

# **IMPACTO DA TERAPIA ANGIOGÊNICA PARA O TRATAMENTO DA ISQUEMIA CRÍTICA DE MEMBROS INFERIORES EM MODELO ANIMAL**

**Paulo Eduardo Ocke Reis**



*UFRJ Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Instituto de Ciências Biomédicas  
PCM Programa de Ciências Morfológicas  
Programa Avançado de Biologia Celular Aplicada a Medicina*

**Tese apresentada como requisito para obtenção  
do título de Doutor em Ciências Morfológicas**

**Orientadores:  
Prof. Dr. Radovan Borojevic  
Prof. Dr. Sang Won Han**

**Rio de Janeiro, setembro de 2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Instituto de Ciências Biomédicas

## **“Impacto da Terapia Angiogênica para Isquemia de Membros Inferiores em Modelo Animal”.**

**Paulo Eduardo Ocke Reis**

Tese apresentada como requisito para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências Morfológicas.

**Avaliada por:**

Prof. Dr. Antonio Cláudio Lucas da Nóbrega – Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto Biomédico – UFF.

Prof. Dr. Luiz Eurico Nasciutti – PCM/ICB - UFRJ.

Prof. Dra. Valéria de Mello Coelho – (Suplente Externo) – ICB / UFRJ.

Prof. Dra. Verônica Maria Morandi da Silva - Departamento de Biologia Celular e Genética – UERJ.

**Revisada por:**

Prof. Dra. Márcia Cury El-Cheikh –(Revisora e Suplente Interno) – PCM / ICB- UFRJ.

**REIS, Paulo Eduardo Ocke**

**IMPACTO DA TERAPIA ANGIOGÊNICA PARA O TRATAMENTO DA  
ISQUEMIA CRÍTICA DE MEMBROS INFERIORES EM MODELO ANIMAL**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas,  
Instituto de Ciências Biomédicas,  
Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2009.**

**1 Terapia Celular; 2 Terapia gênica; 3 Isquemia de membros  
inferiores; 4 Angiogênese; 5 Cirurgia experimental**

**xvi,86 f.**

**Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.**

**A Deus, nosso Senhor Jesus Cristo e o Espírito Santo  
que me capacitam todos os dias em minha vida.**

**Aos pacientes portadores de isquemia crítica de membros inferiores que me despertaram o interesse maior pela sua luta e que são a razão desse trabalho. Aos animais, que possibilitaram a sua realização.**

**Aos meus pais, Carlos e Mariza, que sempre lutaram,  
obstinadamente, pelos meus sonhos e sucesso.**

**Aos meus irmãos, Mário e Carlos, por vibrarem com a  
minha felicidade.**

**À minha cara metade, Irlandia e amadas filhas, Paula e  
Amanda pelo amor incondicional e alegrias eternas.**

**Aos meus amigos e demais familiares, que embora não  
citados, sempre torceram pelo meu aperfeiçoamento técnico-  
científico e sucesso na vida.**

# **AGRADECIMENTOS**

**Ao meu orientador Prof. Dr. Radovan Borojevic, que nestes anos de convívio me orientou de forma fraterna não somente nessa dissertação, mas na escolha das opções possíveis para desenvolver todo o potencial desse tema com extremada competência.**

**Ao meu orientador Prof. Dr. Sang Won Han que me recebeu de braços abertos em São Paulo no laboratório CINTERGEN e permitiu o desenvolvimento do trabalho com grande dedicação e entusiasmo.**

**A todos os professores, funcionários e alunos do Departamento de Embriologia e Histologia da UFRJ que participaram de alguma forma das etapas da tese em um ambiente profissional e amigo.**

**Aos amigos do Laboratório CINTERGEN pelo acolhimento e ajuda nos cuidados diários com os animais, em especial aos alunos Leonardo Pinto Carvalho e Eduardo Yasumura.**

**À Professora Christina Maeda Takiya pelo apoio e análise histológica das lâminas.**

**Ao Professor José Carlos Costa Baptista Silva pelo ensinamento do modelo de isquemia em camundongos.**

**Ao Hospital Pró - Cardíaco pelo convite para compor o grupo de trabalho com o tema terapia celular em isquemia crítica de membros inferiores em humanos, que foi o início da minha participação junto ao tema.**

**À Direção do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP), ao Departamento de Cirurgia Geral e Especializada da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense (UFF) pela concessão da Coordenação do Serviço de Cirurgia Vascular onde exerço plenamente a assistência aos pacientes portadores de doença vascular periférica.**

**Aos médicos staffs do serviço, ao enfermeiro Sérgio L. de Azevedo, residentes, internos e secretária Yone Coronato da Cunha do Serviço de Cirurgia Vascular do HUAP/UFF que me incentivaram e são essenciais na manutenção da qualidade do atendimento aos pacientes, principalmente enquanto ausente para dedicação a este trabalho.**

**À Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular pela minha participação no Conselho Científico da Nacional na Comissão de Microcirculação e no Departamento Científico de Pesquisa com Células Tronco da regional do Rio de Janeiro e pelo entusiasmo e espírito científico de seus membros, para aprimoramento dos conhecimentos.**



**Ao Dr. João Carlos Palazzo (*in memoriam*) que mostrou-me pela primeira vez a arte da Cirurgia Vasculuar.**

**Aos Serviços de Cirurgia Vasculuar do Hospital Central da Policia Militar, Miguel Couto e Salgado Filho pela experiência e oportunidades que foram a base da minha formação profissional.**

**Ao Dr. Bauer Sumpio do Serviço de Cirurgia Vasculuar da Universidade de Yale, EUA, onde tive os primeiros contatos com a pesquisa.**

**Ao Dr. Frank J. Veith por ter me recebido em seu serviço, dedicando-me a atenção primordial para o meu aprimoramento em técnicas endovasculares no Hospital Montefiore, Albert Einstein College of Medicine, New York, EUA.**

**À minha equipe de trabalho, enfermeira Irlandia F. Ocke Reis, secretária Teresa Valéria P. Soares e assistentes: Dra. Patrícia D. Pereira, Dr. Gustavo P. Solano, Dr. Daniel Q. Neves, Dr. Márcio Cerbazzi, Mauro H. de Lima, instrumentadora Cristiane B. L. Nascimento e anestesistas Dr. Fernando A. Fontes e Dr. Daniel C. Trindade pela participação intensa nas soluções necessárias diárias dos desafios da especialidade.**

## Sumário

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Fundamentos.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Desenvolvimento.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.1Terapia Celular &amp; Terapia Gênica.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.2Terapia Angiogênica.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1. Objetivos Primários.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2. Objetivos Secundários.....</b>	<b>19</b>
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1. Obtenção das Células Mononucleares da Medula Óssea.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2. Construção e Produção de Vetores Plasmidiais.....</b>	<b>20</b>
<b>3.3. Modelo Animal de Isquemia Periférica .....</b>	<b>21</b>
<b>3.4. Divisão dos Grupos do Estudo .....</b>	<b>23</b>
<b>3.5. Avaliação Visual da Isquemia e do Tratamento.....</b>	<b>23</b>
<b>3.6. Técnica de avaliação da força muscular .....</b>	<b>24</b>
<b>3.7. Histologia.....</b>	<b>27</b>
<b>4. Resultados.....</b>	<b>28</b>
<b>a. Análise descritiva da evolução clínica.....</b>	<b>28</b>
<b>b. Análise Estatística do Peso e Força Muscular.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3. Análise Estatística da Histologia.....</b>	<b>51</b>
<b>5. Discussão.....</b>	<b>61</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>75</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>76</b>

## RESUMO

### **IMPACTO DA TERAPIA ANGIOGÊNICA SOBRE O TRATAMENTO DA ISQUEMIA CRÍTICA DE MEMBROS INFERIORES EM MODELO ANIMAL.**

Paulo Eduardo Ocke Reis

Orientadores: Prof. Dr. Radovan Borojevic

Prof. Dr. Sang Won Han

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Morfológicas.

Objetivo: Este estudo visa a pesquisar da terapia angiogênica para isquemia arterial crítica periférica de membros inferiores em modelo animal. Metodologia: Camundongos BALB/c machos, com peso entre 20 e 25 g, com 10-12 semanas, foram anestesiados e as artérias femoral, femoral profunda e poplítea foram ligadas e seccionadas. Foram divididos em quatro grupos: **I** – recebendo células mononucleares da medula óssea (CMMO), **II** – recebendo vetor plasmidial codificando para síntese do GM-CSF e células mononucleares da medula óssea (uP-mGM + CMMO), **III** – isquêmicos sem terapia e **IV** - controle. Células adultas foram obtidas de camundongos BALB/c isogênicos através da técnica de “flushing” e separadas pelo gradiente Ficoll. O vetor plasmidial de expressão com o gene GM-CSF (uP-mGM) foi produzido baseado nas técnicas de DNA recombinante. Para a terapia celular, foram injetados no músculo quadríceps direito, logo após a realização da isquemia,  $5 \times 10^5$  CMMO, diluídas em 50  $\mu$ L de PBS. A terapia gênica foi realizada pela injeção de 100  $\mu$ g de vetor plasmidial em 100  $\mu$ L de PBS no músculo quadríceps da pata esquerda, em seguida realizamos a eletroporação. Foram aplicados três pulsos de 80 Volts com 20 ms de duração e 1 s de intervalo. Os efeitos terapêuticos foram avaliados durante quatro semanas, através de uma escala visual baseada no

grau de isquemia, da seguinte forma: pata hipofuncional, sem necrose, no estágio (1); necrose falangeal no (2); necrose acima do tornozelo no (3) e atrofia (necrose) total da pata no (4). Após quatro semanas, foi avaliado o grau de atrofia e força muscular pela mensuração da força do músculo gastrocnêmio verificados no aparelho medidor de força antes do deslocamento cervical dos animais. A seguir, os músculos gastrocnêmio e quadríceps foram pesados e o material encaminhado para histologia. Resultados: Na análise clínica descritiva, verificamos que nenhum grupo tratado teve necrose total das patas. Na análise estatística do peso e força muscular verificamos que o peso do músculo gastrocnêmio dos animais tratados foi significativamente maior que o não tratado assim como e o peso do músculo quadríceps, assim como os testes funcionais. A histologia demonstrou valores estatísticos significativos em relação à presença de vasos, regeneração e infiltração de gordura. Conclusão: Os resultados demonstraram claramente um maior comprometimento muscular do grupo não tratado. A terapia combinada demonstrou benefício, mas os resultados indicam que a aplicação de CMMO sozinha, foi mais efetiva do que as terapias combinadas. Foi verificado nesse modelo, angiogênese terapêutica nos grupos tratados comparando ao grupo isquêmico.

## ABSTRACT

### IMPACT OF ANGIOGENIC THERAPY ON THE TREATMENT OF CRITICAL ISCHEMIA OF THE LOWER LIMBS IN ANIMAL MODELS.

Paulo Eduardo Ocke Reis

Advisers: Prof. Dr. Radovan Borojevic

Prof. Dr. Sang Won Han

Abstract of the Thesis submitted to the Post-Graduate Program of Morphological Sciences, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), as part of requirements to obtain the title of Doctor in Morphological Sciences.

- Objective: This study addressed the question of angiogenic therapy for critical peripheral arterial ischemia of lower limbs in animal models.
- Methodology: 10-12 week old male BALB/c mice, weighing from 20 g to 25 g, were anesthetized and the femoral, deep femoral and popliteal arteries were ligated and severed. Animals were divided into four groups: **I** treated with bone marrow mononuclear cells -CMMO, **II** – with plasmidial vector coding for GM-CSF and bone marrow mononuclear cells (uP-mGM + CMMO), **III** – ischemic with no treatment and **IV** – control. Adult cells were obtained from isogenic BALB/c mice with the flushing technique and separated by Ficoll gradient. The plasmid expression vector with the GM-CSF (uP-mGM) gene was produced based on the recombinant DNA techniques. For the cell therapy,  $5 \times 10^5$  CMMO diluted in 50  $\mu$ L PBS were injected into the right quadriceps muscle immediately after ischemia. The gene therapy was carried out through the injection of 100  $\mu$ g of plasmid vector in 100  $\mu$ L PBS in the left leg quadriceps muscle, immediately followed by electroporation. Three 80 Volt pulses, with 20 ms duration and at 1s intervals, were applied. The therapeutic effects were evaluated during four weeks, by means of a visual scale based on the degree of ischemia, as follows: hypofunctional leg, without necrosis, as stage (1); phalangeal necrosis at (2); necrosis

above the ankle at (3) and total atrophy (necrosis) of the leg at (4). After four weeks, the degree of atrophy and muscular strength were monitored, by measuring the strength of the gastrocnemius muscle, verified on the strength measurement apparatus before the animals' cervical dislocation. The gastrocnemius and quadriceps muscles were weighed and the material forwarded for histology. Results: At descriptive clinical analysis we verified that none of the treated groups had total necrosis of the legs. At statistical analysis of weight and muscular strength, we observed that the weight of the gastrocnemius muscle and the weight of the quadriceps muscle were higher in treated animals. Functional assays showed the same results. Histology showed statistically significant values in relation to the presence of regenerated vessels and fat infiltration. Conclusion: The results show clearly greater muscular impairment in the untreated group. Combined therapy showed benefits but the results indicate that CMMO applied alone is more effective than both applied simultaneously. In this model therapeutic angiogenesis was verified compared to the ischemic untreated group.

## LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SMBOLOS

Ang-1: Angiopietina -1

bFGF: Basic Fibroblast Growth Factor

BMMC: Células Mononucleares da Medula ssea

CEP: Células Endoteliais Progenitoras

CML: Célula Muscular Lisa

CMO: Células da Medula ssea

CMV: Citomegalovrus

CT: Células-Tronco

CTMO: Células-Tronco da Medula ssea

DNA: cido Desoxirribonuclico

DAOP: Doença Arterial Obstrutiva Periférica

FE: Frao de Ejeo

FGF: Fibroblast Growth Factor

FGF- 2: Fibroblast Growth Factor-2

GM-CSF: Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor

HAS: Hipertenso Arterial Sistmica

HIF: Hipoxia – Inducible Factor

HIF - 1: Hipoxia – Inducible Factor-1

HIF-1: Hipoxia – Inducible Factor (frao protica no citoplasma)

HGF: Hepatocyte Growth Factor

Hz : Hertz

hVEGF<sub>165</sub> : Human VEGF<sub>165</sub>

IAM: Infarto Agudo do Miocrdio

IE-HCMV : Immediate-early Human CMV

ITB: Índice Tornozelo - Braço

MCP-1: Proteína Quimioativa de Monócitos

mGM-CSF: murine GM-CSF

mg: Miligramas

mm<sup>3</sup>: Milímetros Cúbicos

MMPs: Metaloproteinases

ml: Mililitros

MO: Medula Óssea

ms: Mili-Segundos

mRNA : RNA-mensageiro

n : Total de Pacientes

NO: Óxido Nítrico

O<sub>2</sub>: Oxigênio

P: Probabilidade

Pb : Pares de bases

PBS: Phosphate - Buffered Solution

pVAX :Introgen (Vetor plasmidial construído no laboratório CINTERGEN)

RNA: Ácido Ribonucleico

TCO<sub>2</sub>: Pressão de Oxigênio Transcutâneo

TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral

TACT: Therapeutic Angiogenesis Using Cell Transplantation

TACMMO: Transplante Autólogo de Células Mononucleares da Medula Óssea

TASC- Trans-Atlantic Inter Society

uP- Vetor plasmidial



uP-mGM: Vetor Plasmidial que expressa mGM-CSF

uP-VEGF: Vetor Plasmidial que expressa hVEGF<sub>165</sub>

V: Volts

VPF: Vascular Permeability Factor

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

>: Maior

<: Menor

≥: Maior ou Igual A

≤: Menor ou Igual A

μg: Microgramas

μl: Microlitros.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 FUNDAMENTOS**

O tratamento atual da isquemia crítica dos membros inferiores consiste numa tentativa universal e agressiva de salvamento destes. Apesar do conhecimento de fatores que contribuem no desenvolvimento da doença isquêmica de membro inferior, algumas limitações são encontradas principalmente na identificação da população com maior risco de amputação e na prevenção da progressão da doença vascular. Os fatores de risco identificados para a doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) são essencialmente os mesmos que promovem a aterosclerose. O tabagismo confere ao paciente três vezes mais risco de desenvolver sintomas isquêmicos dos membros inferiores que pacientes não fumantes. O estudo de Framingham demonstrou ainda que a chance de fumantes desenvolverem DAOP é duas vezes maior que de desenvolverem doença arterial coronariana [Kannel et al., 1985; Murabito et al., 1997].

Pacientes com diabetes correm o risco duas vezes maior de apresentarem doença arterial periférica que pacientes não diabéticos. A resistência à insulina, a intolerância à glicose e a hiperinsulinemia foram consideradas fatores de risco para a DAOP. A hiper-homocisteinemia é reconhecida como fator de risco, com o aumento maior que seis vezes no desenvolvimento da doença aterosclerótica, bem como a lipoproteína-A que acima de 30 mg /dL é um forte fator de risco independente para DAOP [Kannel et al., 1985]. Além disso, a associação entre a hipertrigliceridemia e a progressão da aterosclerose carotídea e coronariana está bem estabelecida em sua relação com a doença de membros inferiores [Martin et al., 1986; Blauw et al., 1997]. O papel da hipertensão arterial sistêmica (HAS) no desenvolvimento da doença é motivo de debate, com os estudos de Framingham e Finnish chegando a conclusões opostas [Murabito et al., 1997]. A HAS pode ter tanto relação de causa quanto de efeito. Sabe-se que o controle agressivo da pressão em pacientes hipertensos recentemente diagnosticados pode reduzir a perfusão, gerando descompensação do membro, tornando-o sintomático. Quando estes fatores de risco acima mencionados coexistem, o risco relativo de desenvolvimento de DAOP aumenta substancialmente. A combinação de qualquer fator de risco com tabagismo praticamente triplica a probabilidade de doença arterial de membros inferiores [Murabito et al., 1997].

É importante ressaltar a crescente mortalidade na população com doença vascular periférica devido à influência do membro isquêmico sobre o sistema cardiovascular. Possivelmente, o aumento do risco para infarto agudo do miocárdio (IAM) e acidente vascular cerebral nesta população esteja relacionado não somente a um estado de aterosclerose sistêmica, mas também a um estado pró-inflamatório crônico induzido pela isquemia de membros inferiores, com geração de grande quantidade de radicais livres de oxigênio [Murabito et al.,1997;Dormandy et al.,2000].

O que parece bem estabelecido é que a DAOP coexiste freqüentemente com a doença aterosclerótica cerebral e coronariana. O diagnóstico da doença arterial coronariana concomitante pode ser estabelecida pela história clínica, exame físico e eletrocardiograma em 40% a 60% dos pacientes com claudicação intermitente [Murabito et al., 1997]. Em metanálise desenvolvida

pelo consenso do Trans-Atlantic Inter-Society (TASC), pode-se concluir que aproximadamente 60% dos pacientes com DAOP têm doença arterial coronariana significativa, doença cerebrovascular ou ambas, enquanto 40% dos que têm doença cerebrovascular ou coronária irão desenvolver DAOP. Apesar da demonstração da íntima relação entre estas patologias, o impacto da modificação dos fatores de risco cardiovasculares sobre a história natural da vasculopatia periférica é desconhecido [Murabito et al., 1997; Dormandy et al., 2000].

A principal manifestação clínica da doença é a claudicação intermitente, definida como a dor das pernas que piora com a marcha e melhora após a interrupção da mesma. É causada pela isquemia e pela insuficiência arterial periférica, que progride lentamente. Cerca de 5% dos homens e 2,5% das mulheres acima de 60 anos têm claudicação intermitente. A prevalência é pelo menos três vezes maior quando se considera a população de pacientes sintomáticos e assintomáticos submetidos a testes diagnósticos não invasivos.

Num período de 5 a 10 anos, cerca de 70% destes pacientes permanecerão assintomáticos ou oligossintomáticos, mas 30% apresentarão sintomas progressivos e terão indicação de revascularização arterial. Cerca de 20% destes evoluirão da claudicação intermitente para a isquemia crítica do membro e os 10% restantes terão indicação de amputação menor, um ou mais pododáctilos ou parte do pé, com uma incidência abaixo de 4% para amputação maior, na perna ou coxa. A associação de diabetes mellitus e o hábito do fumo são os maiores agravantes para a DAOP, proporcionando uma evolução mais rápida da doença. [Rutherford et al. 1986; Dormandy et al., 1999; Dormandy et al., 2000; Norgren et al., 2007].

O Índice Tornozelo / Braço (ITB), cuja mensuração é realizada através do aparelho de Doppler-som, é obtido tendo como parâmetro a pressão sistólica, dividindo-se o maior valor mensurado nas artérias da perna pelo maior mensurado na artéria braquial, devendo ser realizado de rotina nesses pacientes. Dormandy demonstrou que um ITB de 0,5 no diagnóstico inicial é o indicador prognóstico mais significativo para a deterioração da DAOP e a necessidade de intervenção [Dormandy et al., 1999].

Muitos pacientes sintomáticos têm grave limitação funcional, incluindo incapacidade de deambular; de manter uma vida independente, associada a uma sobrevida diminuída. Uma revisão de mais de 24 estudos pelo TASC determinou as taxas de mortalidade de 5, 10 e 15 anos de pacientes com DAOP sintomáticos em 30%, 50% e 70% respectivamente. O ITB também se mostrou importante ao determinar associação de seus valores menores que 0,5 com doença arterial coronariana mais grave e a aumento da mortalidade. Pacientes com ITB igual ou menor a 0,3 tem taxas de sobrevida significativamente menores que aqueles dentre a faixa de 0,31 a 0,9 [Rutherford et al. 1986; Dormandy et al., 1999; Dormandy et al., 2000; Norgren et al., 2007].

