in Schaper W (eds.): *The Pathophysiology of Myocardial Perfusion*. Amsterdam: Elsevier/North- Holland; 1979.

Schneeloch E, Mies G, Busch HJ, Buschmann IR, Hossmann KA. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced arteriogenesis reduces energy failure in hemodynamic stroke. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:12730–5.

Schor AM, Allen TD, Canfield AE, Sloan P, Schor SL. Pericytes derived from the retinal microvasculature undergo calcification in vitro. *J Cell Sci*. 1990; 97:449-61.

Schreiber AB, Winkler ME, Derynck R. Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science*. 1986; 232:1250-3.

Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fischbein MP, Robbins RC, Pelletier MP. Stem cell transplantation: the lung barrier. *Transplant Proc*. 2007; 39:573-6.

Schuh AC, Faloon P, Hu QL, Bhimani M, Choi K. In vitro hematopoietic and endothelial potential of flk-1(+) embryonic stem cells and embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:2159–64.

Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL, Wagers AJ. Determinants of skeletal muscle contributions from circulating cells, bone marrow cells, and hematopoietic stem cells. *Stem Cells*. 2004; 22:1292–304.

Shi S, Gronthos S. Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow and Dental Pulp. *J Bone Min Res*. 2003; 18:696-704.

Shyu WC, Chen CP, Lin SZ, Lee YJ, Li H. Efficient tracking of non-iron-labeled mesenchymal stem cells with serial MRI in chronic stroke rats. *Stroke*. 2007; 38:367-74.

Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*. 1998; 281:1683-6.

Silva GV, Litovsky S, Assad JA, Sousa AL, Martin BJ, Vela D, Coulter SC, Lin J, Ober J, Vaughn WK, Branco RV, Oliveira EM, He R, Geng YJ, Willerson JT, Perin EC. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*. 2005; 111:150-6.

Stauber WT, Fritz VK, Vogelbach DW, Dahlmann B. Characterization of muscles injured by forced lengthening. I. Cellular infiltrates. *Med Sci Sports Exerc*. 1988; 20:345–353.

Stetler-Stevenson W G. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest*. 1999; 103:1237-41.

Stockdale FE. Mechanisms of formation of muscle fiber types. *Cell Struct Funct*. 1997; 22:37-43.

Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Bohm M, Nickenig G. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation*. 2003; 107:3059–65.

Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*. 2005; 54:132-41.

Sugawara J, Mitsui-Saito M, Hoshiai T, Hayashi C, Kimura Y, Okamura K. Circulating endothelial progenitor cells during human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90:1845–8.

Sumi M, Sata M, Toya N, Yanaga K, Ohki T, Nagai R. Transplantation of adipose stromal cells, but not mature adipocytes, augments ischemia-induced angiogenesis. *Life Sciences*. 2007; 80:559–65.

Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amaro K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T, Therapeutic Angiogenesis using Cell transplantation (TACT) Study Investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002; 360:427-35.

Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol*. 1998; 194:114–128.

Tintut Y, Alfonso Z, Saini T, Radcliff K, Watson K, Boström K, Demer LL. Multilineage potential of cells from the artery wall. *Circulation*. 2003; 108:2505-10.

Tomanek RJ, Schatteman GC. Angiogenesis: New Insights and Therapeutic Potential. *Anat Rec (New Anat.)*. 2000; 261:126–35.

Tordjman R, Ortega N, Coulombel L, Plouet J, Romeo PH, Lemarchandel V. Neuropilin-1 is expressed on bone marrow stromal cells: a novel interaction with hematopoietic cells? *Blood*. 1999; 94:2301–9.

Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, Johnstone BH, March KL. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res*. 2008; 102:77-85.

Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004; 95:343-53.

Van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, Hofer I, Voskuil M, Schaper W. Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res*. 2001; 49:543-53.

Van Royen N, Schirmer SH, Atasever B, Behrens CY, Ubbink D, Buschmann EE, Voskuil M, Bot P, Hofer I, Schlingemann RO, Biemond BJ, Tijssen JG, Bode C, Schaper W, Oskam J, Legemate DA, Piek JJ, Buschmann I. START Trial: a pilot study on STimulation of ARTeriogenesis using subcutaneous application of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as a new treatment for peripheral vascular disease. *Circulation*. 2005; 112:1040-6.

Van Weel V, Van Tongeren RB, Van Hinsbergh VWM, Van Bockel JH e Quax PHA. Vascular Growth in Ischemic Limbs: A review of mechanisms and Possible Therapeutic Stimulaton. *Ann Vasc Surg* 2008;22:582-597

Verfaillie CM. Anatomy and Physiology of hematopoiesis. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P, Hematology – Basic Principles and Practice (Terceira edição), Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000.

Vieyra DS, Jackson KA, Goodell MA. Plasticity and tissue regenerative potential of bone marrow-derived cells. *Stem Cell Rev.* 2005; 1:65-9.

Villena J, Brandan E. Dermatan sulfate exerts an enhanced growth factor response on skeletal muscle satellite cell proliferation and migration. *J Cell Physiol.* 2004; 198:169–78.

Vokes SA, Krieg PA. Endoderm is required for vascular endothelial tube formation, but not for angioblast specification. *Development.* 2002; 129:775–85.

Wagatsuma A. Adipogenic potential can be activated during muscle regeneration. *Mol Cell Biochem.* 2007; 304:25–33

Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science.* 2002; 297:2256-9.
Wagers AJ, Conboy IM. Cellular and Molecular Signatures of Muscle Regeneration: Current concepts and controversies in adult myogenesis. *Cell.* 2005; 122:659–67.

Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005; 33:1402-16.

Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve.* 1995; 18:1417-26.

Walenta K, Friedrich EB, Sehner F. In vitro differentiation characteristics of cultured human mononuclear cells-implications for endothelial progenitor cell biology. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 333:476–82.

Wan DC, Shi YY, Nacamuli RP, Quarto N, Lyons KM, Longaker M. Osteogenic differentiation of mouse adipose-derived adult stromal cells requires retinoic acid and bone morphogenetic protein receptor type IB signaling. *PNAS.* 2006; 103(33):12335–40.

Watt FM. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1998; 353:831–7.

Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003; 112:1785-8.

Wilting J, Christ B. Embryonic angiogenesis: a review. *Naturwissenschaften.* 1996; 83:153–164.

Xia Z, Ye H, Choong C, Ferguson DJ, Platt N, Cui Z, Triffitt JT. Macrophagic response to human mesenchymal stem cell and poly(epsilon-caprolactone) implantation in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *J Biomed Mater Res A*. 2004; 71:538-48.

Xia Z, Taylor PR, Locklin RM, Gordon S, Cui Z, Triffitt JT. Innate immune response to human bone marrow fibroblastic cell implantation in CB17 scid/beige mice. *J Cell Biochem*. 2006; 98:966-80.

Yablonka-Reuveni Z, Seger R, Rivera AJ. Fibroblast growth factor promotes recruitment of skeletal muscle satellite cells in young and old rats. *J Histochem Cytochem*. 1999; 47:23-42.

Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007; 109:1801-9.

Zannettino AC, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, Gronthos S. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*. 2008; 214:413-21.

Zbinden R, Zbinden S, Windecker S, Meier B, Seiler C. Direct demonstration of coronary collateral growth by physical endurance exercise in a healthy marathon runner. *Heart*. 2004; 90:1350-1.

Zbinden S, Zbinden R, Meier P, Windecker S, Seiler C. Safety and efficacy of subcutaneous-only granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for collateral growth promotion in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46:1636-42.

Zbinden R, Zbinden S, Meier P, Hutter D, Billinger M, Wahl A, Schmid JP, Windecker S, Meier B, Seiler C. Coronary collateral flow in response to endurance exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehab*. 2007; 14:250-7.

Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, Heil M, Voswinckel R, Helisch A, Schaper W. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res*. 2004; 94:230-8.

Zohlnhofer D, Ott I, Mehilli J, Schomig K, Michalk F, Ibrahim T, Meisetschläger G, von Wedel J, Bollwein H, Seyfarth M, Dirschinger J, Schmitt C, Schwaiger M, Kastrati A, Schömig A. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2006; 295:1003-10.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001; 7:211-28.

9. ANEXOS:

9.1. Colorações

9.1.1. Colorações Especiais

9.1.1.a. Von Kossa

- **Soluções**

1) Formol 10% tamponado

Formol P.A.10mL

PBS90 mL

2) Nitrato de Prata 2%

AgNO₃2g

Água Destilada q.s.p.100mL

3) Hematoxilina de Harris

Hematoxilina Cristalizada 5 g

Álcool Etílico 95% 50 mL

Sulfato de Alumínio e Amônio (Alúmen amoniacal ou de Potássio)..... 100 g

Ácido Acético Glacial..... 20 mL

Óxido de Mercúrio (vermelho)..... 2,5 g

Água Destilada q.s.p 1000 mL

Dissolver a hematoxilina no álcool etílico e o sulfato em água quente. Misturar as duas soluções, ferver rapidamente e adicionar o óxido de mercúrio, fervendo novamente a solução até ela tornar-se vermelho escuro. Esfriar rapidamente e adicionar o ácido acético. Filtrar em papel de filtro.