Apesar dos esforços para revascularização do membro isquêmico, o tratamento cirúrgico pode evitar a amputação, mas não necessariamente resulta em deambulação e em vida independente, embora o aprimoramento das diversas técnicas de revascularização (percutâneas minimamente invasivas ou cirúrgicas) ter permitido resultados cada vez mais efetivos quanto ao salvamento do membro isquêmico [Bosch et al., 1999]. Independente disso, mesmo em casos de sucesso cirúrgico, a característica difusa da doença arterial implica em outras co-morbidades acima enumeradas, mantendo altas taxas de morbidade e mortalidade nestes vasculopatas graves [Rutherford et al. 1986; Dormandy et al., 1999; Dormandy et al., 2000; Norgren et al., 2007]. Estes pacientes são, na maior parte dos casos, do sexo masculino e encontram-se entre a sexta e a sétima décadas da vida. O intenso consumo de medicamentos é também uma realidade na vida destes pacientes. Quase todos tomam medicamentos de ação cardiovascular devido à própria doença vascular e às outras condições co-mórbidas, tais como nitratos, inibidores da enzima conversora do angiotensinogênio e diuréticos. Mais de 70% usam bloqueadores dos canais de cálcio. Os sintomas freqüentes, a limitação funcional e a dependência física somados ao uso expressivo de medicamentos devem gerar, além de uma piora na qualidade de vida dos pacientes, um elevado consumo dos recursos terapêuticos do sistema de saúde.

Vários estudos têm demonstrado que a mortalidade operatória, a permanência hospitalar e a sobrevida em longo prazo têm melhores resultados nos pacientes submetidos à revascularização do membro ao invés da

amputação, [Rutheford et al., 1986; Dormandy et al., 2000; Spichler, 2003; Norgren et al., 2007]. Os custos da amputação comparados à cirurgia de revascularização, embora não avaliados por estudos randomizados, é consistentemente maior e está longe de representar o desejado dos pacientes, seus médicos e familiares [Spichler, 2003].

O diagnóstico tardio das lesões que levam a amputação ainda é o mais prevalente, determinado por motivos basicamente sociais como desinformação da população, ausência de prevenção e infra-estrutura do sistema de saúde. Como exemplo, dentre casos de isquemia crítica atendidos pelo sistema único de saúde, a amputação primária (menor ou maior) está indicada para a resolução da patologia do membro em mais da metade dos casos.

Assim, o investimento social e a melhoria da formação profissional devem ser buscados. A distribuição da informação e a busca do diagnóstico precoce conduzirão a redução nos elevados índices de amputação.

Para os diversos estágios da progressão da doença arterial existem diferentes condutas terapêuticas. Pacientes oligossintomáticos ou com claudicação leve, que não geram modificações nos hábitos de vida diários, devem ser tratados conservadoramente através de modificações de hábitos nocivos e do uso de medicamentos vasoativos. Pacientes com claudicação incapacitante para pequenas distâncias, com dor em repouso ou lesões isquêmicas nos membros inferiores, são candidatos a revascularização (Tabela 1). Rutheford propôs uma nova classificação clínica mais abrangente que não utilizaremos [Rutheford et al., 1986]. A classificação que empregamos para o estadiamento da DAOP é a clássica de Fontaine, que tem a vantagem de ser de fácil compreensão.

### **Tabela 1: Classificação de Fontaine**

Estágio I	Assintomático
Estágio II	Claudicação Intermitente
	• Limitante
	• <b>Incapacitante</b>
Estágio III	<b>Dor Isquêmica em repouso</b>
Estágio IV	<b>Lesões Tróficas</b>

**# Em negrito, o grupo que mais freqüentemente é candidato a procedimentos de revascularização.**

A revascularização cirúrgica dos membros inferiores pode ser realizada através de dois métodos, basicamente. Um deles é o método clássico que consiste na utilização de enxertos venosos ou próteses. O outro método aplica técnicas endovasculares (utilização de bainhas, guias, cateteres e stents), acessando os vasos pela técnica percutânea por punção com agulha ou dissecação mínima dos vasos.

Ambos têm suas aplicações bem determinadas, embora as indicações de uma técnica ou outra possa variar de acordo com as características de cada caso e experiência do cirurgião [Norgren et al., 2007] .

No segmento infrapoplíteo (mais freqüente segmento afetado nos pacientes com diabetes), os resultados com o uso de próteses são pobres, sendo a cirurgia realizada na maioria das vezes com a interposição de enxertos venosos entre artérias pérvias. A patência dessa cirurgia é variável e, em muitos casos, as falhas de enxertos na evolução do paciente são evidenciadas. Novas intervenções estão sempre sendo propostas, uma vez que existam indicativos de novos processos isquêmicos, ou falhas dos enxertos prévios.

É importante ressaltar que a evolução da doença aterosclerótica não foi interrompida e o paciente pode precisar de novas intervenções. Nesse caso, a opção endovascular, ou seja, minimamente invasiva é muito atraente no que se refere a procedimentos com menor trauma cirúrgico, seja para tratar as complicações do procedimento inicial ou reintervenções devido à evolução inexorável da doença aterosclerótica. A intenção com a revascularização é de permitir ao paciente autonomia, principalmente nos idosos, mesmo que seja apenas por algum tempo nos estágios mais avançados de isquemia [Norgren et al., 2007] .

Com o avanço tecnológico e dos recursos profissionais atuais, a tendência é que os pacientes isquêmicos apresentem melhores prognósticos na manutenção da integridade de seus membros através de um acompanhamento mais estreito. Porém, na evolução da doença arterial, que depende de diversos fatores relacionados ao acompanhamento do paciente, suas condições clínicas e sociais, não são raros os casos em que as opções para o tratamento cirúrgico da isquemia se esgotam. Por vezes, após a realização sucessiva de procedimentos, o paciente geralmente alcança um estágio de doença caracterizado por artérias de pequeno calibre, muitas vezes mantidas por extensa rede de colaterais insuficientes para gerar perfusão adequada àquela área tecidual; anatomias complexas, muitas vezes envolvendo enxertos arteriais e/ou venosos trombosados, com dificuldade de acesso percutâneo; ausência de enxertos venosos viáveis na utilização para a revascularização; presença de doença grave no leito distal que atenuam os potenciais benefícios dos procedimentos [Rutherford et al. ,1986; Second European Consensus, 1991] . Nesse contexto, passa a existir uma classe de pacientes isquêmicos que não são candidatos ao tratamento cirúrgico e que sofrem com a progressão da doença isquêmica. Para este tipo de pacientes, algumas estratégias terapêuticas farmacológicas vêm sendo aplicadas, tais como a utilização de prostaglandinas por via intravenosa, intra-arterial ou por via oral mais recentemente, porém com resultados ainda limitados e em análise [Second European Consensus, 1991].

As implicações terapêuticas dos fatores de crescimento angiogênicos foram identificadas pelos estudos pioneiros de Folkman [Folkman, 1971]. Investigações posteriores estabeleceram a possibilidade da utilização de formulações de fatores de crescimento angiogênico recombinantes com o objetivo de desenvolver ou aumentar a rede de colaterais em modelos animais de isquemia crônica miocárdica ou de membro inferior. Foi denominada então, angiogênese terapêutica [Takeshita et al., 1994] . É o crescimento de novos vasos nos tecidos a partir de vasos pré-existentes. Atuando no tratamento da isquemia crítica dos membros e que associada ao controle dos fatores de risco, incentivo à prática de exercícios e terapia farmacológica, pode ser uma

alternativa para melhorar o fluxo sanguíneo nas extremidades dos membros inferiores [Takehita et al., 1994].

Mais recentemente, alternativas relacionadas à terapia celular e terapia gênica começaram a serem desenvolvidas. Asahara e colaboradores foram os primeiros a demonstrarem que o sangue periférico contém células endoteliais progenitoras (CEP) que podem se diferenciar em diferentes funções [Asahara et al., 1997] em modelo animal. A neovascularização pós-natal ocorre por migração e proliferação de células endoteliais locais e através da diferenciação das CEP derivadas da medula óssea em pacientes com isquemia crítica de membros sem opção de tratamento cirúrgico [Sprengers et al., 2008] .

Nos últimos anos, estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido publicados sugerindo o potencial do uso de células-tronco (CT) com esta finalidade. O transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea (TACMMO) tem demonstrado um grande potencial terapêutico tanto *in vitro* quanto *in vivo* para doença arterial periférica [Asahara et al., 1997,1999 e 2000; Asahara e Isner, 2002; Shi et al., 1998; Buschmann e Schaper, 2000; Carmeliet e Luttun, 2001; Ikenaga et al., 2001; Iba et al., 2002; Tateishi-Yuyama et al, 2002; Al-Khalidi et al., 2003; Saigawa et al., 2004; Reis, 2005; Huang et al., 2007; Emmerich, 2005 ; Araújo et al., 2005; Yoshida, 2005; Kajigushi et al., 2007; Van Huyen et al., 2008; Van Tongeren et al., 2008 ; Sprengers et al., 2008].

## **1.2. DESENVOLVIMENTO**

### **1.2.1 TERAPIA CELULAR & TERAPIA GÊNICA**

As CT caracterizam - se por serem células indiferenciadas, capazes de se auto-regenerar e de se diferenciar em diversas linhagens celulares [Weissman, 2000]. Estas células podem ter origem embrionária ou adulta. De acordo com a sua capacidade de auto-renovação e diferenciação, as CT podem ser classificadas como toti-potentes, pluri-potentes ou multi-potentes:

1. As células toti-potentes têm a capacidade de gerarem sozinhas todos os tecidos de um novo embrião.



2. As células pluri-potentes proliferam por longo prazo *in vitro* sem se diferenciar, mas também podem diferenciar-se em linhagens celulares se as condições de cultivo das células forem modificadas. São características de células-tronco embrionárias. Várias evidências indicam que algumas células-tronco adultas também possuem esta propriedade.

3. As células multi-potentes têm capacidade mais reduzida para diferenciação, estando destinadas a linhagens celulares específicas.

As células pluripotentes, teoricamente, podem gerar todos os tipos celulares e possuem uma alta capacidade de proliferação em um estado indiferenciado por um período prolongado em cultura [Weissman, 2000]. Estas células derivam preferencialmente de tecidos embrionários, principalmente da massa interna do blastocisto [Donovan e Gearhart, 2001]. Recentemente, células pluripotentes têm sido identificadas na medula óssea (MO) adulta [Reyes et al., 2001; Kucia et al., 2007] e também no sangue de cordão [Kucia et al., 2007].

Organismos adultos têm a capacidade de auto-regenerar determinados tecidos como a pele, o epitélio intestinal e principalmente o sangue, que têm suas células constantemente destruídas e renovadas num complexo e finamente regulado por processo de proliferação e diferenciação celular. Durante décadas estudou-se o processo de hematopoese a partir de CT multi-potentes, localizadas no interior dos ossos, que são capazes de dar origem a células progressivamente mais diferenciadas e com menor capacidade proliferativa [Weissman, 2000].

O processo de renovação celular é tão intenso que, diariamente,  $2^{13}$  novas células sanguíneas entram na circulação. É verdadeiramente assombroso que o organismo consiga manter um processo proliferativo tão exuberante sob controle, impedindo, em circunstâncias normais, que o número de células produzidas exceda o necessário e que as células liberadas na circulação estejam no estágio correto de diferenciação.

A noção de que vários tecidos e órgãos do corpo humano, como o fígado, músculo esquelético, pâncreas, e sistema nervoso, têm estoque de células-tronco com uma capacidade limitada de regeneração tecidual após injúria é razoavelmente recente. Ainda mais recente é a idéia de que as CT presentes nestes vários órgãos são não apenas multi-potentes, no sentido de

que podem gerar as células constitutivas daquele órgão específico, mas também pluri-potentes, em que também podem gerar células de outros órgãos e tecidos [Shi et al, 1998 ; Asahara et al, 2002 ; Al-Khaldi et al, 2003 ] .

Obviamente, a possibilidade de utilizar as próprias células de indivíduos adultos resolveria simultaneamente os dois principais problemas enfrentados pela bioengenharia: a rejeição imunológica de transplantes heterólogos e as objeções ético-religiosas do uso de material fetal. Vários estudos vêm demonstrando de forma cada vez mais consistente que células originadas na medula óssea participam intensamente da regeneração de várias estruturas do sistema cardiovascular [Shi et al., 1998; Asahara et al., 2002; Al-Khaldi et al., 2003; Jain, 2003]. O número de células endoteliais progenitoras circulantes aumenta em resposta a isquemia e são atraídas para os sítios de isquemia em isquemia de membro inferior e miocárdio [Shintani et al., 2001; Sprengers et al., 2008] .

Na década de 90, foram utilizadas para aplicação em tecido cardíaco, as células satélites do músculo esquelético em transplantes celulares para corações submetidos a lesões criogênicas ou isquêmicas. Entretanto, ao contrário do que se observou com os mioblastos cardíacos fetais e as CT medulares, não foi descrito o estabelecimento de junções comunicantes entre as células satélites transplantadas e o miocárdio, o que resultou em focos de arritmia. O uso de CT pluri-potentes para o tratamento de doenças cardiovasculares tem demonstrado um enorme potencial terapêutico. Os estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que as células mononucleares da medula óssea podem diferenciar-se em cardiomiócitos e vasos sangüíneos [Jackson et al., 2001].

O implante de mioblastos nas áreas de fibrose realizado durante a cirurgia de revascularização miocárdica foi à primeira descrição de terapia celular em humanos para tratamento de doenças cardíacas [Menasche et al., 2001]; Hamano relatou cinco casos no Japão, onde o transplante intramiocárdico das células-tronco da medula óssea (CTMO) foi realizado durante cirurgia de revascularização e que três dos cinco pacientes obtiveram melhora da perfusão miocárdica nos territórios injetados. Além disso, confirmaram os resultados de estudos experimentais prévios em modelos animais de que não houve nenhuma alteração prejudicial nos corações onde as

CT foram injetadas [Hamano et al., 2001]. Na Alemanha, o Dr. Bodum Strauer relata pela primeira vez o uso de CTMO com segurança, por via coronariana, em dez pacientes após o IAM [Strauer et al., 2002].

Estes resultados foram novamente confirmados por outro estudo em humanos, conduzido por Christof Stamm, na Universidade de Rostock, Alemanha. Neste estudo, seis pacientes foram submetidos ao tratamento per-operatório com injeções transepicárdicas de CTMO em áreas de fibrose miocárdica. Os resultados também mostraram segurança do procedimento e melhora da perfusão miocárdica em cinco dos seis pacientes, no seguimento de três meses [Stamm et al., 2003].

No estudo TOPCARE, também realizado na Alemanha, as CTMO, (n=9) e as CT obtidas do sangue periférico e expandidas *in vitro* em cultura (n=11), foram administradas por infusão intracoronariana quatro dias após o IAM em pacientes que foram submetidos a angioplastia primária. Os dados apresentados sugeriram uma redução da área de necrose ao final de quatro meses. Nos pacientes avaliados por tomografia com emissão de pósitrons, houve aumento de 15% na captação, o que confirmou a diminuição na área infartada. Paralelamente, houve redução de 25% no volume sistólico final, associado à melhora da fração de ejeção (FE), ambos não observados no grupo controle não randomizado (n=11). Vale destacar que houve melhora da contratilidade cardíaca regional mesmo em pacientes que não tiveram critérios de viabilidade cirúrgica ao ecocardiograma com dobutamina [Assmus et al., 2002].

Em âmbito nacional, as pesquisa envolvendo CT têm avançado de forma importante. A parceria entre o Hospital Pró-Cardíaco do Rio de Janeiro, o Texas Heart Institute de Huston, e a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), permitiu a condução de um estudo com implante trans-endocárdico, por meio de catéter, de CTMO em pacientes com cardiopatia isquêmica grave, sem possibilidade de revascularização miocárdica convencional [Perin et al., 2003]. Quatorze pacientes foram submetidos à terapia celular. Os transplantes de células foram realizados com o uso do cateter NOGA e os procedimentos foram realizados sem maiores complicações, sendo que todos os pacientes receberam alta hospitalar em 48 h.

Em dois meses de acompanhamento houve significativa melhora dos sintomas, aumento da perfusão miocárdica, com redução da área de isquemia de 15,1% para 4,5% da área do ventrículo esquerdo com ( $p=0,02$ ), redução do volume sistólico final em 15% ( $p=0,03$ ) e melhora relativa de 31% na FE ( $p=0,0004$ ). Em 2001 Ikenaga, publica trabalho em modelo de isquemia em patas de camundongos, que tinha o objetivo de investigar a extensão da angiogênese, induzida pela implantação de células autólogas mononucleares e verificada através da capacidade de melhora em exercícios. Os resultados tiveram significância estatística e demonstraram restabelecimento da força muscular pelo aumento do fluxo sanguíneo no músculo adutor [Ikenaga et al., 2001].

Em agosto de 2002, foi publicado o primeiro estudo clínico em humanos de transplante autólogo de CMMO em 52 pacientes com isquemia crônica dos membros através de injeções na panturrilha, baseados em modelos prévios e experimentais de isquemia de membro e de isquemia do miocárdio [Tateishi-Yuyama et al., 2002]. Este estudo demonstrou a segurança do método e a eficácia em desenvolver angiogênese terapêutica, provavelmente relacionada à presença de CEP na medula óssea e a possibilidade destas células secretarem diversas citocinas que estimulem a angiogênese. Este grupo tratou quarenta e cinco pernas com CTMO e verificou melhora significativa no ITB, pressão de oxigênio transcutâneo ( $\text{TCO}_2$ ) em mmHg, aumento no tempo de caminhada sem dor, incremento do fluxo ao laser Doppler e formação de vasos na arteriografia.

A implantação das células melhorou a dor em repouso desses pacientes, assim como o fechamento de feridas isquêmicas, demonstrando a eficiência do procedimento [Tateishi-Yuyama et al., 2002]. Outro grupo, seguindo o mesmo protocolo em humanos com sete pacientes com isquemia crítica de membros, observou na circulação após o procedimento células  $\text{CD34}^+$  e  $\text{CD 133}^+$  circulantes por um mês [Kajiguchi et al., 2007]. A eficiência clínica da terapia celular em isquemia crítica de membro inferior tem como primeiro fator determinante e correlação estreita o número de células  $\text{CD34}^+$ , células progenitoras circulantes, CEP que expressam em suas membranas a molécula  $\text{CD34}^+$  [Saigawa et al., 2004].

A terapia gênica é geralmente obtida via introdução de DNA estranho nas células num processo conhecido como transdução ou transfecção. Pode

envolver a entrega integral de genes ativos ou bloqueio da expressão de um gene nativo pela transfecção de oligonucleotídeos antisense, conhecidos com ácido ribonucléico (RNA) de interferência. Esses RNA são pequenas cadeias de ácido nucléico em fita simples, que têm como finalidade se anelar ao mRNA (RNA - mensageiro), impedindo a sua transcrição. A terapia gênica pode ter como objetivos a correção, quando ocorre a inserção de um gene funcional no local de um não funcional ou deleção de um gene deletério; a complementação, quando é feita a introdução de uma cópia normal sem modificação do original e adição, com o acréscimo de um gene ausente no genoma. Na doença vascular periférica, focaliza-se atualmente em três pontos: angiogênese terapêutica e estimulação do crescimento de vasos sanguíneos, prevenção de re-estenose após angioplastia com balão ou colocação de stent e prevenção de insucessos de enxertos vasculares. Os vetores mais utilizados são: adenovirus 25%, retrovirus 23%, *Naked DNA* 18% (plasmídio purificado) [Silva et al., 2008]. Nos protocolos de terapia gênica clínica, com o objetivo de estimular angiogênese na isquemia de membros, tem sido utilizado principalmente os seguintes fatores de crescimento, "*vascular endothelial growth factor*" (VEGF), "*fibroblast growth factor*" (FGF), o "*hepatocyte growth factor*" (HGF), "*angiopoietin 1*" (Ang-1) ou a expressão da "*hypoxia -inducible factor*" (HIF-1)

Diversos estudos experimentais utilizando proteína recombinante ou transferência gênica de angiopoietina -1, VEGF, FGF-2 e HGF foram realizados ou citados [Takeshita et al., 1996; Tsurumi et al. 1997; Bobek et al., 2006].

A terapia gênica incrementa a produção de fatores de crescimento localmente. Por esse processo, um gene que expressa o fator é introduzido em um DNA de origem bacteriana (plasmídio) ou viral (geralmente adenovírus), o qual é introduzido e se incorpora ao DNA nas células dos tecidos isquêmicos, passando a produzir o fator de crescimento. [Yla-Hertuala e Alitalo K , 2003; Silva et al., 2004; Bobek et al., 2006]. Esses fatores de crescimento predominantemente agem nas células endoteliais para promover proliferação e migração dessas células.

O VEGF foi identificado inicialmente como o fator que aumenta a permeabilidade vascular. Anteriormente, o VEGF foi denominado de "*vascular permeability factor*" (VPF), mas hoje se sabe que ele desempenha múltiplas

funções biológicas nas células endoteliais: aumento de mediadores vasoativos, aumento de componentes trombolíticos e de via de coagulação, supressão de hiperplasia de célula muscular lisa (CML) vascular, inibição de trombose, hipotensão e vaso-relaxamento. A expressão do VEGF é regulada por hipóxia, a qual gera óxido nítrico (NO) e HIF-1 [Murohara et al., 1998]. A transfecção gênica em seres humanos utilizando DNA carreando VEGF (phVEGF) foi inicialmente realizada para o tratamento de pacientes com isquemia grave de membros.

O primeiro protocolo de terapia gênica para isquemia foi realizado em 1994, pelo Dr. Jeffrey Isner da universidade Tufts nos EUA. Neste protocolo, foi utilizado um cateter com hidrogel contendo o vetor plasmídial VEGF<sub>165</sub>. Como o procedimento e a eficácia não foram satisfatórios, Dr. Isner começou a tratar a DAOP através de injeção intramuscular do vetor plasmídial VEGF<sub>165</sub>. Surpreendentemente, o resultado foi bem melhor que o esperado e, em consequência disso, três pacientes com dor em repouso tratados com 1000 µg de phVEGF evoluíram com melhora sintomática do fluxo arterial para o membro tratado após um ano de acompanhamento. Esses resultados determinaram a possibilidade de aumento da dose para 2000 µg em outro paciente e então ocorreu evidência angiográfica e histológica de neoformação vascular [Isner et al., 1996]. Resultados de injeção intramuscular de phVEGF-A<sub>165</sub> com transferência gênica foi realizado em estudo clínico fase I com nove pacientes e dez membros inferiores com isquemia crítica, nesse momento o autor sugeriu na interpretação dos seus resultados cautela, se a injeção intramuscular com vetor plasmídial expressaria suficiente phVEGF<sub>165</sub> para induzir angiogênese terapêutica em pacientes selecionados com doença arterial periférica [Baumgartner et al., 1998]. Injeção direta intramiocárdica de phVEGF-A<sub>165</sub> foi realizada com sucesso em pacientes portadores de doença coronariana sem possibilidade de revascularização [Losordo et al., 1999]. Sarkar verificou efeito angiogênico em sete pacientes portadores de angina refratária crônica, por meio de minitoracotomia, com injeções transepicárdicas de phVEGF-A<sub>165</sub>, que o resultado foi satisfatório [Sarkar et al., 2001].