- **Método**

- Fixação com formol 10% tamponado por 40 minutos

- Lavar 1x com PBS

- Lavar abundantemente com água destilada

- Incubar com Nitrato de Prata 2% por 40 minutos, na ausência de luz

- Lavar com água destilada

- Exposição à luz ultravioleta até o material adquirir cor amarronzada
- Lavar em água destilada
- Hematoxilina de Harris por 30 segundos
- Armazenar ao abrigo da luz

RESULTADO: Depósitos de cálcio evidenciados em marrom.

9.1.1.b. Oil Red O

- **Soluções**

1) Oil Red O 0,5%

Oil Red O0,5g

Propileno Glicol P.A.100mL

Adicionar o corante ao propileno glicol, aquecendo até 95°C. Deixar esfriar e filtrar em papel de filtro.

2) Propileno Glicol 85%

Propileno Glicol P.A.85mL

Água destilada q.s.p.100mL

3) Hematoxilina de Harris

Preparo descrito no Sub-item 3 do Item 9.1.1.a

- **Método**

- Fixação com formol 10% tamponado por 40 minutos
- Lavar com PBS
- Incubar com Propileno Glicol P.A por 2 minutos
- Incubar com Oil Red O 0,5% por 20 minutos
- Retirar o excesso do corante com Propileno Glicol 85% por 1 minuto
- Lavar com água destilada
- Hematoxilina de Harris por 30 segundos
- Adicionar Glicerol P.A e armazenar ao abrigo da luz.

RESULTADO: Acúmulos lipídicos corados em vermelho-alaranjado

9.1.2. Colorações Histológicas

9.1.2.a. Hematoxilina e Eosina

- **Soluções**

1) Hematoxilina de Harris

Preparo descrito no Sub-item 3 do Item 9.1.1.a

2) Eosina Y 1%

Eosina Y (amarela hidrossolúvel)..... 0,5 g

Água destilada..... 10 mL

Álcool Etílico 95 %..... 90 mL

Ácido Acético Glacial..... 1 gota

Dissolver a eosina em água destilada e depois adicionar o álcool etílico. Por fim, adicionar o ácido acético.

3) Álcool Clorídrico 1%

Álcool Etílico P.A..... 99 mL

Ácido Clorídrico Concentrado..... 1 mL

- **Método**

- Desparafinizar e hidratar os cortes histológicos

- Hematoxilina de Harris por 5 minutos

- Lavar em água corrente por 10 minutos

- Diferenciar em álcool clorídrico 1%

- Lavar em água destilada por 5 minutos

- Eosina Y 1% por 1 minuto

- Lavar em água destilada por 5 minutos

- Desidratar, clarificar e montar em Entellan

RESULTADO: Citoplasma, fibras elásticas e colágenas corados em várias tonalidades de rosa e núcleos corados em azul.

9.1.2.b. Tricrômico de Masson

• Soluções

1) Ácido Pícrico Saturado

Ácido Pícrico1,5 g

Água destilada.....100 mL

Dissolver o ácido pícrico em água destilada quente. Deixar esfriar e filtrar em papel de filtro no dia seguinte.

2) Fixador Bouin

Formol P.A20mL

Ácido Pícrico saturado 5mL

Ácido Acético Glacial 5mL

Ácido Crômico1,5g

Uréia2g

3) Hematoxilina Férrica de Weigert

Solução A: Hematoxilina Cristalizada.....1 g

 Álcool Etílico 95%.....100mL

Solução B: Solução aquosa de Cloreto Férrico 29%4 mL

 Água Destilada 95 mL

 Ácido Clorídrico Concentrado 1 mL

Misturar partes iguais das soluções A e B. Filtrar em papel de filtro. Esta solução tem estabilidade de uma semana.