Um estudo randomizado, duplo cego, utilizando como vetor um adenovírus demonstrou resultados positivos, indicando circulação colateral aumentada no grupo tratado com VEGF através de angiografia em três meses,

concluindo que a terapia gênica pode ser útil para o tratamento da isquemia crítica de membros inferiores [Makinen et al., 2002].

Ainda em 2002, foi publicado estudo de terapia gênica em humanos (AGENT), randomizado, duplo cego e controlado com placebo. A infusão do gene do fator de crescimento FGF foi feita por via intracoronária, utilizando adenovírus como vetor (Ad5-FGF4) em sessenta pacientes e dezenove receberam placebo, com melhora dos sintomas e da contratilidade miocárdica no grupo tratado. [Grines et al., 2002]. Posteriormente, no mesmo ano, foi publicado outro estudo randomizado, duplo cego, controlado com placebo, com dose escalonada de phVEGF em dezoito pacientes e placebo em nove pacientes que foram submetidos a injeções trans-endocárdicas [Losordo et al., 2002 ]

O estudo TRAFFIC, multicêntrico, fase II, randomizado e controlado por placebo, demonstrou angiogênese terapêutica com fator de crescimento vascular (FGF-2) recombinante, em cento e oitenta pacientes com moderada a severa isquemia crítica do membro, trinta dias foi o tempo escolhido como necessário para repetir a administração do fator de crescimento baseado na limitada experiência em pacientes com isquemia crítica de membros inferiores. Lederman afirma que, embora a administração intramuscular seja simples e tenha demonstrado promessas nos estudos iniciais em pacientes com DAOP, optaram pela via intra-arterial por acharem que a distribuição da proteína não é homogênea na injeção no músculo [Lederman et al., 2001] . Estudo prévio, fase I, deu suporte no uso de FGF-2 intra-arterial. Realizado em dezenove pacientes com doença arterial periférica, demonstrou melhora do fluxo sanguíneo dos pacientes com claudicação [Lazarous et al., 2000].

Em estudo duplo cego controlado com placebo, com n total de cinquenta e quatro pacientes diabéticos e portadores de isquemia crítica de membros inferiores, metade foi tratado com injeções intramusculares de vetor plasmidial com gene VEGF e metade com placebo. Os resultados não foram significativos estatisticamente em relação ao *end point* primário: amputação. Entretanto, demonstrou resultados positivos em relação aos seguintes parâmetros: ITB e cicatrização das feridas [Kusumanto et al., 2006].

### 1.2.2. TERAPIA ANGIOGÊNICA

Os estudos experimentais em animais e ensaios clínicos têm duas implicações. Primeiro, sugerem que o mecanismo fundamental pelo qual a neovascularização aumenta o desenvolvimento da rede de colaterais é através do fornecimento de citocina suplementar a indivíduos que, devido à idade avançada, diabetes, hipercolesterolemia e outras circunstâncias ainda não definidas, são incapazes de aumentar a expressão da mesma em resposta à isquemia tecidual. Segundo, a administração de citocina claramente representa somente um aspecto da intervenção terapêutica. Independentemente do quanto é administrado, a população de células endoteliais residentes com capacidade de resposta a um determinado nível de fator de crescimento vascular, pode constituir um fator limitante potencial para estratégias desenhadas para promover neovascularização de tecidos isquêmicos.

Essas alternativas têm sido desenvolvidas baseadas na noção conceitual de que as células endoteliais e as células-tronco hematopoiéticas derivam de um precursor comum, o hemangioblasto [Asahara et al., 1997 e 2002 ; Jain, 2003]. Portanto, o paradigma de que as células endoteliais eram geradas por replicação de células endoteliais maduras foi revolucionado. Esse autor observou que grande parte das células envolvidas no processo de angiogênese tinha origem na medula óssea (MO) [Asahara et al., 1997]. Mais ainda, possibilitaram a descoberta de que há vasculogênese na vida adulta, ou seja, que ocorre surgimento de novos vasos na vida adulta e não somente a replicação de capilares a partir de vasos já existentes, conceito que responde por angiogênese.

A liberação de citocinas como VEGF e bFGF moduladas por células da medula óssea remodelam a circulação colateral mais ativamente do que pela incorporação celular direta. O espectro da expressão gênica das citocinas pelas células da medula óssea está relacionado aos mecanismos parácrinos que sustentam os efeitos biológicos da terapia celular para tecido isquêmico [Kinnaird et al., 2004]. Esse estudo conclui que a liberação de citocinas é suficiente para mediar arteriogênese e circulação colateral após a terapia



celular. Entretanto, mecanismos complementares devem contribuir para o efeito benéfico e formação de vasos sanguíneos. [Kinnaird et al., 2004]. As células endoteliais derivadas da medula devem ter um efeito parácrino nas células endoteliais “*in situ*” pela secreção de fatores de crescimento angiogênicos [Kamihata et al., 2001].

As células precursoras endoteliais originadas na medula óssea podem ser identificadas como CD34<sup>+</sup> e VEGFR2<sup>+</sup>, embora outros marcadores como o AC133<sup>+</sup> e CD31<sup>+</sup> tenham sido descritos. Durante a isquemia tecidual, com a queda dos níveis de oxigênio, ocorre aumento da produção de HIF-1, que por sua vez desencadeará o aumento de vários fatores de crescimento, mais notadamente o VEGF. O aumento de VEGF vai ser o principal estímulo para a mobilização das células da MO, assim como o principal sinal para o “homing” destas células nos tecidos isquêmicos e sua posterior diferenciação em células endoteliais em estruturas tubulares [Baumgartner et al., 1998; Buschmann et al., 2000]. Baumgartner, que em 1998 publica o seu trabalho em humanos, baseado nos estudos pré-clínicos, com o objetivo de documentar a segurança e eficiência da transferência gênica intramuscular usando vetor plasmidial em pacientes com isquemia crítica de membros, tem os seguintes resultados: elevação do VEGF em pico por uma a três semanas, melhora do ITB, circulação colateral evidente em arteriografias e melhora do fluxo sanguíneo demonstrado em angioressonância, tem como complicação um edema transitório das extremidades [Baumgartner et al., 1998]. A aplicação de VEGF para a neovascularização terapêutica mobiliza as CEP [Kalka et al., 2000].

Fatores de crescimento, citocinas e proteases são necessários para arteriogênese. A concentração necessária desses fatores para completar a regeneração varia e pode ser limitada em cada caso de DAOP. Os monócitos que em situação de inflamação são atraídos pelo fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e pela proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1) são os maiores produtores de fatores para arteriogênese. A ação dos monócitos ativos pode não ser suficiente para resolver a doença. Uma maneira de prolongar a vida dos monócitos é através da inibição da apoptose.

O “granulocyte-macrophage colony stimulating factor” (GM-CSF) é sabidamente um fator de crescimento estimulador da hematopoese, que aumenta a proliferação e sobrevivência das células hematopoiéticas. Em

animais com isquemia de membro, isquemia cerebral e em pacientes com doença cardíaca arterial, foi demonstrado que o uso da proteína recombinante GM-CSF estimula a função dos tecidos afetados [Buschmann et al., 2003]. Esse resultado não foi confirmado em pacientes com DAOP [Van Royen et al., 2005].

Baseado nos dados da literatura pode-se inferir que o transplante intramuscular de células tronco da medula óssea em pacientes com arteriopatia periférica grave, sem possibilidade de tratamento cirúrgico ou percutâneo, viabiliza a melhora clínica destes pacientes, de forma segura, através da diferenciação destas células em células vasculares, gerando um processo de angiogênese capaz de diminuir a carga isquêmica e de promover a regeneração tecidual. Entretanto, em "*The optimization of progenitor endothelial cells in the treatment of critical leg ischemia*" (OPTIPEC), que é um estudo desenhado para avaliar a extensão da angiogênese em pacientes recebendo terapia com células progenitoras, autores concluem seu trabalho afirmando que em pacientes com isquemia crítica, o tratamento com terapia celular talvez não seja suficiente para prevenir amputação na isquemia severa, embora a terapia com CMMO induza alguma atividade na isquemia crítica de membro inferior [Van Huyen et al., 2008]. A terapia gênica pode induzir aumento da função endotelial, desenvolvimento de circulação colateral, cicatrização de úlceras e salvamento de membros, eliminando a necessidade de amputação em alguns pacientes [Isner et al., 1996; Baumgartner et al., 1998; Emmerich, 2005]. De certa forma, poucos foram os estudos envolvendo a administração de fatores de crescimento em isquemia crítica de membros [Yoshida, 2005]. Existem perguntas a serem respondidas pela pesquisa em animais e vão depender também da experiência clínica com mais estudos randomizados, duplo-cegos, com número estatisticamente adequado e, principalmente, após otimização do tratamento clínico / cirúrgico com os métodos de tratamento já consagrados. [Araújo et al. 2005].

Apesar dos avanços tecnológicos e do conhecimento médico na terapêutica clínica conservadora ou cirúrgica intervencionista com técnicas abertas convencionais ou endovasculares, está clara a necessidade de opções adicionais de tratamento. As outras já tentadas como: simpatectomias lombar, estimulação medular ou o uso de prostanoides não demonstraram benefício em

diminuir os índices de amputação após seis meses de acompanhamento [Emmerich, 2005]. A terapia celular e a terapia gênica, ambas, tanto nos experimentos em animais como em estudos clínicos, demonstraram resultados promissores usando populações de células-tronco, uma variedade de gens, introduzidos com diferentes vetores, respectivamente. Acreditamos que os resultados positivos já demonstrados deverão ser complementados através da pesquisa experimental, definindo melhor uma nova terapêutica para isquemia arterial crítica periférica, avaliando a segurança e eficácia das terapias celular e gênica, para que possamos afirmar que a terapia angiogênica é uma opção clinicamente viável e qual será a melhor forma de aplicá-la.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivos primários:**

1. Elaborar uma terapêutica para isquemia arterial periférica crítica de membros inferiores através do uso de terapia celular e do uso combinado da terapia gênica e da terapia celular.
2. Avaliar a segurança e eficácia da terapia celular e da terapia gênica em modelo experimental de isquemia arterial periférica de membros inferiores.

### **2.2. Objetivos secundários:**

- Estudar a modificação dos parâmetros clínicos dos grupos durante 4 semanas .
- Mensurar e comparar o peso (mg) do músculo gastrocnêmio entre os grupos.
- Mensurar e comparar o peso (mg) do músculo quadríceps entre os grupos.
- Mensurar e comparar a tensão pré-estímulo do músculo gastrocnêmio entre os grupos.
- Mensurar e comparar a tensão máxima do músculo gastrocnêmio entre os grupos.
- Determinar a variação da tensão (delta) entre os grupos do estudo.
- Verificar histologicamente a neoangiogênese.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Obtenção das Células Mononucleares da Medula Óssea**

Os animais usados nesse experimento foram todos camundongos machos BALB/c, de dez a doze semanas de idade, oriundos do Biotério da Universidade Federal de São Paulo. Eles foram manipulados de acordo com o protocolo aprovado e de acordo com as recomendações de cuidados próprios do uso do laboratório de animais e pelo comitê de ética da experimentação animal da UNIFESP.

As células utilizadas no presente estudo são células mononucleares adultas da medula óssea obtidas de outro camundongo (BALB/c) isogênico, que foi sacrificado para que a medula óssea do fêmur e da tíbia fosse coletada e colocada em solução PBS. Suspensões de células foram colhidas e preparadas através de uma leve pressão na medula obtida com a técnica de *flushing*. Em seguida, as células foram separadas por centrifugação e a fração mononuclear obtida através do gradiente de sedimentação estabelecido com Ficoll [Balduino et al., 2005]. A viabilidade dessas células foi próxima de 100%, verificação essa realizada através de contagem direta celular em microscopia, em câmara de Neubauer.

#### **3.2. Construção e produção de vetores plasmidiais**

O vetor plasmidial (uP) usado para expressão do mGM-CSF (murine granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF), foi construído no laboratório CINTERGEN da Universidade Federal de São Paulo pela inserção de uma seqüência de DNA contendo citomegalovírus (CMV) intron 1, no vetor comercialmente disponível pVAX (Invitrogen). Para construção do vetor uP, o promotor mínimo do CMV com 600 pares de bases (pb) foi retirado do pVAX1 (Invitrogen, Carlsbad, EUA) através da digestão com a enzima SpeI, que digere as seqüências que flanqueiam a seqüência promotora. A seqüência completa do promotor IE-HCMV (*immediate-early Human CMV*), contendo os 121 pb do éxon 1, 824 pb do íntron 1 e 87 bp do éxon 2, foi amplificada por PCR a partir do plasmídeo gWIZ (*Gene Therapy Systems*, San Diego, EUA) com os

oligonucleotídeos sense 5'-AAACTAGTACCGCCATGTTGACATTGAT-3' e anti-sense 5'-TTACTAGTCGTGTCAAGGACGGTGAAGT-3', ambos contendo o sítio de SpeI em suas extremidades. O promotor completo HCMV resultante da PCR foi digerido com a enzima SpeI, purificado e ligado ao *backbone* pVAX previamente digerido com a mesma enzima, resultando assim no vetor uP. O gene mGM-CSF (murine granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) foi inserido entre os sítios Eco RI e Eco RV, e foi chamado uP-mGM [Sacramento et al., 2009].

O vetor uP ficou maior do que o pVAX, *in vitro*, de expressão com o gene (GM-CSF) e foi produzido em larga escala para ensaios *in vitro* e *in vivo*. As técnicas de clonagem e de produção em larga escala foram baseadas nas técnicas de DNA recombinante [Sambrook et al, 1989] e das instruções dos fabricantes.

### **3.3. Modelo animal de isquemia periférica**

O conhecimento anatômico arterial dos camundongos necessário e o modelo de isquemia já haviam sido descritos previamente [Hebel, 1976; Takeshita et al., 1997]. Realizamos o modelo de isquemia arterial aguda periférica em camundongos BALB/c, com peso entre 20 a 25 g. Para induzir a isquemia da pata, todos os animais foram devidamente anestesiados e analgesiados com uma injeção intraperitoneal de ketamina (40 mg / kg do animal) e xilazina (10 mg / Kg do animal) em um volume final de 10 ml, sendo administrado 0,1 ml a cada 10g de peso do animal. Após teste algíco, foi iniciada a isquemia do membro inferior direito, utilizando microscopia com aumento de 50 x e material apropriado para dissecação de estruturas delicadas. Uma incisão vertical longitudinal foi realizada na pata direita, com extensão da região inguinal até um ponto próximo a articulação do joelho. Após divulsão e dissecação dos tecidos frouxos, realizamos a ligadura direta da artéria femoral, femoral profunda e poplítea direita nos três primeiros grupos. As artérias femorais - superficial e profunda - foram excisadas nas suas origens, próximo a artéria ilíaca externa, sem danificar ou lesar a veia e o nervo femoral. A ligadura distal foi próximo à bifurcação das artérias safena e poplítea. Essas últimas artérias citadas e a artéria circunflexa foram apenas ligadas. A perfusão

distal da pata ficou limitada aos ramos colaterais da artéria ilíaca interna, determinando um estado de isquemia severa.

Para a terapia celular, foram injetados lentamente no músculo quadríceps, direito, logo após a realização da isquemia,  $5 \times 10^5$  CMMO diluídas em 50  $\mu$ l de solução salina tamponada com fosfato (PBS), ou seja, 0,1 ml da solução, injetada com agulha de insulina .

No grupo terapia gênica mais terapia celular, foi feita a injeção das células na pata direita, após a isquemia como demonstrado acima. Em seguida, houve a injeção dos vetores plasmidiais na pata esquerda. A terapia gênica ocorreu pela injeção de 100  $\mu$ g de vetor plasmidial em 100  $\mu$ l de PBS no músculo quadríceps esquerdo com agulha de insulina (0,1 da solução).

Em seguida, somente no grupo de terapia celular e terapia gênica combinada, executou-se no músculo quadríceps esquerdo a eletroporação com o aparelho eletroporador (ECM 830), através de três pulsos de 80 Volts com 20 ms de duração e 1 s de intervalo [Escoffre et al. ,2009]. A eletrotransfecção ou eletroporação foi realizada seguindo protocolo previamente estabelecido [Escoffre et al., 2009]. É um mecanismo de várias etapas com o objetivo final de se obter um nível suficiente de expressão gênica, que é essencial na terapia gênica. Primeiro, durante a aplicação dos pulsos elétricos, a membrana plasmática se torna eletropermeável e depois, as moléculas de DNA migram e interagem com a membrana permeável, formando agregados. Essa interação ocorre somente na membrana em contato com o catodo do aparelho eletroporador. Em seguida, as moléculas de DNA migram no citoplasma. Após duas horas, as moléculas de DNA estão no núcleo das células, atingindo um nível de expressão gênica [Escoffre et al.,2009]. Na terapia combinada então, a aplicação celular foi no membro isquêmico (direito) e a terapia gênica, na pata contra lateral, esquerda.

Após os procedimentos todos os animais eram mantidos diariamente com injeção peritoneal de 5 mg / kg de Carprofen.

### **3.4. Divisão dos grupos do estudo**

São quatro (4) grupos de animais:

**I - Animais operados e tratados somente com terapia celular.**

**II - Animais operados e tratados com terapia celular e terapia gênica (combinada).**

**III - Animais operados e não tratados (isquêmicos).**

**IV - Animais não operados (controle).**

### **3.5. Avaliação visual da isquemia e do tratamento**

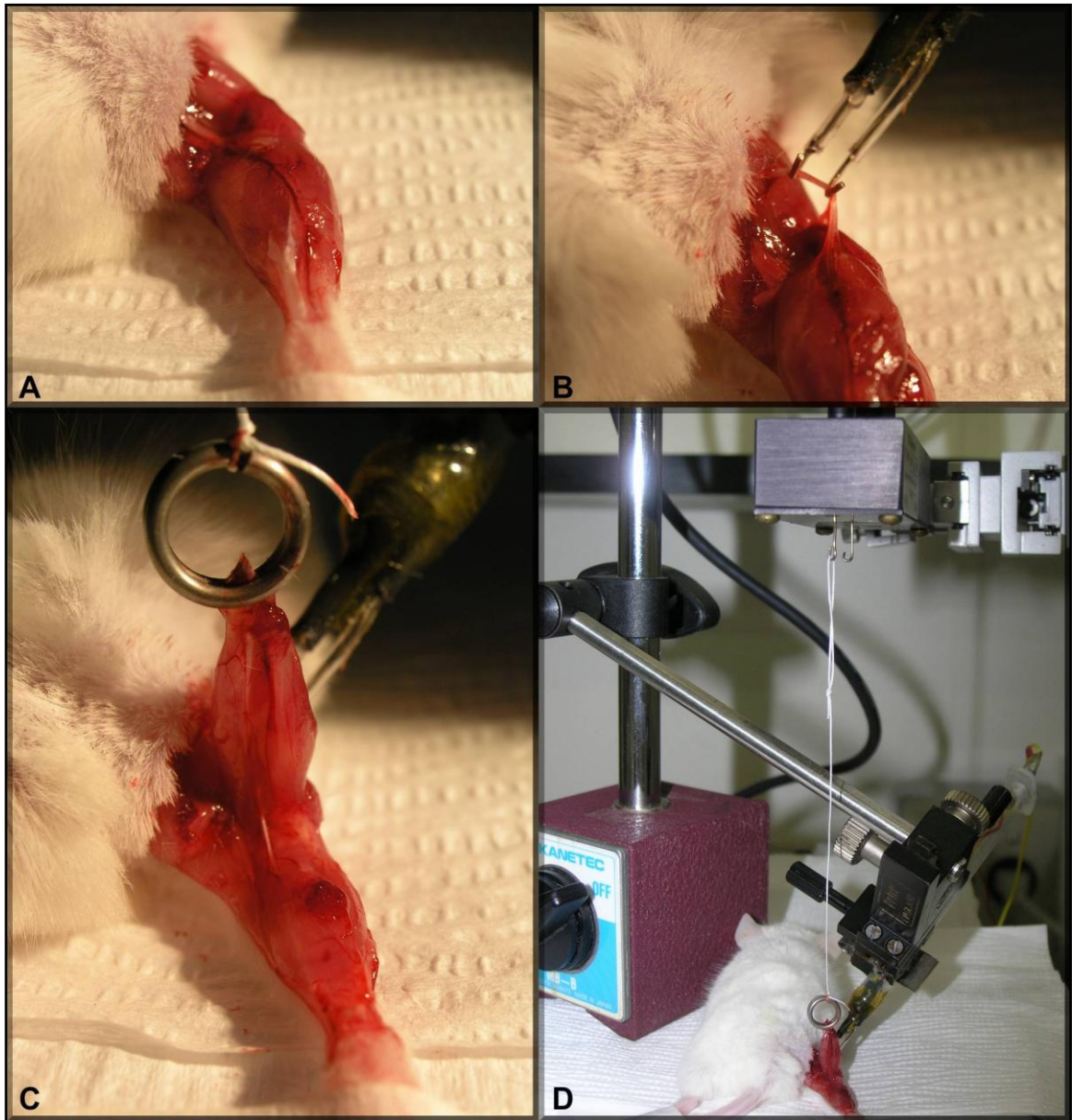
Foi utilizada uma escala de avaliação visual das patas que foi realizada durante quatro semanas e dividida em quatro estágios, conforme demonstrado abaixo.

<b>Escala</b>	<b>Características</b>
<b>(1)</b>	<b>Pata hipofuncional sem necrose.</b>
<b>(2)</b>	<b>Necrose falangeal.</b>
<b>(3)</b>	<b>Necrose acima do tornozelo.</b>
<b>(4)</b>	<b>Necrose total da pata.</b>



### 3.6. Técnica de avaliação da força muscular

Os efeitos terapêuticos clínicos foram verificados durante quatro semanas pela avaliação visual das patas. Ao final da quarta semana, verificamos os seguintes parâmetros: massa muscular e força muscular. Os animais foram anestesiados e colocados em uma mesa onde a pata foi fixada de forma rígida para evitar movimentos (Figura 1). O músculo gastrocnêmio direito foi totalmente isolado por dissecação, deixando as conexões vasculares e origem muscular intacta. A parte distal do músculo gastrocnêmio, na porção tendínea, foi isolada, cortada (secção do tendão de Aquiles) e após, realizamos a ligadura firme do mesmo a um fio inextensível ligado a uma balança transdutora de força muscular (i Worx / CB Science, Inc. Dover). Seu nervo ciático foi também dissecado e na porção distal, conectado em um eletrodo bipolar de platina, conectado a um estimulador (Grass S 88, Grass Instruments, Quince, Mass, USA). O músculo foi coberto com parafina e gaze embebida em solução salina morna continuamente. O implante do eletrodo ao nervo executou a eletro-estimulação do mesmo com três estímulos de 3V na frequência de 60 hz com intervalos de 0.2 ms entre eles. Em seguida houve novo estiramento do músculo e nova eletro-estimulação até o momento em que ocorreu piora do acoplamento actino-miosina e queda da força muscular mensurada, no topo dessa medida obtém-se a força máxima (Figura 2). Portanto, a função muscular foi então verificada pela medida da resposta da contração isométrica do músculo gastrocnêmio direito. A tensão de repouso muscular foi ajustada para se obter o máximo de tensão usando o comprimento máximo obtido no momento que se alcança o topo da curva de contração e, como já relatado, até o momento em que ocorreu piora do acoplamento actino-miosina e queda da força muscular máxima já mensurada. Em seguida, os animais foram submetidos ao deslocamento cervical, pesagem dos animais e retiraram-se os músculos quadríceps e gastrocnêmio para pesagem. A força muscular foi analisada com o Powerlab / 800 software (ADInstruments, Austrália).



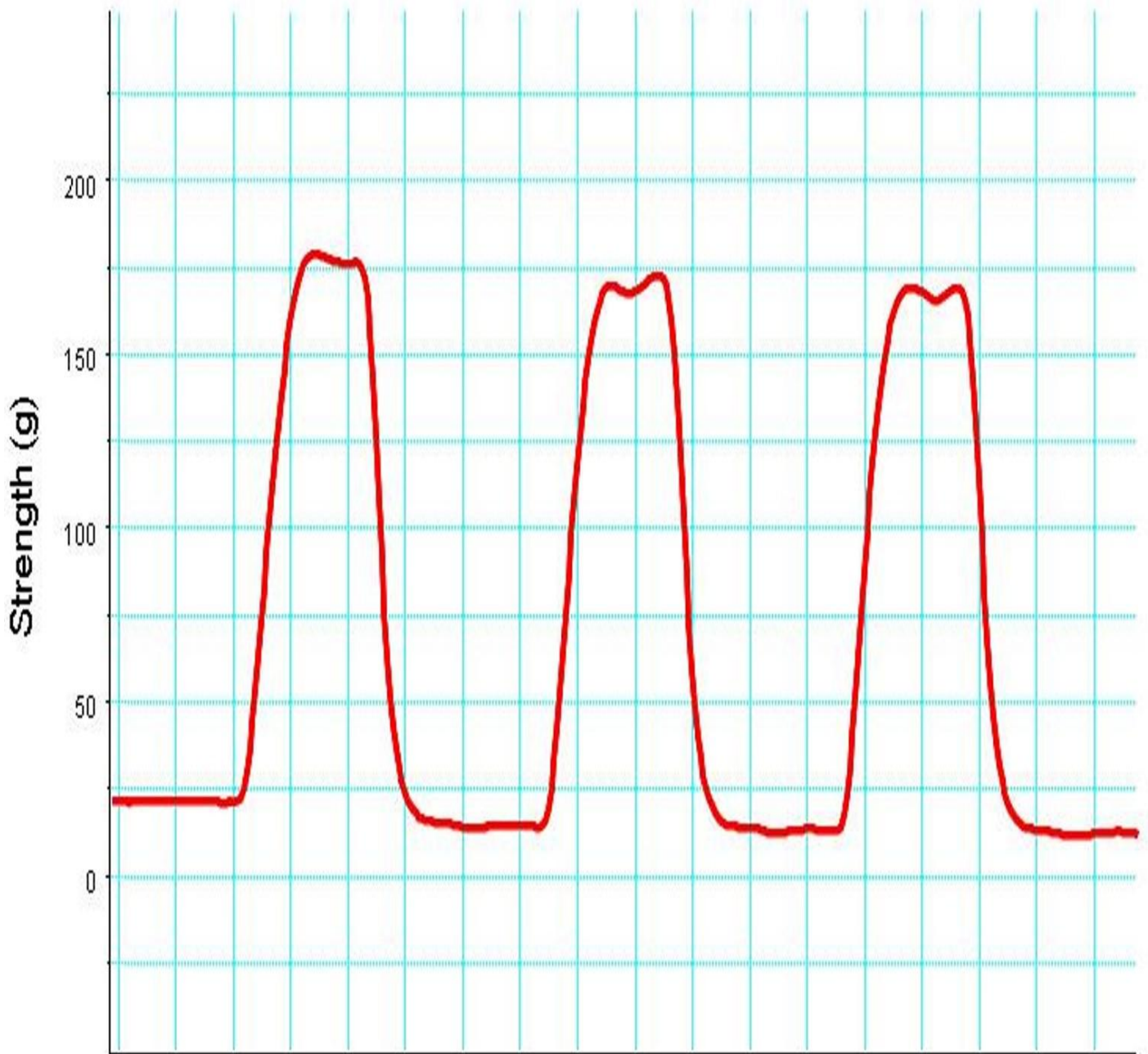
**FIGURA 1-**

**A- Dissecção do Gastrocnêmio.**

**B-Detalhe do Nervo Ciático.**

**C-Tração do tendão de Aquiles.**

**D- Aparelho de Mensuração da Força.**



**FIGURA 2** - Curva de estiramento do músculo após estimulação do nervo ciático.

### **3.7. Histologia**

Fragmentos de tecidos musculares foram obtidos e fixados em formaldeído a 10% em solução salina tamponada, desidratados e embebidos em parafina. Cortes de (6 µm) foram obtidos e corados em hematoxilina – eosina para a análise morfológica geral. A quantificação dos vasos sanguíneos capilares foi feita corando as células endoteliais por reação histoquímica com a lectina da *Griffonia simplicifolia-1* (BSL-1). As células murais das arteríolas e artérias de pequeno calibre em cortes histológicos foram coradas pela imunohistoquímica para actina alfa de músculo liso [Sacramento et al., 2009] . Uma análise descritiva foi realizada usando os seguintes parâmetros: presença de vasos capilares, regeneração muscular, degeneração muscular com infiltração adiposa, inflamação. Os resultados foram avaliados de acordo com o seguinte score [Sacramento et al., 2009] :

#### **Score de classificação**

**A – Ausência.**

**B – Até 25% (raro).**

**C – 25 – 50% (moderado).**

**D-- > 50 – 75% (intenso).**

**E-- > 75% (abundante).**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise descritiva da evolução clínica- TABELAS 1, 2 e 3.

Os quatro grupos foram divididos em:

**I - Tratados com Terapia Celular.**

**II - Terapia Celular e Gênica.**

**III - Isquêmico (sem tratamento).**

**IV - Controle.**

O **grupo I**, tratado com célula, teve um total inicial de vinte e dois animais para análise descritiva visual. Desses 22 animais, na primeira semana, doze ficaram na escala (1), seis na escala (2), três na escala (3) e um morreu [Tabela 1]. Na segunda semana, dos vinte e um animais, onze ficaram na escala (1), seis na escala (2) e quatro na escala (3) [Tabela 2]. Verificamos que na terceira semana, a distribuição dos animais em relação às características se manteve semelhante à segunda semana, totalizando um n final de 21 animais [Tabela 3]. Observou-se que desse total, nenhum animal teve necrose total da pata até o final da quarta semana (4).

O **grupo II**, que foi submetido à eletroporação e terapia gênica na pata contralateral (esquerda), teve um total inicial de onze animais. Desses, um animal morreu na primeira semana, três ficaram na escala visual (1), sete na (2) [Tabela 1]. Na segunda semana, mantiveram-se três na escala visual (1), seis na escala (2) e um animal na (3) [Tabela 2]. Os dez animais mantiveram-se até o final da terceira semana e não sofreram alteração da análise visual [Tabela 3]. Assim permaneceu esse grupo até a medida da força muscular, ao final da quarta semana. Um dos animais não sobreviveu ao ato anestésico e apenas nove fizeram a força muscular. Portanto, conta-se com o total de dez animais avaliados na escala visual desse **grupo II** e nove animais na avaliação da força muscular. Observou-se que desse total de dez, nenhum animal teve necrose total da pata (4).

O **grupo III**, operado sem tratamento, com um total para análise visual de 25 animais teve a seguinte evolução: Na primeira semana, ficaram assim divididos: seis, escala (1), sete, escala (2), onze, escala (3) e um animal na (4), sendo verificada uma morte durante há primeira semana [Tabela 1]. Na segunda semana, cinco (1), seis (2), dez na (3), três na escala (4), sendo verificadas três mortes na segunda semana [Tabela 2]. Na terceira semana, cinco animais na escala (1), quatro na (2), nove na (3), três animais na (4), sendo que ocorreram duas mortes nessa semana. Portanto, o **n** final desse grupo foi de dezenove animais no final da quarta semana [Tabela 3].

O **grupo IV**, com o total de treze animais, não apresentou alterações na avaliação durante as quatro semanas. Portanto, não ocorreram mortes ou alterações de função ou morte tecidual nesse grupo (Figura 3).

## **AValiação DO MODELO DE ISQUEMIA**

A análise dos resultados de uma terapia deve ser a melhora física e fisiológica, demonstrando o reparo do processo. Aqui, então, as observações foram realizadas a partir de um modelo de isquemia arterial da pata de camudongos BALB/c, induzida após anestesia e com ressecção do segmento de artéria femoral da pata direita. Foi utilizado para responder aos nossos questionamentos em relação a uma nova terapêutica para isquemia arterial aguda periférica de membros inferiores, através do uso combinado da terapia gênica e da terapia celular, avaliando a segurança e eficácia das mesmas nesse modelo. O estabelecimento de um modelo de isquemia de pata animal apropriado é fundamental para validar o estudo da terapia celular e gênica e para que os resultados do estudo possam ser extrapolados para as condições humanas. [Hebel et al., 1976]. Foi, portanto, usado um modelo padronizado e que tivesse precisão em semelhança com a isquemia severa aguda. A artéria ligada foi à artéria femoral, que é troncular, principal e única que irriga a pata do animal, sendo excisada em sua origem com outras artérias colaterais.

## **AVALIAÇÃO VISUAL**

A avaliação visual da isquemia ocorreu durante quatro semanas e, ao final desse tempo, foi demonstrado através da avaliação funcional, em escala já definida, um grau de comprometimento maior do grupo de animais não tratados. Em graus variados refletindo sinais de piora progressiva, de necrose e gravidade conforme o estágio. A deterioração explica-se pela perda de massa muscular, de acordo com o grau de isquemia. Os grupos com terapia combinada e terapia celular não apresentaram necrose total das patas em nenhum camundongo até o final da quarta semana [tabela 3].

**Tabela 1 – Evolução Clínica na 1ª semana.**

<b>1ª S E M A N A</b>			
<b>ESCALA</b>	<b>GRUPO I</b>	<b>GRUPO II</b>	<b>GRUPO III</b>
<b>1</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>3</b>	<b>-</b>	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1</b>
<b>Mortes</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

**Tabela 2 – Evolução Clínica na 2ª semana.**

<b>2ª S E M A N A</b>			
<b>ESCALA</b>	<b>GRUPO I</b>	<b>GRUPO II</b>	<b>GRUPO III</b>
<b>1</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>10</b>
<b>4</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>3</b>
<b>Mortes</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>3</b>

**Tabela 3 – Evolução Clínica na 3ª e 4ª semanas.**

<b>3ª e 4ª S E M A N A S</b>			
<b>ESCALA</b>	<b>GRUPO I</b>	<b>GRUPO II</b>	<b>GRUPO III</b>
<b>1</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>9</b>
<b>4</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>3</b>
<b>Mortes</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>2</b>
<b>N Final</b>	<b>21</b>	<b>10</b>	<b>19</b>





**FIGURA 3 - Exemplo visual das possibilidades da evolução clínica:**

**A - Pata sem necrose; B - Necrose falangeal; C - Necrose acima do tornozelo; D- Necrose total da pata.**

## 4.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA DO PESO E FORÇA MUSCULAR

Os dados obtidos no presente estudo foram analisados, utilizando-se:

- A. Médias aritméticas, desvios padrões, medianas, valores mínimo e máximo.
- B. Para comparação das variáveis entre os grupos I, II, III e IV foi empregado o teste não-paramétrico de Kruskal – Wallis “H” e quando significativo o seu valor, foram aplicadas às comparações múltiplas. Nas variáveis que apresentavam pequena variação, foi utilizado o teste “F” de Snedecor (ANOVA) e quando significativo o seu valor, aplicou-se o teste de Bonferroni para comparação das médias aritméticas.
- C. Na comparação da Tensão Pré e Tensão Máxima, foi empregado o teste não-paramétrico de Wilcoxon, o qual é utilizado para comparar amostras semelhantes em dois momentos distintos.
- D. Adotou-se o nível de significância de 5% de probabilidade ( $P \leq 0.05$ ).
- E. Foi utilizado o Software SPSS, versão 13.0, para realização do Trabalho.

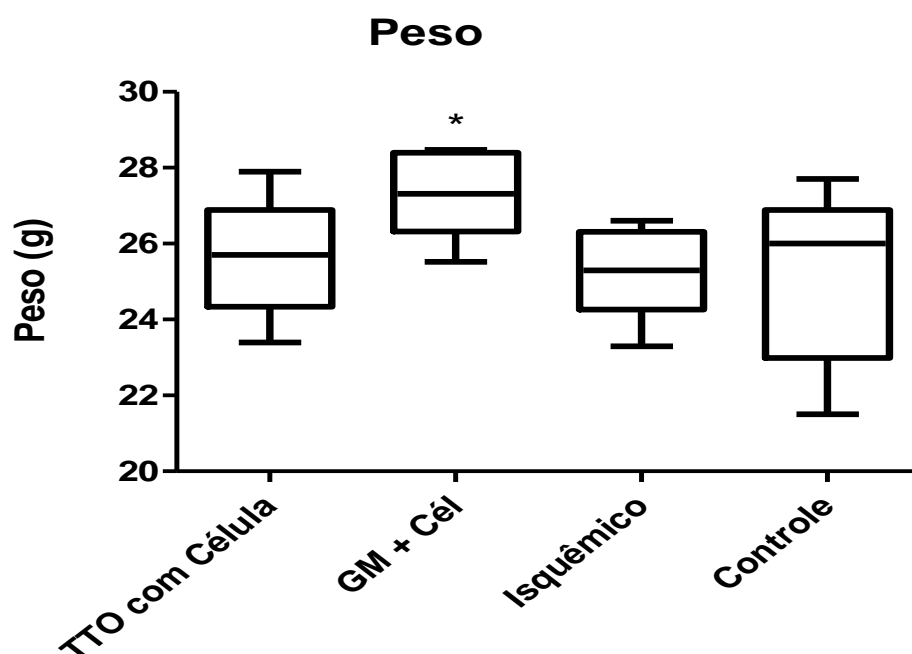
**Tabela 4 – Média aritmética, desvio padrão, mediana, valor mínimo, valor máximo, quanto ao peso dos Animais.**

<b>Grupos</b>	<b>Avaliação</b>	<b>Média aritmética</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>1</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>25.63</b>	<b>1.44</b>	<b>25.70</b>	<b>23.40</b>	<b>27.90</b>
<b>2</b>		<b>27.35</b>	<b>1.06</b>	<b>27.31</b>	<b>25.52</b>	<b>28.47</b>
<b>3</b>		<b>25.29</b>	<b>1.03</b>	<b>25.30</b>	<b>23.30</b>	<b>26.60</b>
<b>4</b>		<b>25.15</b>	<b>2.34</b>	<b>26.00</b>	<b>21.50</b>	<b>27.70</b>

Na análise estatística da tabela quatro, abaixo, encontramos diferença significativa entre as médias aritméticas dos pesos dos animais dos quatros grupos ao nível de 1% de probabilidade. Estudados grupo a grupo, as diferenças foram entre os grupos **I** (tratado com célula) e **II** (tratados com célula e gênica) / **II** e **III** (Isquêmico sem tratamento) / **II** e **IV** (controle). Quanto ao peso  $F = 3,75$  ( $P=0.018$ ), foi significativo conforme a tabela 4' e Figura 4 a seguir :

Tabela 4'- Diferenças significativas em negrito.

Avaliação	Testes	(P)	P(1 e 2)	P(1 e 3)	P(1 e 4)	P(2 e 3)	P(2 e 4)	P (3 e 4)
Peso	F= 3.75	<b>0.018</b>	<b>≤ 0.05</b>	> 0.05	> 0.05	<b>≤ 0.05</b>	<b>≤ 0.05</b>	>0.05



**FIGURA 4** - Peso dos animais dos quatros grupos, com diferença significativa entre as médias aritméticas dos pesos dos animais dos quatros grupos. Estudados grupo a grupo, as diferenças foram determinadas pelo grupo II.

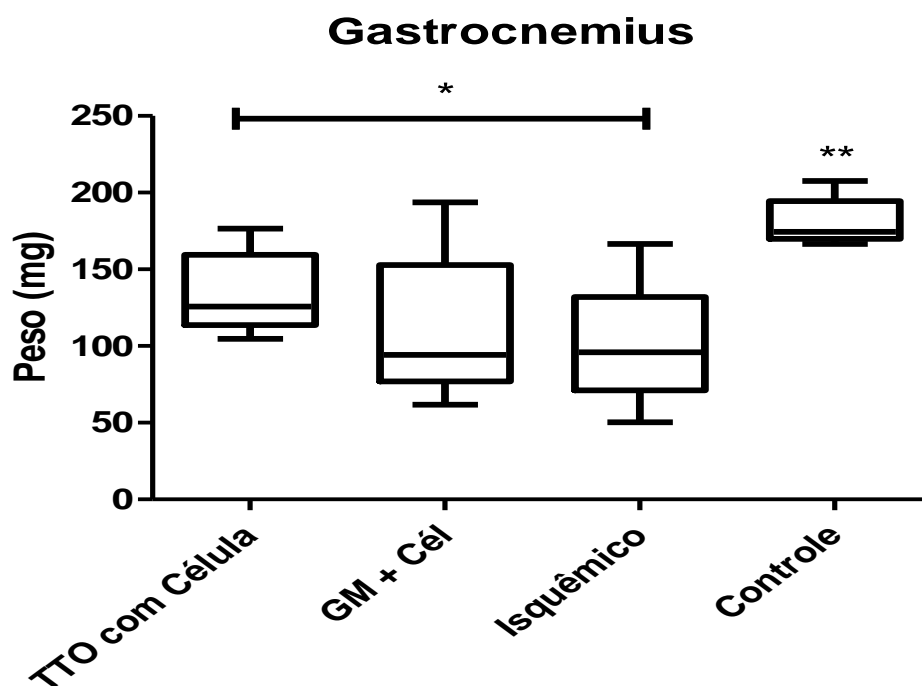
**Tabela 5 - Média aritmética, desvio padrão, mediana, valor mínimo, valor máximo, quanto ao Peso do Músculo Gastrocnêmio.**

<b>Grupos</b>	<b>Avaliação</b>	<b>Média aritmética</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>1</b>	<b>Peso Gastrocnêmio (mg)</b>	<b>134.36</b>	<b>21.08</b>	<b>125.65</b>	<b>104.70</b>	<b>176.60</b>
<b>2</b>		<b>110.67</b>	<b>41.64</b>	<b>94.30</b>	<b>61.80</b>	<b>193.60</b>
<b>3</b>		<b>100.34</b>	<b>29.37</b>	<b>96.00</b>	<b>50.40</b>	<b>166.50</b>
<b>4</b>		<b>180.63</b>	<b>24.20</b>	<b>174.50</b>	<b>166.50</b>	<b>207.70</b>

O peso do músculo gastrocnêmio com  $H = 24.98$  ( $P=0.000$ ) foi significativo ao nível de 1% de probabilidade, abaixo. Concluímos que houve diferença significativa entre os valores dos pesos desse músculo nos 4 grupos. Nessa variável foi empregado o teste não paramétrico de Kruskal - Wallis, devido à variação entre os valores. Nesse caso, a mediana e os valores mínimos e máximos expressam melhor a amostra. Quando o teste de Kruskal – Wallis é significativo, aplicam-se as comparações múltiplas, comparando-se os grupos de 2 em 2 (Ex. I x II, I x III, I x IV, II x III, II x IV, III x IV), para verificar onde há diferença significativa. Neste estudo, verificamos diferenças entre: **I e III / I e IV / II e IV / III e IV**. Tabela 5' e Figura 5, a seguir :

Tabela 5'- Diferenças significativas em negrito.

Avaliação	Testes	(P)	P(1 e 2)	P(1 e 3)	P(1 e 4)	P(2 e 3)	P(2 e 4)	P (3 e 4)
Peso Gastro	H=24.98	<b>0.000</b>	0.174	<b>0.031</b>	<b>0.011</b>	0.484	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>



**FIGURA 5** - Peso do músculo gastrocnêmio dos quatro grupos, com diferença significativa entre os valores dos pesos desse músculo, comparando-se os grupos de 2 em 2. Verificamos diferenças entre: I e III / I e IV / II e IV / III e IV.