4) Biebrich Escarlate- Fucsina Ácida

Solução aquosa de Biebrich Escarlate 1%..... 90 mL

Solução aquosa de Fucsina Ácida10 mL

Ácido Acético Glacial 1 mL

5) Ácido Fosfotúngico- Fosfomolibdico

Ácido Fosfotúngico	5 g
Ácido Fosfomolibdico	5 g
Água Destilada	200 mL

6) Azul de Anilina

Azul de Anilina	2,5 g
Água Destilada	100 mL
Ácido Acético Glacial	1 mL

7) Ácido Acético Glacial 1%

Ácido Acético Glacial	1 mL
Água Destilada	99 mL

• **Método**

- Desparafinizar e hidratar os cortes histológicos
- Lavar em água destilada
- Fixador Bouin por 1 hora a 37 °C, ou *overnight* a temperatura ambiente
- Deixar esfriar e lavar em água corrente até que desapareça a cor amarela
- Lavar em água destilada
- Hematoxilina férrica de Weigert por 10 minutos
- Lavar em água corrente por 10 minutos
- Lavar em água destilada
- Biebrich escarlata – fucsina ácida por 3-4 minutos
- Lavar em água destilada
- Ácido fosfotúngico-fosfomolibdico por 10-15 minutos
- Azul de anilina por 3-5 minutos
- Lavar em água corrente
- Diferenciar em solução de ácido acético glacial 1%
- Desidratar, clarificar e montar em Entellan

RESULTADO: Citoplasma, queratina, fibras musculares e fibras intercelulares coradas em vermelho; fibras de colágeno, fibras musculares degeneradas e muco coradas em azul; e núcleos corados em negro.

9.1.2.c. Vermelho de Picrossirius

- **Soluções**

1) Ácido Fosfomolibdico 0,2%

Ácido forfomolibdico0,2 g

Água destilada q.s.p.100mL

2) Ácido Pítrico Saturado

Preparo descrito no Sub-item 1 do Item 9.1.1.b.

3) Vermelho de Picrossirius

Sirius Red F3 BA0,2 g

Ácido Pítrico Saturado200 mL

4) Ácido Clorídrico 0,01M

Ácido Clorídrico 0,1M100 mL

Água Destilada q.s.p.1000 mL

5) Álcool Etílico 70%

Álcool Etílico P.A 70 mL

Água Destilada 30 mL

- **Método**

- Desparafinizar e hidratar os cortes histológicos
- Ácido fosfomolibdico 0,2% por 1 minuto
- Vermelho de Picrossírius por 90 minutos, ao abrigo da luz
- Lavar em ácido clorídrico 0,01M durante 2 minutos
- Lavar em álcool etílico 70% por 45 segundos

- Desidratar, clarificar e montar em Entellan

RESULTADO: Fibras de colágeno coradas em vermelho intenso.

9.2. Comitê de Ética em Pesquisa:

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) EDUARDO GALLATTI YASUMURA

Co-Investigadores: Roberta Sessa Stilhano, Priscila Keiko Matsumoto, Leonardo Pinto de Carvalho, Vivian Yochiko Samoto, Sang Won Han (Orientador)

Disciplina/Departamento: Biofísica da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “Engenharia genética de um sistema de expressão duradoura e seletiva do VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) para condição isquêmica baseado no sistema integrase C31 e HRE (hypoxia response element): nova abordagem de terapia gênica para isquemia de membros”.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: EXPERIMENTAL - CATEGORIA D - ESTUDO CRÔNICO ENVOLVENDO CAMUNDONGOS.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: NÃO SE APLICA.

OBJETIVOS: Desenvolver um sistema integrativo, com alta taxa de expressão e regulado pela concentração de oxigênio utilizando o gene VEGF para o tratamento da isquemia de membro em modelo murino..

RESUMO: Trata-se de trabalho experimental utilizando um total de 100 camundongos da linhagem Balb/c. O modelo de isquemia será estabelecido pela remoção completa da artéria femoral e pelo fechamento de suas ramificações. A transferência gênica será realizada por eletroporação após injeção de 50 microgramas de cada vetor diluído em 100 microlitros de tampão PBS estéril no músculo quadríceps dos animais logo após a cirurgia de isquemia. Quarenta e oito horas, duas semanas e um mês depois da transferência gênica, os animais serão eutanasiados e o músculo removido para dosagem da concentração de proteína total no sobrenadante pelo método de Bradford a posterior dosagem da concentração de VEGF por ELISA. O anestésico utilizado será ketamina em associação com xilazina e a analgesia por Carprofeno (2,5 - 5 mg/Kg). A anestesia será através de deslocamento cervical. O projeto envolve a utilização de OGMs e apresenta a carta de submissão à Comissão Interna de biossegurança (CIBio-UNIFESP)..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: A terapia gênica convencional baseada no vetor plasmidial tem mostrado resultados variáveis e necessita de estudos para sua melhor compreensão..

MATERIAL E MÉTODO: Materiais e métodos adequadamente descritos.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Sem financiamento específico.

CRONOGRAMA: 24 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 1/6/2009 e 1/6/2010.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)