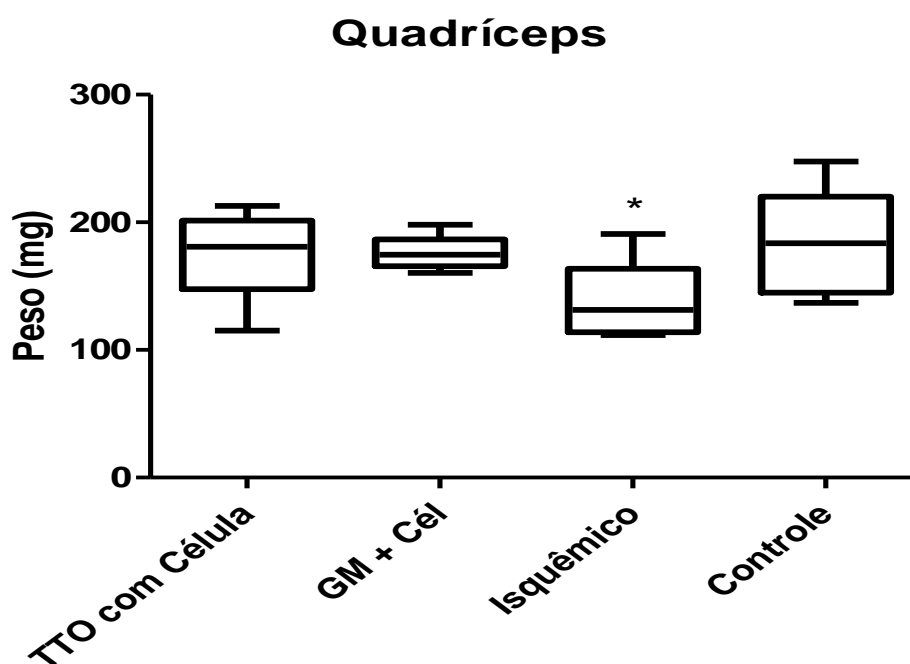
**Tabela 6 - Média aritmética, desvio padrão, mediana, valor mínimo, valor máximo, quanto ao Peso do Músculo Quadríceps.**

<b>Grupos</b>	<b>Avaliação</b>	<b>Média aritmética</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>1</b>	<b>Peso Quadríceps (mg)</b>	<b>175.72</b>	<b>27.58</b>	<b>180.85</b>	<b>115.20</b>	<b>212.80</b>
<b>2</b>		<b>175.80</b>	<b>11.71</b>	<b>174.50</b>	<b>160.30</b>	<b>198.10</b>
<b>3</b>		<b>137.19</b>	<b>23.63</b>	<b>131.25</b>	<b>111.50</b>	<b>190.80</b>
<b>4</b>		<b>182.69</b>	<b>31.14</b>	<b>183.50</b>	<b>136.80</b>	<b>247.60</b>

O peso do músculo quadríceps apresentou valor de  $F= 6.9$  ( $P= 0.001$ ), que foi significativo ao nível de 1% de probabilidade. Quando aplicamos o teste de Bonferroni, verificamos diferenças significativas entre **I e III / II e III / III e IV**. Tabela 6' e Figura 6, a seguir :

Tabela 6'- Diferenças significativas em negrito.

Avaliação	Testes	(P)	P(1 e 2)	P(1 e 3)	P(1 e 4)	P(2 e 3)	P(2 e 4)	P (3 e 4)
Peso Quadríceps	<b>F = 6.90</b>	<b>0.001</b>	> 0.05	<b>≤ 0.05</b>	> 0.05	<b>≤ 0.05</b>	> 0.05	<b>≤ 0.05</b>



**FIGURA 6** - Peso do músculo quadríceps dos quatros grupos, com diferença significativa entre os valores dos pesos desse músculo, comparando-se os grupos de 2 em 2. Verificamos diferenças entre: I e III / II e III / III e IV.



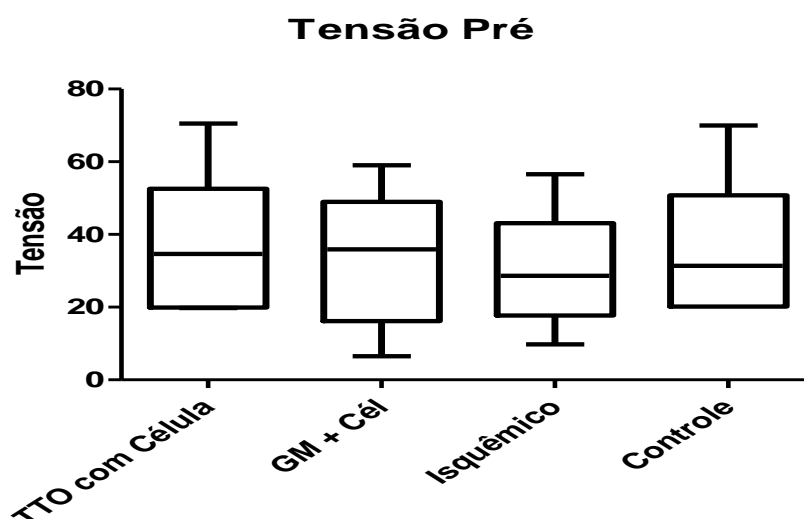
**Tabela 7– Média aritmética, desvio padrão, mediana, valor mínimo, valor máximo, quanto à Tensão Pré.**

Grupos	Avaliação	Média aritmética	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
1	Tensão Pré	35.93	15.12	34.66	19.76	70.51
2		31.34	17.77	38.92	6.47	59.06
3		30.06	18.02	28.62	9.77	56.56
4		33.97	12.40	31.40	20.19	69.98

Quanto à tensão pré (antecede o momento de tração do músculo), não encontramos diferença estatística. Portanto, podemos concluir que as médias aritméticas dos quatro grupos são semelhantes conforme demonstrado na tabela 7'e Figura 7, abaixo:

**Tabela 7'- Não houve diferença estatística significativa.**

Avaliação	Testes	(P)
Tensão Pré	H = 0.55	0.907



**FIGURA 7-** Quanto à tensão pré (antecede o momento de tração do músculo), não houve diferença estatística. As médias aritméticas dos quatro grupos são semelhantes.

**Tabela 8 – Média aritmética, desvio padrão, mediana, valor mínimo, valor máximo, quanto a Tensão Máxima.**

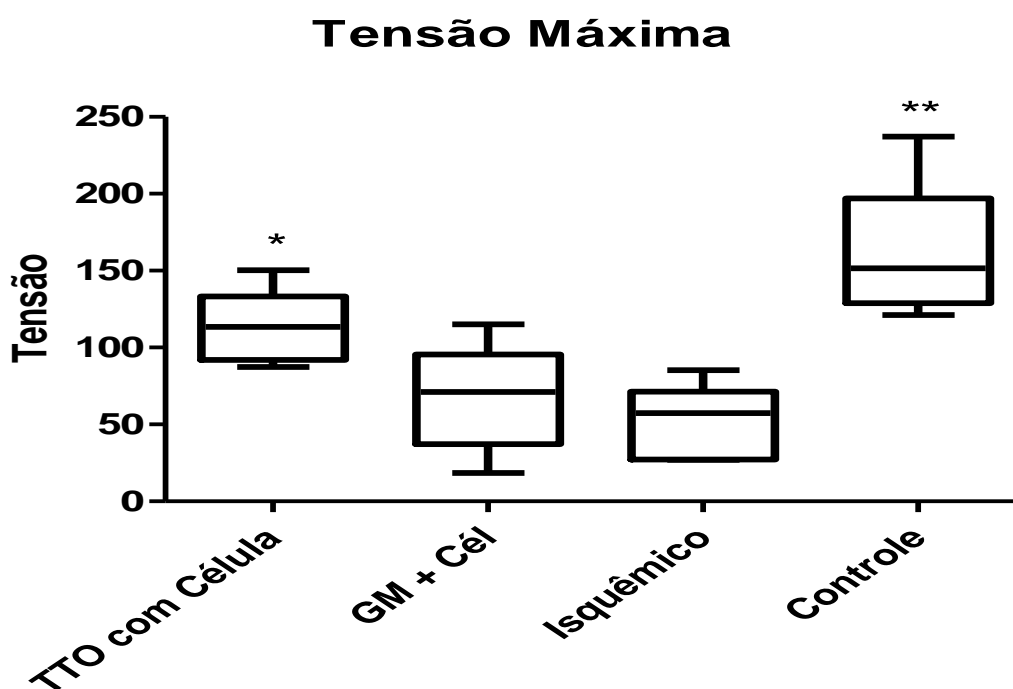
<b>Grupos</b>	<b>Avaliação</b>	<b>Média aritmética</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>1</b>	<b>Tensão Máxima</b>	<b>112.77</b>	<b>19.67</b>	<b>113.35</b>	<b>87.47</b>	<b>150.27</b>
<b>2</b>		<b>67.29</b>	<b>29.83</b>	<b>71.19</b>	<b>18.34</b>	<b>115.04</b>
<b>3</b>		<b>53.06</b>	<b>18.98</b>	<b>57.33</b>	<b>26.90</b>	<b>85.27</b>
<b>4</b>		<b>160.63</b>	<b>36.31</b>	<b>151.53</b>	<b>121.16</b>	<b>237.14</b>

Em relação à tensão máxima  $H= 34.45$  ( $P= 0.000$ ), foi significativo ao nível de 1% de probabilidade. Há diferença significativa entre os valores da tensão máxima dos 4 grupos. Nesse caso, a mediana e os valores mínimos e máximos expressam melhor a amostra. Quando o teste de Kruskal - Wallis é significativo, aplicaram-se as comparações múltiplas, comparando os grupos de 2 em 2 (Ex. I x II , I x III , I x IV, II x III, II x IV, III x IV), para verificar onde há essa diferença. Na amostra verificamos diferenças entre:

**I e II / I e III / I e IV / II e IV / III e IV.** Tabela 8'e Figura 8, a seguir:

Tabela 8' – Diferenças significativas em negrito.

Avaliação	Testes	(P)	P(1 e 2)	P(1 e 3)	P(1 e 4)	P(2 e 3)	P(2 e 4)	P (3 e 4)
Tensão Máxima	H =34.45	<b>0.000</b>	<b>0.021</b>	<b>0.001</b>	<b>0.026</b>	0.490	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>



**FIGURA 8** - Na tensão máxima, há diferença significativa entre os valores dos 4 grupos. Nas comparações múltiplas, comparando os grupos de 2 em 2, verificamos diferenças entre: I e II / I e III / I e IV / II e IV / III e IV.

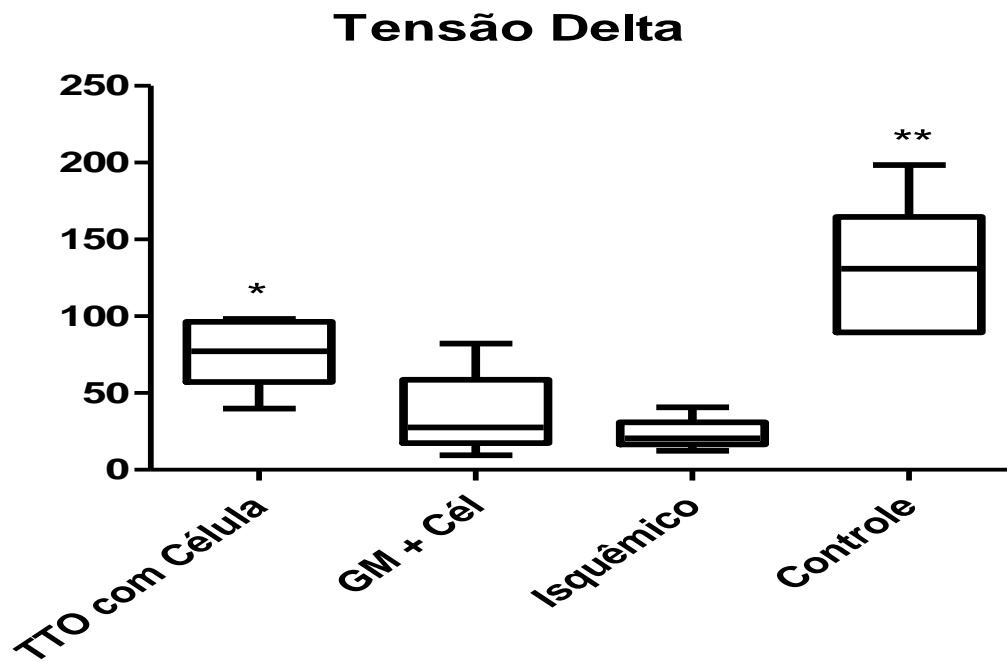
**Tabela 9 – Média aritmética, desvio padrão, mediana, valor mínimo, valor máximo, quanto a Tensão Delta.**

<b>Grupos</b>	<b>Avaliação</b>	<b>Média aritmética</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>1</b>	<b>Tensão Delta</b>	<b>76.84</b>	<b>15.95</b>	<b>77.25</b>	<b>39.88</b>	<b>98.24</b>
<b>2</b>		<b>35.96</b>	<b>26.76</b>	<b>27.68</b>	<b>9.54</b>	<b>82.23</b>
<b>3</b>		<b>23.03</b>	<b>8.29</b>	<b>20.52</b>	<b>12.46</b>	<b>40.77</b>
<b>4</b>		<b>126.66</b>	<b>31.07</b>	<b>130.86</b>	<b>89.39</b>	<b>198.37</b>

Em relação à tensão Delta  $H= 34.15$  ( $P= 0.000$ ), foi significativo ao nível de 1% de probabilidade. Há diferença entre os valores da tensão Delta dos 4 grupos. (Tabela 2) Nesse caso, a mediana e os valores mínimos e máximos expressam melhor a amostra. Quando o teste de Kruskal - Wallis é significativo, aplicaram-se as comparações múltiplas, comparando os grupos de 2 em 2 (Ex. I x II, I x III, I x IV, II x III, II x IV, III x IV), para verificar onde há essa diferença. Na amostra, verificaram-se diferenças entre: **I e II / I e III / I e IV / II e IV / III e IV**. Tabela 9' e Figura 9 a seguir :

Tabela 9'- Diferenças significativas em negrito.

Avaliação	Testes	(P)	P(1 e 2)	P(1 e 3)	P(1 e 4)	P(2 e 3)	P(2 e 4)	P (3 e 4)
Tensão Delta	H= 34.15	0.000	0.030	0.004	0.014	0.569	0.000	0.000

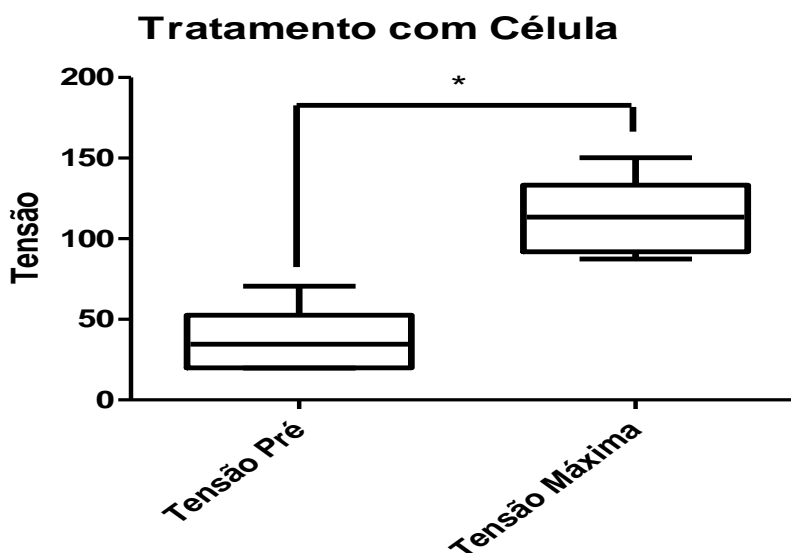


**FIGURA 9** - Tensão Delta dos 4 grupos. Há diferença significativa entre os valores da tensão e comparando os grupos de 2 em 2, as diferenças foram entre: I e II / I e III / I e IV / II e IV / III e IV.

Quanto à comparação da tensão pré e a tensão máxima, em outra análise, foram verificadas por grupo (separadamente), se a diferença entre o pré e o máximo foi significativa. Verificou-se que as diferenças foram significativas entre os momentos pré e máximo. Foi empregado o teste não-paramétrico de Wilcoxon, o qual é utilizado para comparar amostras semelhantes em dois momentos distintos.

**TABELA 10 – Média aritmética, desvio padrão, mediana, valor mínimo, valor máximo, teste não-paramétrico de Wilcoxon e sua significância, quanto a Tensão pré e Tensão máxima do grupo I, Figura 10, abaixo.**

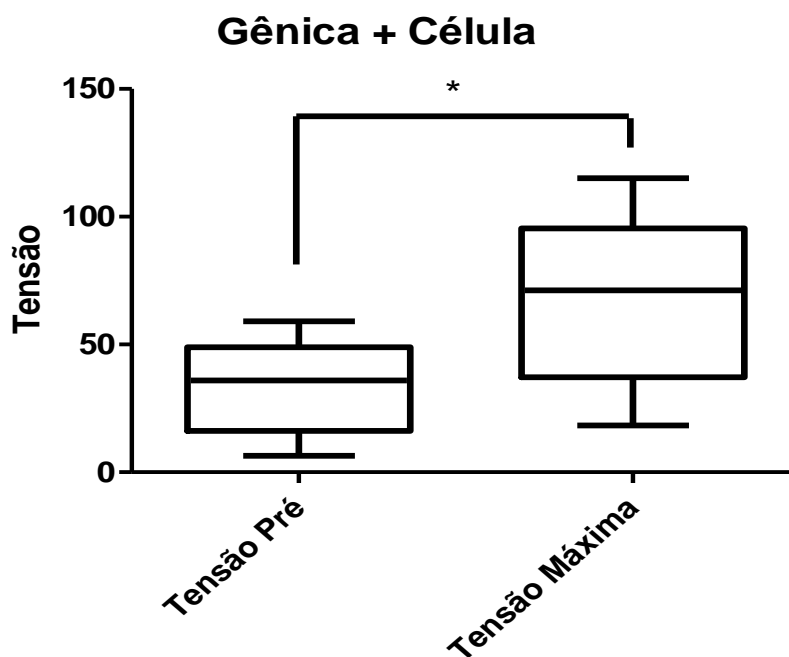
Grupo I	Média aritmética	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Wilcoxon	(P)
Pré	35.93	15.12	34.66	19.76	70.51	- 3.06	(P=0.002)* *
Máxima	112.77	19.67	113.35	87.47	150.27		



**FIGURA 10** - No grupo tratado com célula, a diferença foi significativa entre os momentos pré e máximo da tensão.

**TABELA 11 – Média aritmética, desvio padrão, mediana, valor mínimo, valor máximo, teste não-paramétrico de Wilcoxon e sua significância, quanto a Tensão Pré e Tensão máxima do grupo II, Figura 11, abaixo.**

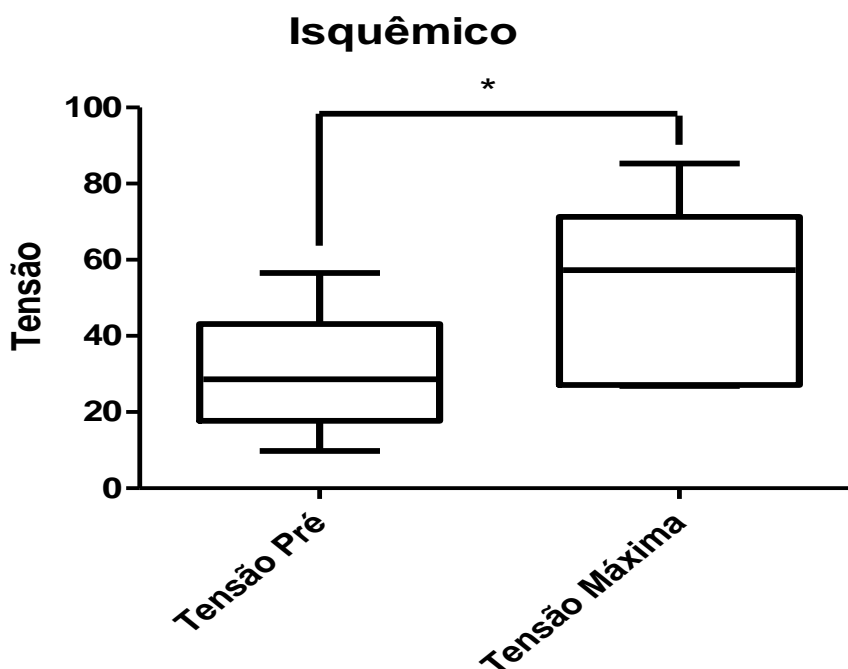
Grupo II	Média aritmética	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Wilcoxon	(P)
Pré	31.34	17.77	38.92	6.47	59.06	- 2.66	(P=0.007)**
Máxima	67.29	29.83	71.19	18.34	115.04		



**FIGURA 11** - No grupo tratado com terapia gênica e célula, simultaneamente, houve diferença significativa entre os momentos pré e máximo da tensão.

**TABELA 12 – Média aritmética, desvio padrão, mediana, valor mínimo, valor máximo, teste não-paramétrico de Wilcoxon e sua significância, quanto a Tensão pré e Tensão máxima do grupo III, Figura 12, abaixo.**

Grupo III	Média aritmética	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Wilcoxon	(P)
Pré	30.66	18.02	28.62	9.77	56.56	- 2.80	(P=0.005)**
Máxima	53.06	18.98	57.33	26.90	85.27		

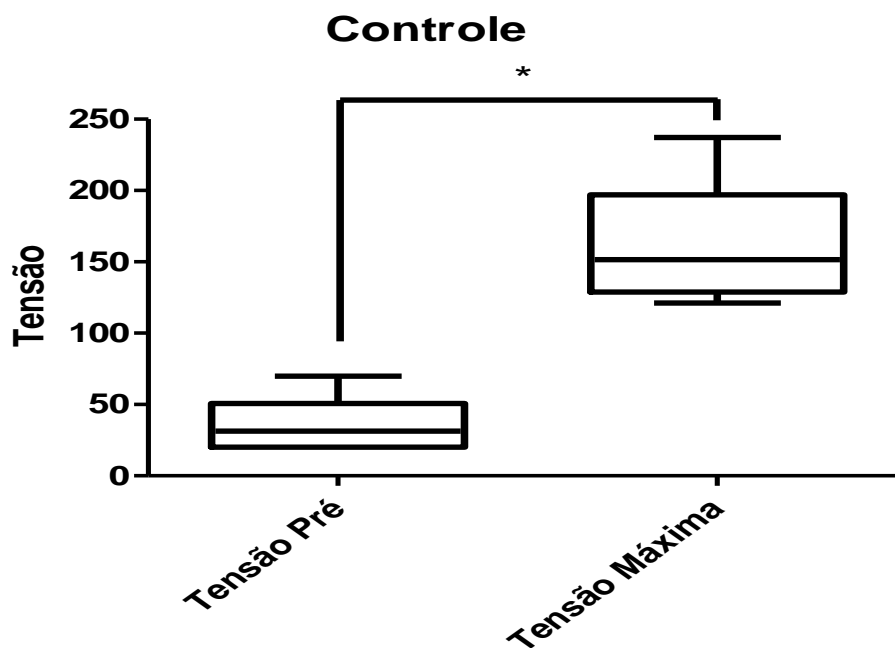


**FIGURA 12 -** No grupo isquêmico (não tratado), ocorreu diferença significativa entre os momentos pré e máximo da tensão.



**TABELA 13 – Média aritmética, desvio padrão, mediana, valor mínimo, valor máximo, teste não-paramétrico de Wilcoxon e sua significância quanto a Tensão pré e Tensão máxima do grupo IV, Figura 13, abaixo.**

Grupo IV	Média aritmética	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Wilcoxon	(P)
Pré	33.97	12.40	31.40	20.19	69.98	- 3.18	(P=0.001)* *
Máxima	160.65	36.32	151.53	121.16	237.14		



**FIGURA 13** - No grupo controle, houve diferença significativa entre os momentos pré e máxima da tensão.

## **AVALIAÇÃO DO PESO E FORÇA MUSCULAR**

Para avaliar a perda de tecido muscular e a capacidade de regeneração dos mesmos após as quatro semanas, os animais foram novamente anestesiados e realizaram-se os testes de força muscular. A seguir os animais foram sacrificados e realizamos a pesagem dos animais e dos músculos gastrocnêmio e quadríceps das patas isquemiadas dos grupos **I**, **II** e **III** e das patas direita dos animais do grupo **IV**. Esse modelo de isquemia da pata demonstrou a melhora clínica e fisiológica após a injúria isquêmica nos grupos tratados em contraste com o grupo operado e não tratado na análise visual durante um mês. Na [tabela 4], foi demonstrado uma diferença estatística significativa no grupo **II**, referente ao peso dos animais, dado à ação sistêmica do GM-CSF e a eficiência da eletroporação. Uma avaliação mais precisa das alterações durante os trinta dias, em relação ao peso e suas variações entre os grupos, foi obtida com a pesagem dos músculos gastrocnêmio e quadríceps da coxa direita dos quatro grupos. Das alterações do músculo gastrocnêmio, entre os grupos, destaca-se o grau de comprometimento e lesão observada no grupo **III**, confirmado pelos resultados estatísticos demonstrados na [Tabela 5]. Com perda de fibra muscular em ambos os grupos tratados, comparando ao grupo **IV**, controle, mas com preservação de tecido em ambos os grupos tratados, estatisticamente significativo ao nível de 1%, comparando-se ao grupo **III**, não tratado. Não houve diferença significativa entre os grupos **I** e **II** nessa análise. O resultado estatístico em relação ao peso do músculo quadríceps é semelhante aos resultados observados no músculo gastrocnêmio com significância ao nível de 1%, ratificando o grau de comprometimento do grupo **III** e preservação dos grupos **I** e **II** [Tabela 6]. Quanto à tensão pré que antecede o momento de tração do músculo, não houve diferença estatística. Portanto, podemos concluir que as médias aritméticas dos quatro grupos são semelhantes conforme demonstrado. [Tabela 7].

Na medida de tensão máxima obtida através da determinação da força muscular verificamos que foi significativo ao nível de 1% de probabilidade. Há diferença significativa entre os valores da tensão máxima dos 4 grupos. Sendo que destacamos a preservação da força muscular do grupo tratado apenas com célula com diferença significativa com os grupos **II** e **III** e fica demonstrado o grau de atrofia do grupo **III**, com resposta reduzida comparando-se a ambos os grupos tratados [Tabela 8]. A variação da tensão, tensão delta, de forma definitiva confirma as diferenças estatisticamente significativas entre os grupos: **I e II / I e III / I e IV / II e IV / III e IV**, ao nível de 1% de probabilidade a diferença entre os valores dos quatro grupos [Tabela 9]. Nesse caso, é demonstrada com nitidez a melhor resposta do grupo tratado apenas com célula e a melhor resposta de ambos os grupos tratados, comparativamente ao grupo não tratado, grupo **III**.

Foi verificado por grupo (separadamente), se a diferença entre o momento de tensão pré e o máximo foi significativo através do teste não-paramétrico de Wilcoxon, resultados estes demonstrados nas tabelas de 10 a 13 e respectivas figuras, cujas diferenças foram significativas entre os momentos pré e máximo, servindo para confirmar: o bom funcionamento do aparelho medidor de força e a significância dos nossos resultados e a sua interpretação [Tabelas 10, 11, 12,13], (Figuras 10, 11, 12,13).

### 4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA HISTOLOGIA

No presente estudo, foram comparados os grupos I e III:

- Médias aritméticas e desvios padrões; Distribuições de freqüências simples;
- Teste “t” de Student para comparação das médias aritméticas dos vasos capilares;
- Teste não-paramétrico de  $X^2$  (qui-quadrado) para verificar as distribuições de freqüências simples, segundo os Score estabelecidos, quanto a Regeneração, Tecido Adiposo e Inflamação;
- Adotou-se o nível de significância de 5% de probabilidade.
- Foi utilizado o Software, SPSS, versão 13.0 para realização do material.

GRUPO TRATADO COM CÉLULA - I

GRUPO ISQUÊMICO - III

**Tabela 14 – Médias aritméticas, desvios padrões, teste “t” de Student e sua significância, quanto aos vasos capilares, dos grupos I e III.**

Medidas	Grupo I	Grupo III	Teste “t”	Significância
Média aritmética	36,21	27,72	-10,03	(P=0.000)
Desvio Padrão	6,07	3,84		

Verificamos através das médias aritméticas, que houve diferença significativa entre os grupos I e III, com média aritmética mais elevada no grupo I.

**Tabela 15 – Distribuições de freqüências simples, teste não-paramétrico de  $X^2$  (qui-quadrado) e sua significância quanto ao tecido adiposo dos grupos I e III.**

Score	Grupo III	Grupo I	Teste " $X^2$ "	Significância
0	4	7	15,86	(P=0.003)**
1	25	38		
2	13	15		
3	20	15		
4	27	7		
<b>Total</b>	<b>89</b>	<b>82</b>		

**Verificamos diferença significativa ao nível de 1%.**

**Tabela 16 Distribuições de freqüências simples, teste não-paramétrico de  $X^2$  (qui-quadrado) e sua significância quanto à regeneração dos grupos I e III.**

Score	Grupo III	Grupo I	Teste " $X^2$ "	Significância
0	14	1	11,28	(P=0.003)**
1	71	76		
2	4	5		
<b>Total</b>	<b>89</b>	<b>82</b>		

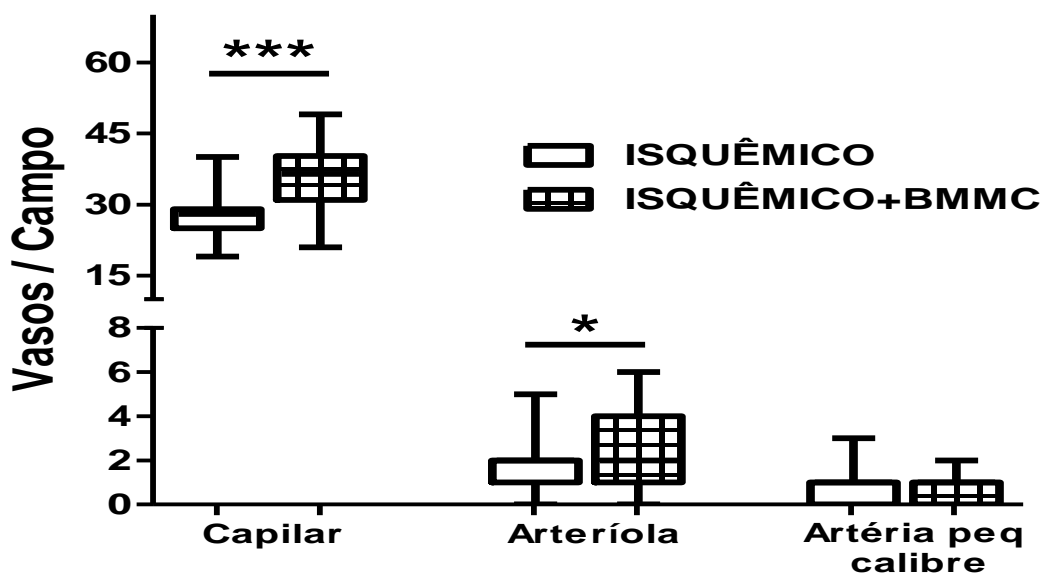
**Verificamos diferença significativa ao nível de 1%.**

**Tabela 17 – Distribuições de freqüências simples, teste não-paramétrico de X<sup>2</sup> (qui-quadrado) e sua significância quanto à inflamação dos grupos I e III.**

Score	Grupo III	Grupo I	Teste “X <sup>2</sup> ”	Significância
0	21	18	<b>0,64</b>	<b>(P=0.726)<sup>n.s</sup></b>
1	64	58		
2	4	6		
<b>Total</b>	<b>89</b>	<b>82</b>		

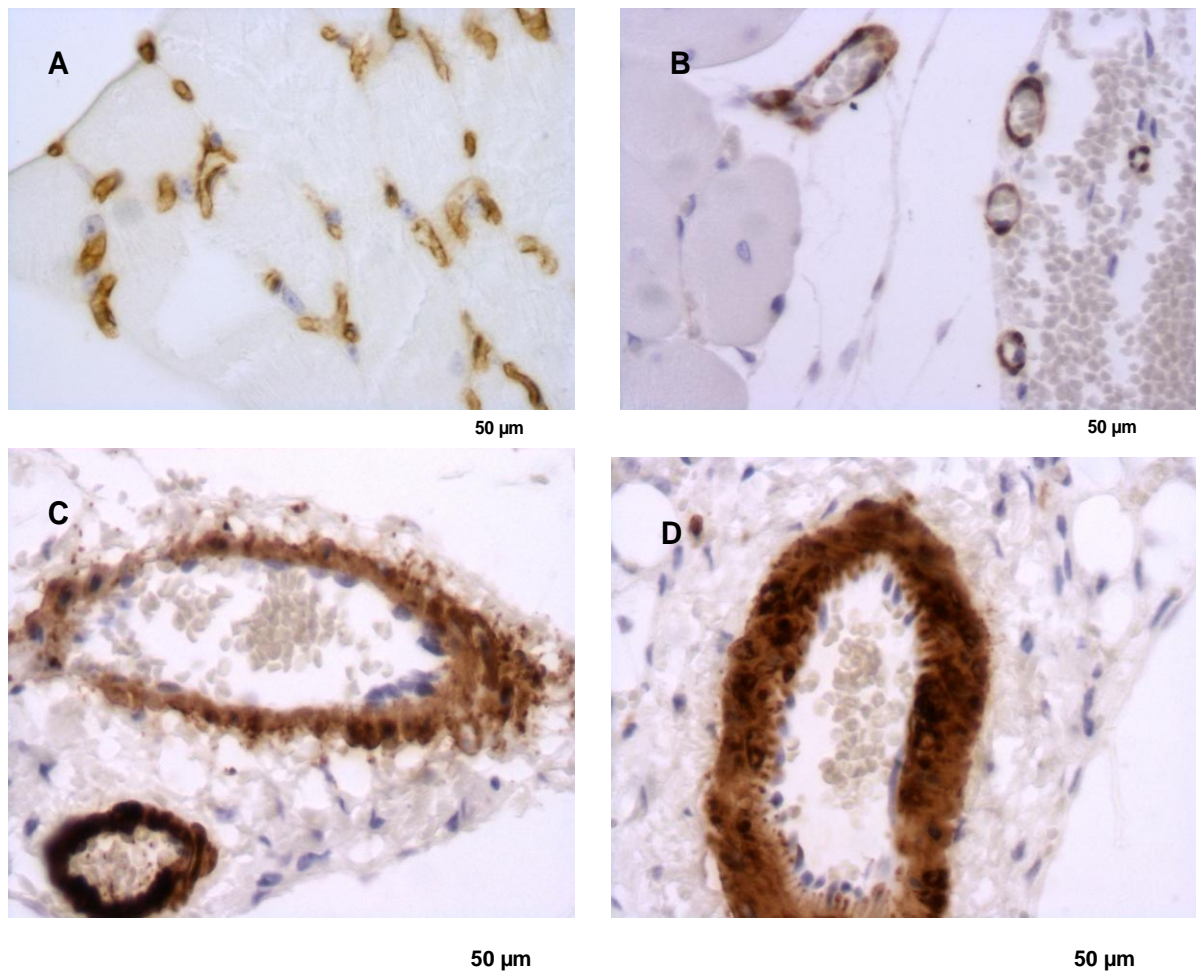
**Não há diferença significativa**

Resumimos em seguida o conjunto dos resultados da análise morfológica comparativa. Da presença dos vasos sanguíneos em grupo isquêmico não tratado e tratado pela injeção das células mononucleares da medula óssea (BMMC), Figura 14. Teste estatístico utilizado: Mann Whitney. \*p<0,05 e \*\*\* p<0, 001.



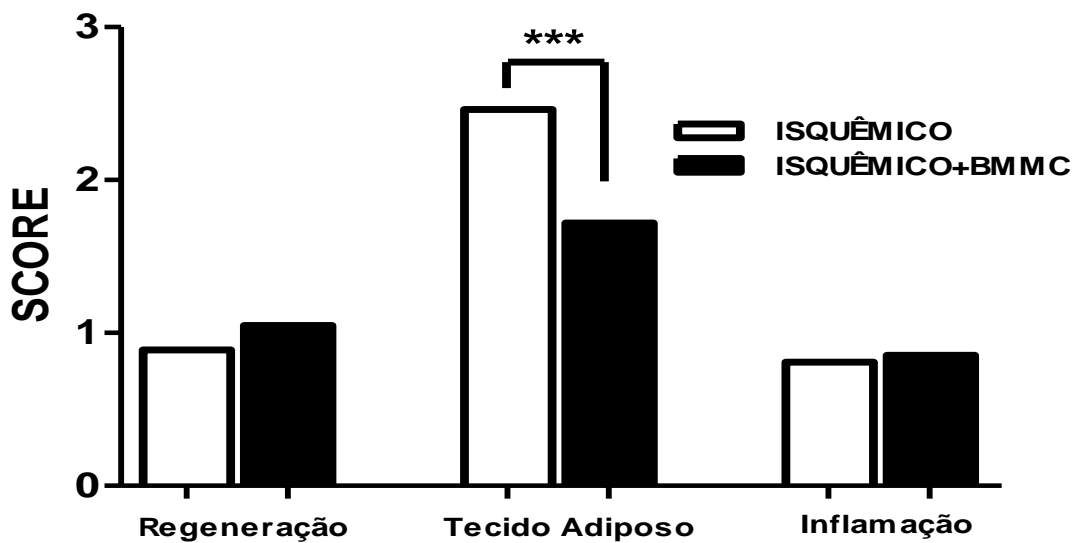
**FIGURA 14** - Vasos sanguíneos em grupo isquêmico (não tratado) e tratado pela injeção das células mononucleares da medula óssea (BMMC). Mann Whitney, \*p<0,05 e \*\*\* p<0, 001.

Quantificação do número de vasos capilares pela histoquímica para lectina Griffonia Simplicifora-1 (BSL-1), arteríolas e artérias de pequeno calibre em cortes histológicos corados pela actina alfa de músculo liso (imunohistoquímica), Valores representados como número absoluto de vasos por campo de 200x (Figura 15), [Sacramento et al., 2009].



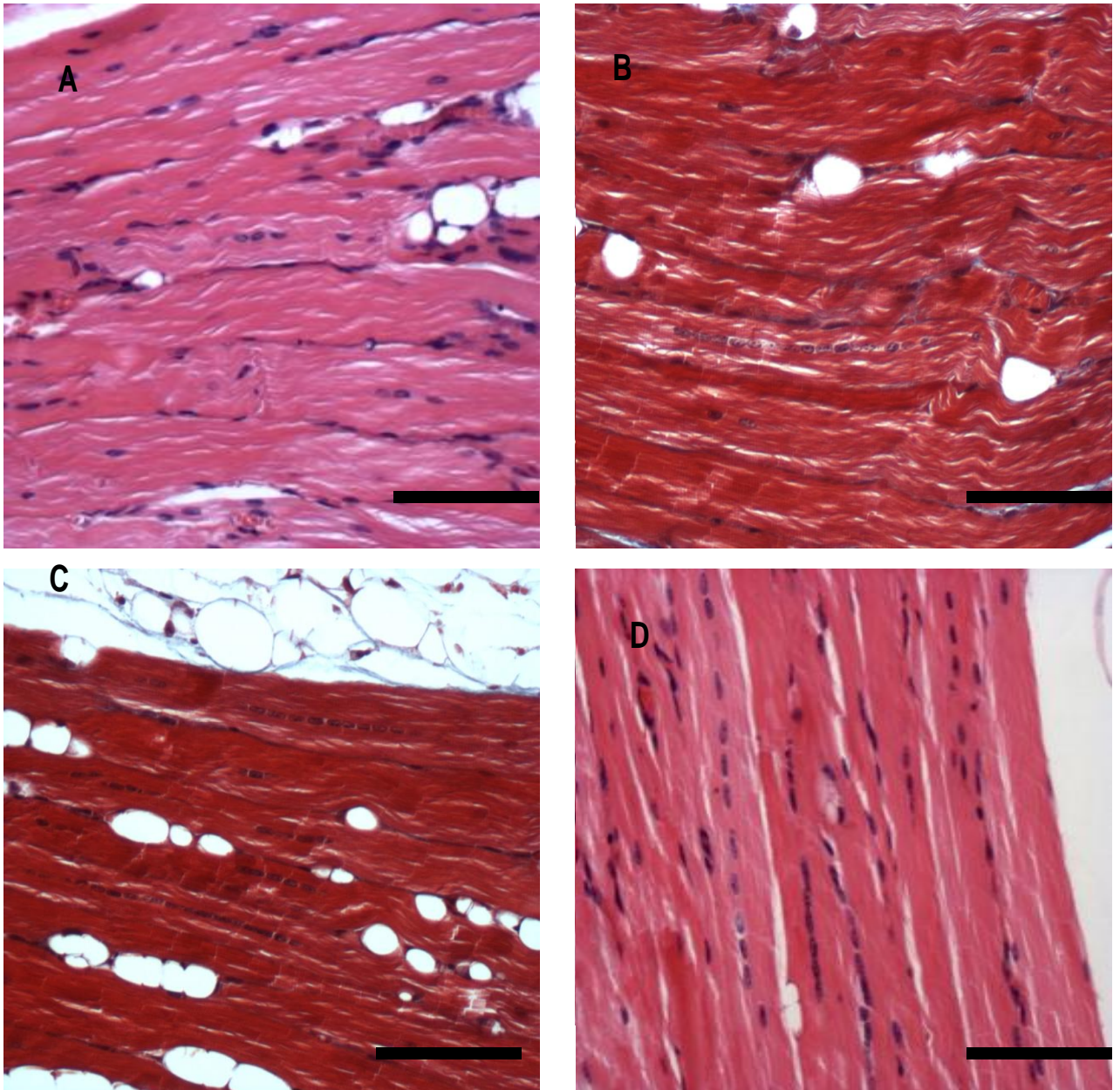
**FIGURA 15** - **A** – Histoquímica para a lectina Griffonia Simplicifora para a identificação de capilares. **B** – Imunohistoquímica para actina alfa de músculo liso. Arteríolas visualizadas. **C & D** – Imunohistoquímica para actina alfa de músculo liso. Artéria de pequeno calibre.

Resumimos, em seguida, o conjunto dos resultados da presença de regeneração, de atrofia muscular com degeneração gordurosa e da presença de inflamação no grupo isquêmico não tratado e no grupo tratado pela injeção das células mononucleares da medula óssea (BMMC). Figuras 16, 17, 18,19.

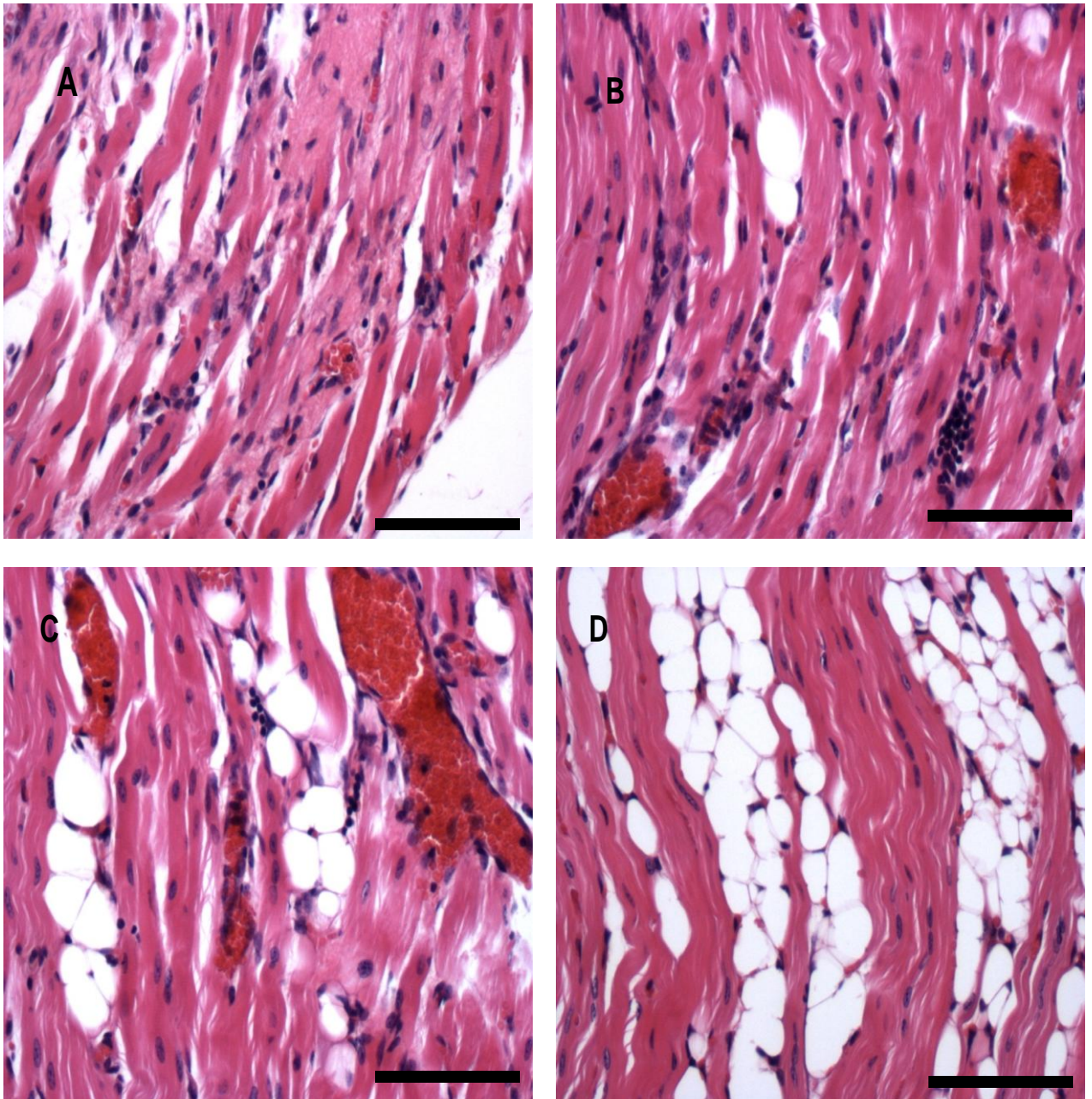


**FIGURA 16** - Distribuição do scores regeneração, de atrofia muscular com degeneração gordurosa e da presença de inflamação no grupo isquêmico não tratado e no grupo tratado pela injeção das células mononucleares da medula óssea. Teste estatístico utilizado: Mann Whitney. \*\*\*  $p < 0,001$ .

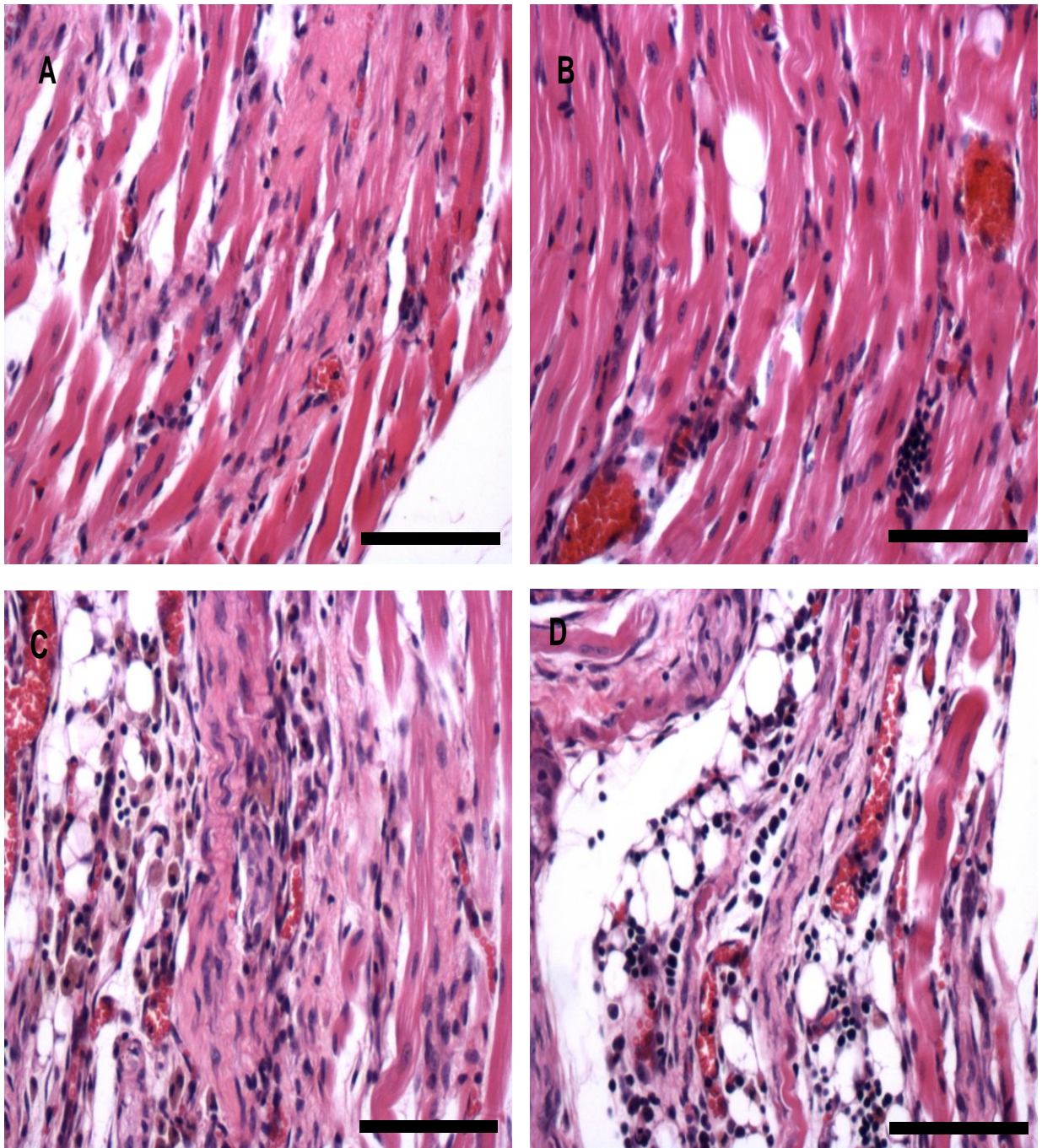




**FIGURA 17-** Cortes histológicas das patas direita dos camundongos, coradas com hematoxilina – eosina, mostrando o grau de regeneração no grupo isquêmico não tratado e no grupo tratado pela injeção das células mononucleares da medula óssea (BMSC). Em (A) - ausência de regeneração; em (B) - presença até 25%; (C) - presença moderada de regeneração de 25% a 50%; em (D) - intensa regeneração, entre 50 a 75%. Barras: 100 $\mu$ m.



**FIGURA 18** - Cortes histológicos das patas direita dos camundongos, coradas com hematoxilina – eosina, mostrando o grau de infiltração gordurosa no grupo isquêmico não tratado e no grupo tratado pela injeção das células mononucleares da medula óssea (BMMC). Em (A) - ausência de infiltração gordurosa; em (B) - presença até 25%; (C) - presença moderada de gordura, de 25% a 50% e em (D) - intensa infiltração, entre 50 a 75%. Barras: 100µm.



**FIGURA 19-** Cortes histológicos das patas direita dos camundongos coradas com hematoxilina eosina mostrando o grau de inflamação. No grupo isquêmico não tratado e no grupo tratado pela injeção das células mononucleares da medula óssea (BMMC). Em (A) ausência de inflamação, em (B) presença até 25% (c) presença moderada de inflamação, de 25% a 50%, intensa inflamação, entre 50 a 75% em (D). Barras: 100 $\mu$ m.

## **AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA**

Em vista dos resultados de análise macroscópica e funcional, a avaliação histológica foi realizada em microscopia nos grupos **I** e **III**, e a extensão do leito vascular foi examinada pela medida do número de capilares, arteríolas e artérias de pequeno calibre, regeneração tecidual e presença de infiltração adiposa. Os tecidos foram obtidos de secções transversais do músculo gastrocnêmio isquêmico, ou seja, da pata direita de cada camundongo. Verificamos diferença estatística ao nível de 1%, quanto à presença dos vasos capilares, quanto à regeneração, presença de tecido adiposo dos grupos **I** e **III**. [Tabelas 14, 15,16 e 17], (Figuras 14 e 16).Foram apresentadas nas figuras 15,17,18 e 19 demonstrações histológicas .

A aplicação da terapia gênica na pata contralateral, usando o GM-CSF, foi desenhada para verificar a hipótese da necessidade de auxiliar a estabilização e maturação dos vasos sanguíneos neo-formados pelo processo de neo-angiogênese. Como discutido em seguida, a angiogênese envolve essencialmente a proliferação das células endoteliais. Para gerar vasos estáveis e plenamente funcionais, é necessário mobilizar os pericitos e as células progenitoras de músculo liso da camada mural. Assim se formam arteríolas, vênulas e vasos de maior calibre com as paredes reforçadas pela camada de músculo liso. As células que participam na sua formação podem originar-se de células mesenquimais residentes, ou de células mobilizadas da circulação. O GM-CSF é um dos fatores que mobilizam as células-progenitoras circulantes auxiliando assim potencialmente a maturação dos vasos. Ele mobiliza também os progenitores endoteliais, iniciando eventualmente a vasculogênese que pode complementar a angiogênese. Entretanto, a análise funcional dos animais submetidos à terapia celular complementada com gênica mostrou que o auxílio do GM-CSF não gerou uma vantagem considerável.

O resultado da análise histológica confirmou esta constatação. Mesmo com a terapia celular simples, sem auxílio da gênica, o aumento do número de capilares foi acompanhado pelo aumento menor (no tempo estudado), porém significativo de aparecimento de arteríolas. Este dado mostra que a mobilização dos progenitores residentes *in situ* foi suficiente e operacional.

A análise morfológica mostrou também uma diminuição considerável da degeneração gordurosa do tecido muscular em animais que receberam a terapia celular. Este dado é relevante, já que a atrofia muscular com degeneração gordurosa é conhecidamente de difícil reparo, e leva o paciente a uma agravação progressiva da sua mobilidade e de força muscular.

## 5. DISCUSSÃO

Um dos aspectos mais desafiadores para o futuro em relação ao tratamento da isquemia crítica de membros inferiores é que ele poderá interferir tanto no prognóstico de sobrevivência como no salvamento dos membros. Um membro revascularizado com sucesso significa redução da dor e melhora da qualidade de vida plenamente, ainda que por tempo limitado, dependendo do estágio da doença. A amputação pode ser uma alternativa para reduzir a dor, porém diminui ou impossibilita, na maioria das vezes, a oportunidade do restabelecimento social e a autonomia individual dos pacientes portadores de DAOP [Norgren et al., 2007; Attanasio e Snell.,2009].

Para avaliar a angiogênese terapêutica, este trabalho utilizou um modelo de isquemia em camundongos machos BALB/c, foi realizada através da ressecção do segmento da artéria femoral da pata direita dos respectivos animais, promovendo a diminuição do fluxo sanguíneo para os tecidos com o objetivo de responder, principalmente, as seguintes questões: se o uso de terapia celular isoladamente e se o uso combinado das terapias gênica e celular podem ser opção de tratamento para isquemia arterial aguda e se essas terapias são eficientes e seguras em modelo experimental. Esse modelo de isquemia severa foi suficiente para análise dos resultados e com isso demonstrou que não ocorreu lesão extrema com necrose total de todas as patas isquemiadas, a tabela e a figura 12 respectivamente, confirmam a presença de contração da musculatura dos camundongos não tratados, a qual foi inferior a ambos os grupos tratados.

Foram utilizados, nesse modelo, o vetor plasmidial (uP-mGM) de expressão com o gene GM-CSF no grupo II, administrado através de injeção intramuscular na pata contralateral, esquerda. O GM-CSF é um fator pleiotrófico que foi utilizado para promover a vasculogênese e maturação dos vasos. O tratamento com células obtidas de camundongos isogênicos foi realizado na pata direita dos grupos I, II. A administração direta de GM-CSF em isquemia de membro tem um efeito terapêutico porque promove a recuperação da massa muscular, força e estrutura pela mobilização de células terapêuticas e aumento do número de vasos [Sacramento et al.,2009]. O efeito do GM-CSF

apareceu mais tarde, com os melhores resultados sendo observados na quarta semana [Sacramento et al.,2009] .

No nosso modelo, analisamos em escala visual por trinta dias, a evolução clínica e suas alterações nos diferentes grupos. Após esse período, a presença e a extensão de necrose, a viabilidade funcional das patas e a massa muscular regenerada foram verificadas através da pesagem e medida da força muscular. As alterações musculares de força foram registradas através da mensuração das tensões pré-estímulo, tensão máxima e tensão delta do músculo gastrocnêmio, verificadas no aparelho medidor de força. Após, os animais foram submetidos ao deslocamento cervical. Os músculos gastrocnêmio e quadríceps direito foram pesados, verificando-se assim a perda ou diminuição da força muscular e a presença e a gravidade da atrofia muscular respectivamente, conseqüências esperadas em resposta à isquemia. A seguir, foram realizados os cortes para o estudo histológico.

Em modelo isquêmico de pata de camundongo Ikenaga verificou que células derivadas da medula óssea induziram angiogenese após injeção intramuscular no período de duas semanas [Ikenaga et al., 2001].Em humanos após quatro semanas os parâmetros : ITB, pressão transcutânea de oxigênio,dor em repouso e caminhada livre de dor estava significativamente melhor no grupo que tratou com células mononucleares da medula óssea [Tateishi- Yuyama et al., 2002] .

O período de quatro semanas foi definido, em nosso modelo, com o objetivo de permitir o restabelecimento fisiológico após a isquemia aguda das patas e também permitir uma observação clara das diferenças entre os grupos isquêmicos tratados e os não tratados.

Neste modelo, observou-se que a terapêutica combinada para membros isquêmicos trouxe benefício (gene GM-CSF e CMMO) e que a aplicação de CMMO, somente, foi mais efetiva do que ambos, simultaneamente. Assim, o uso combinado de ambas, terapia gênica e celular, não apresentou melhores resultados comparativamente ao grupo que utilizou apenas célula, embora, como já dito, a terapia gênica GM-CSF e celular, local e intramuscular, combinadas para isquemia crítica, demonstraram efeito baseado nos parâmetros utilizados, sugerindo o restabelecimento físico e fisiológico das patas, da força muscular, comparando-se ao grupo não tratado, em quatro

semanas. Os grupos tratados confirmaram a eficiência da angiogênese terapêutica, portanto tiveram melhor perfusão nos tecidos isquêmicos que o grupo não tratado.

Afirmamos, portanto, que animais tratados com o gene GM-CSF e CMMO, simultaneamente, e CMMO, em comparação aos isquêmicos não tratados, tiveram menos necrose e menos disfunção das patas, sugerindo que essas terapias podem ser uma alternativa de tratamento para isquemia crítica dos membros inferiores. O uso das CMMO em isquemia crítica dos referidos membros demonstrou uma melhor contração do músculo gastrocnêmio e menos atrofia do mesmo.

Nos últimos anos vários estudos têm sido publicados *in vitro e in vivo* sugerindo o potencial do uso do transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea (TACMMO) para doença arterial periférica de membros inferiores [Asahara et al., 1997,1999 e 2000; Asahara e Isner, 2002; Shi et al., 1998; Buschmann e Schaper, 2000; Carmeliet e Luttun, 2001; Ikenaga et al., 2001; Iba et al., 2002; Tateishi-Yuyama et al, 2002; Al-Khaldi et al., 2003; Saigawa et al., 2004; Reis, 2005; Huang et al., 2007; Emmerich, 2005 ; Araújo et al., 2005; Yoshida, 2005; Kajigushi et al., 2007; Van Huyen et al., 2008; Van Tongeren et al., 2008 ; Sprengers et al., 2008].

Na literatura está dito que obter em humanos esses resultados, aqui apresentados com terapia angiogênica ainda representa uma dificuldade a ser transposta [Kalka e Baumgartner, 2008].

A DAOP representa um problema de saúde que tende a piorar nas próximas décadas devido ao aumento da expectativa de vida. A atenção para esta patologia vai aumentar, seja pelo número de pacientes ou pela complexidade das lesões em termos de sua gravidade e impacto direto devido à natureza sistêmica da doença [Rutherford et al. 1986; Dormandy et al., 1999; Dormandy et al., 2000; Norgren et al., 2007].

A aterosclerose é a principal causa das obstruções que acometem as artérias dos membros inferiores. A semelhança dos demais setores orgânicos atingidos pela aterosclerose e a sua prevalência nos membros inferiores também se correlacionam com fatores de risco, destacando-se como mais influentes o tabagismo, o diabetes, a hipertensão arterial e as dislipidemias [Kannel et al., 1985; Murabito et al., 1997].



É importante destacar que, em idosos, o quadro clínico da DAOP nem sempre é iniciado por claudicação intermitente, mas por gangrena. Outras afecções podem dificultar ou diminuir a deambulação dos pacientes, como as cardiopulmonares, artralgias e outras, sendo eventualmente a principal razão para o não diagnóstico da enfermidade em fase ainda não complicada [Norgren et al., 2007].

Com a expansão recente das técnicas e tecnologias endovasculares, a face da cirurgia para salvamento de membro isquêmico está mudando [Bosch et al ,1999; Norgren et al., 2007]. O número desses procedimentos está aumentando e é estimado que responda de 30% a 70% de todas as intervenções de membros inferiores [Norgren et al., 2007]. Muitas dessas técnicas são utilizadas em conjunto com técnicas abertas tradicionais ou complementares a essas. Neste caso, o procedimento é chamado de cirurgia híbrida. Na área da angioplastia, dispomos hoje de materiais de melhor e menor perfil, aumentando a qualidade do resultado final do tratamento das lesões isquêmicas, seja no segmento aorto-ilíaco, ilíaco-femoral ou infra-patelar [Norgren et al., 2007]. A angioplastia feita com “cutting ballon”, um balão especial ou técnica de crioplastia, que utiliza nitrogênio líquido para o congelamento da placa durante a plastia e a técnica de angioplastia subintimal, desenvolvida para o tratamento de oclusões longas das extremidades, são mais algumas ferramentas com o mesmo objetivo de fraturar as placas de colesterol com menor dano aos tecidos, diminuindo ou evitando a indesejável reestenose da lesão.

A tecnologia do *stent* também teve um grande avanço: *stents* revestidos com tecidos, habitualmente o politetrafluoretileno ou dacron, ou revestidos com drogas para uma suposta ação local do medicamento. Abertura das lesões com laser ou aterectomia mecânica, de maneira similar, estão em uso e estudo simultâneo, sem atingir os resultados esperados [Bosch et al ,1999; Norgren et al., 2007] . Para reduzir a hiperplasia intimal, a braquiterapia vem sendo utilizada com algum sucesso, porém necessita de uma logística significativa e considerações técnicas que fazem dificultar o procedimento [Dormandy et al., 2000 ; Norgren et al., 2007].

. Apesar dos resultados positivos observados, a patência em longo prazo desses procedimentos nos diferentes segmentos são inferiores ou iguais a

cirurgia convencional de “by pass” [Dormandy et al, 2000; Norgren et al, 2007]. Todas essas tecnologias estão em avaliação e contínua evolução, embora não obtendo, até o momento, resultados em longo prazo suficientes ou sem o tempo necessário para essa concretização definitiva.

Nas técnicas cirúrgicas abertas (convencionais), apesar das inovações, não existe nenhum novo conceito de impacto, além dos conhecimentos já preconizados e divulgados que altere o prognóstico desse grupo de pacientes. As novas técnicas tendem a estar relacionadas a técnicas minimamente invasivas nas reconstruções arteriais com o objetivo de reduzir a morbidade, complicações nas feridas e seus efeitos negativos na patência das revascularizações. [Dormandy et al., 2000; Norgren et al. , 2007] .

Existem avanços em ambas as arenas terapêuticas, sejam em técnicas cirúrgicas, como foram apresentadas, além das inovações farmacológicas. Um dos maiores benefícios ocorreu no suporte clínico do tratamento da isquemia crítica, com o uso dos inibidores de adesividade antiplaquetários, que demonstraram diminuir virtualmente a morbidade cardiovascular e obteve seu grande impacto na doença infra-inguinal de membros inferiores [Dormandy et al., 2000; Norgren et al. , 2007] . Inibidores diretos de trombina, atuando mais especificamente na anticoagulação, diminuindo assim as complicações devido ao sangramento verificado com o uso de outros anticoagulantes [Dormandy et al., 2000; Norgren et al. , 2007] .

Com a evolução atual, os especialistas, cirurgiões vasculares, reconhecem que não há uma opção única de melhor tratamento generalizado para toda população de pacientes, mas a necessidade de obter-se uma normatização de medidas com protocolos rígidos através de consensos que se apoiem em resultados dos estudos multicêntricos e na experiência de diferentes grupos mundiais que acompanham os pacientes portadores de DAOP, seja no estágio de claudicação ou de isquemia crítica, valendo lembrar que as informações obtidas de cada indivíduo, seja na anamnese inicial ou através do exame físico, são extremamente relevantes para que se possa oferecer um encaminhamento o mais próximo do ideal e suas devidas orientações.

Os critérios utilizados para contra-indicações aos procedimentos de revascularização são de acordo com dados padronizados por consensos

internacionais [Rutherford et al. ,1986; *Second European Consensus*, 1991] e incluem: artérias de pequeno calibre que não servem como artérias receptoras de um enxerto, muitas vezes mantidas por extensa rede de circulação colateral que, no entanto, não é suficiente para gerar perfusão adequada à determinada área distal do membro inferior. Portanto, a ausência de leito distal e de artéria viável para a anastomose das revascularizações, a deficiência de circulação distal da artéria receptora do deságüe do enxerto, as anatomias complexas muitas vezes envolvendo enxertos arteriais e/ou venosos, dificuldade de acesso percutâneo ou implante de novos enxertos, a presença de doença arterial periférica concomitante, inviabilizando o uso de enxertos arteriais para revascularização, a ausência de enxertos venosos que possam ser utilizados na revascularização, representam condições clínicas desfavoráveis para a realização da revascularização. Áreas isquêmicas, com feridas ou tecido desvitalizado no local ou próximo ao local dos acessos arteriais das artérias doadoras (anastomose proximal) ou artérias receptoras (anastomose distal), dificultam ou impossibilitam a realização do acesso cirúrgico devido ao risco de contaminação ou infecção propriamente dita.

A história natural da isquemia crítica de membros inferiores pode ter uma progressão inexorável para uma amputação, a menos que seja realizado um procedimento que melhore a perfusão do membro. A amputação não é um procedimento benigno, além de estar associada à mortalidade per-operatória de 5 a 10% para amputações abaixo do joelho e 15 a 20% para amputações acima do joelho [ Spichler, 2003 ; Attanasio e Snell., 2009] . O prognóstico do paciente se agrava e cerca de 30% dos sobreviventes vai falecer em dois anos e uma segunda amputação será necessária em um terço desses pacientes [Norgren et al., 2007] .Sendo assim, observa-se nesses pacientes uma qualidade de vida semelhante aos pacientes com câncer em fase terminal [Albers et al., 1992]. Opções de tratamento para isquemia crítica quando a revascularização não é possível são extremamente limitadas. Embora, trabalhos sugiram que a administração parenteral de prostaglandina E1 (PGE-1) ou iloprost por 7 a 28 dias possa ser considerada uma opção em pacientes com membros viáveis em que a revascularização seja um procedimento inviável, particularmente como uma opção, ao invés da amputação, foi demonstrado que em seis meses havia diferença significativa entre os grupos

tratado com PGE-1 e sem tratamento em relação ao “*end point*” amputação [Second European Consensus, 1991] .Esses resultados precisam ser confirmados em outras pesquisas.

Apoiado nos resultados obtidos em nosso trabalho podemos ser otimistas em afirmar que o transplante intramuscular de células tronco da medula óssea e terapia gênica em pacientes com arteriopatia periférica grave, sem possibilidade de tratamento cirúrgico ou percutâneo, poderá viabilizar a melhora clínica destes pacientes, de forma segura, através da diferenciação destas células em células vasculares, pelo processo de angiogênese que é capaz de diminuir a carga isquêmica e de promover a regeneração tecidual.

Os vasos sanguíneos podem ser formados a partir de três processos: angiogênese, vasculogênese e arteriogênese [Jain, 2003]. A vasculogênese é definida como a formação de vasos por progenitores vasculares na fase embrionária (angioblastos). Atualmente, sabe-se que a vasculogênese pode ocorrer também na fase adulta, a partir de células precursoras endoteliais recrutadas via fatores de crescimento. A angiogênese é distinta das demais por formar novos vasos a partir de vasos preexistentes e a arteriogenese, circunscrita à fase adulta, é a responsável especificamente pela remodelagem vascular [Jain, 2003].

A angiogênese pode ser ordenada da seguinte forma: vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar, degradação da membrana basal e da matriz extracelular, migração de células endoteliais, quimiotaxia de células murais, organização com estabilização celular nos vasos de maior calibre e especialização das células murais [Murohara et al.,1998]. Vasos de menor para os de maior calibre diferem, não somente pela sua luz, mas também pelo número de células murais e pelo seu grau de especialização. Essa organização pode ser desfeita por estímulos de injúria tissular, como exemplo, a hipóxia, aumento das forças de cisalhamento ou aumento de radicais livres. As células endoteliais são longas, finas, frágeis e podem ter meia-vida de alguns anos. As junções intercelulares têm importante papel na homeostasia do endotélio pelo fato de inibir por contato a sua migração. Sua sustentação no tecido é feita pelo arcabouço da membrana basal, um ultrafiltrado amorfo da matriz e por uma célula perivascular chamada de pericito [Jain, 2003].

A hipóxia é um evento central no processo de angiogênese, sendo a

capacidade de difusão do O<sub>2</sub> nos tecidos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>. Se o processo de difusão não estiver sendo capaz de manter o funcionamento tecidual, são estimulados fatores de transcrição localmente, com o intuito de melhorar a perfusão. O principal fator estimulado é o fator induzido pela hipóxia (HIF), uma proteína heterodimérica, que funciona induzindo a transcrição de genes responsáveis pela homeostase do O<sub>2</sub> [Murohara et al.,1998 ; Cooke e Losordo , 2002 ] .

O HIF-1 $\alpha$  [Ramirez et al., 2001] é a fração protéica presente no citoplasma. Em condições em que a concentração de O<sub>2</sub> é maior que 25% (normóxia), este se liga ao complexo ubiquitina-proteína Von Hippel Lindau, sendo degradado em menos de 5 minutos pelo complexo proteossômico. Nos casos de hipóxia, O<sub>2</sub> menor que 5%, a proteína HIF-1 $\alpha$  não é mais degradada, sendo complexada a proteína translocadora do receptor de aril hidrocarbono (ARNT). Esse complexo migra até o núcleo se liga à subunidade beta do HIF induzindo a expressão de mais de 60 genes envolvidos no metabolismo celular hipóxico. O fator de crescimento vascular induzido pelo endotélio VEGF, por exemplo, após indução via HIF, tem sua síntese aumentada 30 vezes em minutos [Ramirez et al., 2001]. O óxido nítrico participa na indução da vasodilatação que, principalmente, na presença do VEGF, induzirá a transudação e a formação de uma matriz provisória, facilitando a migração de células endoteliais pelo tecido. Esse aumento de óxido nítrico parece ser estimulado localmente por fatores de crescimento como o VEGF e o fator de crescimento básico derivado de fibroblastos bFGF [Murohara et al.,1998;Cooke e Losordo , 2002 ; Rissanen et al. ,2001] .

O GM-CSF foi o fator escolhido em nosso modelo, pois é sabido que os monócitos têm uma importante ação no remodelamento dos vasos locais e que o GM-CSF inibe a apoptose dessas células e demonstrou regeneração física e fisiológica em modelo de isquemia em camundongo [Sacramento et al.,2009] . É um dos fatores que mobilizam as células-progenitoras circulantes auxiliando assim potencialmente a maturação dos vasos. Ele mobiliza também os progenitores endoteliais, iniciando eventualmente a vasculogênese que pode complementar a angiogênese [Buschmann et al., 2000;Buschmann et al.,2003]. Entretanto, a análise funcional dos animais submetidos à terapia celular complementada com gênica ,em nosso modelo, mostrou que o auxílio do GM-

CSF não gerou uma vantagem considerável. Embora os resultados obtidos na pesagem dos animais com significância estatística para os animais do grupo II comparando aos outros grupos represente uma ação sistêmica do fator de crescimento, o melhor resultado funcional do grupo tratado apenas com células é evidente, e definitivamente melhor do que os grupos II e III .

Ambos os grupos tratados apresentaram melhor resultado em relação ao grupo não tratado. Os efeitos da aplicação subcutânea do GM-CSF na distância máxima de caminhada e ITB no estudo START não demonstraram também efeito terapêutico em estudo duplo cego ,randomizado ,controlado por placebo , em quarenta pacientes com claudicação intermitente severa [Van Royen et al., 2005] .

Existe na literatura um crescente entusiasmo no estudo da angiogênese e seu uso na terapêutica. Múltiplos estudos em animais confirmam a habilidade das células progenitoras em promover angiogênese e determinaram a continuidade em estudos clínicos [Takeshita et al., 1994 ; Asahara et al., 1997 ; Asahara et al., 1999 ; Shi et al., 1998 ; Kamihata et al., 2001 ; Iba et al. , 2002 ; Al-Khalidi et al., 2003 ; Kinnaird et al., 2004].

As evidências que dão suporte à terapia angiogênica com transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea ou do sangue periférico estão aumentando rapidamente devido aos resultados que demonstram melhora no ITB, cicatrização das úlceras e salvamento dos membros. [Tateishi et al. , 2002 ; Huang et al. , 2007 ; Van Tongeren et al. , 2008]. A eficácia do transplante autólogo de células mononucleares em estimular a angiogênese foi pela primeira vez demonstrado em humanos por *Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT)* [Tateishi et al. , 2002]. Nesse estudo, o grupo tratado com CTMMO teve uma melhora significativa nos seguintes parâmetros: ITB, dor em repouso e ausência de dor ao caminhar, em quatro e vinte e quatro semanas, comparado ao outro grupo que recebeu células mononucleares periféricas ou solução salina. Kajigushi avaliou sete pacientes com isquemia de membro de acordo com o protocolo TACT e verificou as respostas encontradas com aumento de CD 34<sup>+</sup> e CD 133<sup>+</sup> mantido elevado por 1 mês [Kajigushi et al., 2007]. Outros autores destacam que a eficácia da terapia com a célula-tronco está relacionada à presença da fração CD 34<sup>+</sup> [Saigawa et al. , 2004] . Todos esses trabalhos ratificam os resultados

apresentados em nosso modelo.

A via ideal de liberação das células progenitoras também tem sido razão de investigação. Resultados igualmente eficientes foram demonstrados na literatura, tanto nas injeções intra – arteriais quanto intramuscular de CMMO em pacientes com DAOP. Van Tongeren e colaboradores demonstraram eficiência nas duas formas de administração em termos de salvamento de membro, aumento do tempo livre de dor ao caminhar, ITB e alívio da dor isquêmica [Van Tongeren et al. , 2008]. O uso de injeção intramuscular de células autólogas MMO para estimular o crescimento vascular é promissor [Yla-Hertuala e Alitalo, 2003].

Alguns autores usaram preferencialmente a via intramuscular para injeção terapêutica [Tsurumi., 1997; Tateishi et al. , 2002; Yla- Hertuala e Alitalo, 2003; Kusumanto.,2006; Kajigushi et al., 2007; Van Tongeren et al. , 2008; Attanasio e Snell.,2009]. Alguns desses citam o ultrassom para localizar o músculo, quando necessário. Existe também o potencial de liberação dos fatores de crescimento ao longo da parede dos vasos usando a imagem. Essa facilidade tem dois aspectos distintos, um que cria certa heterogeneidade nos desenhos dos trabalhos que não definem, por exemplo, se apenas um ou quantos pontos de aplicação devem ser realizados para terapia ou definição de um local específico para tal, e o outro aspecto, é relacionado ao fato de que outra opção é ter como alvo uma área ou algumas áreas em particular, como ao redor de um ponto de oclusão ou de outra forma, somente distal a uma área de oclusão, o que sem dúvida, gera mais um foco de discussão para que se indique uma direção e uma definição precisa desse parâmetro para os trabalhos em humanos [Isner et al., 1996; Tateishi et al. , 2002; Yla- Hertuala e Alitalo, 2003 ; Van Tongeren et al. , 2008].

Quanto maior a variação de terapias, dose, frequência e localização da aplicação, o mais complexo será o estudo e a análise dos resultados. No nosso modelo e na análise dos nossos resultados a aplicação intramuscular em um ponto acima da linha articular do joelho mostrou ser uma via eficiente e segura para ambas as terapias, celular e gênica.

Estudos preliminares de transferência gênica intramuscular utilizando vetor plasmídico de  $phVEGF_{165}$  demonstraram desenvolvimento de circulação colateral e melhora do sintoma de dor [Baumgartner et al., 1998]. Alguns autores estão

utilizando vetores virais para melhorar a eficiência da transferência gênica [Takeshita et al.,1996; Tsurumi et al.,1997; Shah et al.,2000] . As maiores limitações do vetor adenoviral são: a falta de sustentação da expressão (já que o DNA viral não integra ao genoma do hospedeiro), a antigenicidade das proteínas virais e a possível toxicidade em doses altas. Em protocolos humanos, vetores adenovirais têm causado reação inflamatória, formação de anticorpos contra o adenovirus, febre transitória e aumento significativo das transaminases hepáticas [Bobek et al.,2006]. Esses vetores podem ter uma expressão gênica maior, mas o risco de incompatibilidade imunológica são maiores do que o observado com os vetores plasmidiais, os vetores virais são microorganismos e os plasmídios moléculas mais fáceis de serem manipulados [Silva et al, 2008]. O DNA nu liberado diretamente nos tecidos pode induzir a expressão gênica local. Embora a eficiência da taxa de transfecção muscular seja baixa, a expressão transgênica persiste por até vários meses, e sem evidência de replicação ou integração plasmidial. A transfecção de um plasmídio contendo o gene VEGF (phVEGF 165 human plasmid) em músculo ou na parede dos vasos sanguíneos, é seguida pela sua expressão local e aumento dos níveis circulantes de VEGF por pelo menos 15 dias [Isner et al.,1996] . Para aumentar a entrada de DNA na célula foram aplicados vários métodos entre eles a eletroporação [Escoffre et al.,2009] .

Em nosso modelo utilizamos o vetor plasmidial e a eletroporação como veículos para obtermos os efeitos terapêuticos desejados. Uma expressão gênica *in vivo* com nível terapêutico mínimo e suficiente é essencial para terapia gênica. Ao lado do VEGF, FGF e angiopoietina, outros fatores de crescimento estão sendo investigados [Lazarous et al ., 2000; Lederman et al.,2001; Rissanen et al., 2001; Yla - Hertuala et al. , 2003] . Um dos principais problemas encontrados no uso de VEGF é que os vasos formados são instáveis e muito permeáveis (leaks). Os vasos gerados por VEGF são normalmente capilares, enquanto os produzidos por FGF parecem ser mais maduros [Rissanen et al., 2001]. Em nosso modelo o GM-CSF foi utilizado, esperando-se um efeito terapêutico sistêmico, na área de isquemia, como consequência do aumento da sua concentração no sangue periférico, o que não ocorreu. Pelos resultados já apresentamos acreditamos que tivemos um



efeito terapêutico sistêmico, mas não suficiente para ser igual ou superior ao apresentado pelo nosso grupo I, tratado apenas com células.

É fato que todos os trabalhos iniciais em humanos para isquemia crítica de membros foram limitados a pacientes com doença oclusiva avançada, os quais foram excluídos da possibilidade de revascularização dos seus membros ou após o procedimento cirúrgico, não obtiveram êxito satisfatório, realizando então a terapia angiogênica. Esses pacientes que têm doença avançada possivelmente terão potencial terapêutico reduzido de células colhidas de suas medulas, o que não é o mesmo que se dizer sem nenhum potencial, mas representa um desafio em termos de se executar uma estratégia em que células autólogas utilizadas possam ter diferentes potenciais e os pacientes que mais precisam ajuda podem ser os mesmos, os quais, as células progenitoras tenham a menor potência. Makinen, em 2002, não encontrou um resultado diferente entre o grupo tratado com VEGF e o grupo placebo, no que se refere aos “*end points*” amputação e cicatrização de feridas, mas demonstrou incremento da vascularização através da angiografia [Makinen et al., 2002]. Portanto, conforme já relatado, os trabalhos iniciais demonstraram um potencial pró angiogênico nessa população de pacientes. Injeções intramusculares de vetor plasmidial com gene VEGF, especificamente em pacientes com isquemia crítica de membros inferiores e diabetes, demonstraram resultados positivos, mas não significativos em relação à amputação, ITB e cicatrização das feridas [Kusumanto et al. , 2006].

Apesar dos resultados diversificados, principalmente em humanos, é estimulante para nós, cirurgiões vasculares, que novos alvos de pesquisa e de tratamento para isquemia de membros inferiores estejam em desenvolvimento contínuo e, portanto, aperfeiçoando-se. Mecanismos induzidos pela isquemia, sensores metabólicos e reguladores demonstram a indução da expressão VEGF e angiogênese em modelos animais independente da via HIF-1, podendo ser um fator adjuvante no tratamento da doença isquêmica [Arany et al. , 2008]

Em nosso entendimento, a angiogênese terapêutica é uma nova ferramenta no tratamento da isquemia crítica de membros inferiores. Esse fato não veio substituir nenhuma outra ferramenta, mas complementar e contribuir em conjunto com outras técnicas já estabelecidas no presente. Entretanto,

pode-se admitir que já estejamos diante do futuro ou da próxima fronteira, com os resultados verificados neste modelo, na literatura em animais e em estudos clínicos, permitindo afirmar que, a médio e longo prazo, poderá nos reservar surpresas imprevisíveis por ser uma área do conhecimento humano ainda embrionária. Apresenta tópicos ainda a serem resolvidos, como a questão de porque os efeitos pró angiogênicos são tão evidentes nas pesquisas pré-clínicas e não são tão evidentes nos estudos clínicos [Emmerich, 2005]. A interrogação entre terapia gênica ou terapia celular não é produtiva, pois inclusive em nosso modelo não foram encontradas desvantagens no uso conjunto das terapias, pelo contrário, verificamos os efeitos benéficos em relação ao grupo isquêmico não tratado. Com o grupo tratado apenas com célula, a terapia combinada teve um desempenho inferior, mas podemos afirmar que ambos os grupos tratados se beneficiaram do tratamento comparando-se com o grupo isquêmico não tratado.

Outras questões como a seleção dos pacientes com variadas comorbidades, o desenho com protocolo específico para a investigação de um determinado efeito pró angiogênico, a dose a ser aplicada na terapêutica, a via de liberação e escolha do fator de crescimento ou população celular são tópicos que merecem análise mais rigorosa através de estudos randomizados e duplo – cegos. Modelos animais são caracterizados tipicamente por animais com saúde sujeitos ao modelo de isquemia. Animais com diabetes, aterosclerose e stress oxidativo, a resposta endotelial aos fatores angiogênicos poderão ser diferentes, como por exemplo, camundongos diabéticos demonstraram uma revascularização diminuída comparativamente aos camundongos saudáveis, devido a alterações no sistema de regulação angiogênica [Schiekofer et al., 2005]. Em relação à hipercolesterolemia, foi verificada também uma diminuição no crescimento de circulação colateral em camundongos [Van Weel et al., 2006].

Protocolos de tratamento que envolve transfecção *in vivo* de material gênico para terapia de isquemia de membros inferiores envolvem algumas outras questões: Como melhorar essa transfecção? Qual a melhor rota de entrega (*route of delivery*), melhor momento e local da introdução? Qual a melhor relação de massa do vetor com o alvo, também podem ser questionados? Qual é o número ótimo de células tronco ou de plasmídios para

injetar? É seguro estimular a angiogênese por período prolongado? Sabe-se que a expressão gênica é governada pela eficiência da transdução em órgãos alvos e eficiência da expressão desses nos tecidos e duração da expressão [Isner et al.,1996 ; Baumgartner et al.,1998; Emmerich, 2005; Bobek et al. , 2006 ; Huang et al.,2007; Silva et al .,2008].

Outras investigações serão necessárias para otimização dessas terapias e continuar avaliando a eficácia e a segurança delas no tratamento da isquemia crítica de membros inferiores [Emmerich, 2005; Bobek et al. , 2006].

Na década passada, houve uma necessidade de apreciação e entendimento da importância das células progenitoras, CT e bases moleculares da terapia gênica e seus vetores para atuarem na manutenção e integridade dos tecidos. Parece lógico que se pudermos entender a biologia e o envelhecimento determinado pelo tempo e os seus mecanismos naturais para reparação dos tecidos que começam a falhar em determinado momento, haverá uma forma adicional para tratar os pacientes, revertendo alguns dos danos dessas doenças, como é o caso da aterosclerose.

Até o momento, foi demonstrado que tais terapias são factíveis, mas é necessário realizarmos mais protocolos randomizados com número grande de doentes analisados e tendo como parâmetro final (*endpoint*) a preservação do membro, evitando a amputação maior (definida como acima do tornozelo) e a qualidade de vida dos pacientes.

A angiogênese terapêutica é um tratamento viável para pacientes com isquemia crítica de membros inferiores conforme demonstrado na literatura e neste modelo que com os resultados obtidos, sustenta essa assertiva e estimula para futuras pesquisas.

O tratamento angiogênico emerge como uma terapia proeminente para tratamento da doença isquêmica crítica de membros inferiores, atuando como formador de condutos, “by pass” endógenos, em torno de artérias periféricas ocluídas e distais a estas, dando a oportunidade, acredita-se, de mudar finalmente a história natural dessa doença.

## CONCLUSÕES

- No modelo deste estudo, o uso combinado de ambas as terapias, gene GM-CSF e CMMO para membros isquêmicos trouxeram benefícios. Os parâmetros utilizados para avaliação indicam que a aplicação de CMMO, sozinha, é mais efetiva do que ambas, simultaneamente.
- Neste modelo, a terapia angiogênica obteve melhores resultados nos parâmetros utilizados que o grupo não tratado, demonstrando segurança e eficiência da terapia em modelo experimental de isquemia arterial periférica de membros inferiores.
- O observado em animais manteve a expectativa na utilização da angiogênese terapêutica considerando-se, então, como a esperança em humanos nos casos de doença vascular periférica extensa grave e para aqueles com leito vascular insuficiente, com impossibilidade cirúrgica.

## Referências Bibliográficas

Albers M, Fratezi AC, De Luccia N. (1992) Assessment of quality of life of patients with severe ischemia as a result of infrainguinal arterial occlusive disease . *J Vasc Surg*; 16:54-59.

Al-Khaldi A, Al-Sabti H, Galipeau J, Lachapelle K. (2003) Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann Thorac Surg*;75(1): p. 204-9.

Arany Z, Foo SY, Ma Y, et al. (2008) HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 . *Nature*; 451:1008-1012.

Araújo JD, Araújo Filho JD, Ciorlin E, et al.(2005) A terapia celular no tratamento da isquemia crítica de membros inferiores .*J Vasc Br* ; 4:357-65 .

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Zee R V D Z, Li L, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*; 275(5302) p. 964-7.

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*; 85(3): p. 221-8.

Asahara T, Kalka C, Isner J M. (2000) Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther*, 7(6): p. 451-7.

Asahara T, Isner JM. (2002) Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematother Stem Cell Res* ; 11(2): p. 171-8.

Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, Grünwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher A M. (2002) Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*; 106(24): p. 3009-17.

Attanasio S, Snell J (2009) Therapeutic Angiogenesis in the Management of Critical Limb Ischemia. *Cardiology in Review*; 17:115-120.

Balduino A, Hurtado SP, Frazão P, Takiya CM, Alves LM, Nasciutti LE, El Cheikh MC, Borojevic R. (2005) Bone marrow subendosteal environment harbours functionally distinct haemosupportive stromal cell populations. *Cell and Tissue Research* 319: 255-266.

Baumgartner IMD, et al. (1998) Constitutive Expression of phVEGF<sub>165</sub> after intramuscular Gene Transfer Promotes Collateral Vessel Development in Patients with Critical Limb Ischemia. [Report]. *Circulation*; 97(12):1114-1123.

Blauw G J, Lagaay A M , Smelt A H, Westendorp R G. (1997) Stroke, statins and cholesterol: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled, double-blind trials with HMG-CoA reductase inhibitors. *Stroke*; 28:946-950.

Bobek V, Taltynov O, Pinterova D, Kolostova K.(2006)Gene Therapy of the ischemic lower limb-Therapeutic angiogenesis. *Vascul Pharmacol*; 44(6):395-405.

Bosch J, Van der Graaf Y, Hunink M. (1999) Health-related quality of life after angioplasty and stent placement in patients with iliac artery occlusive disease: results of a randomized controlled clinical trial. The Dutch Iliac Stent Trial Study Group. *Circulation*, 99: p. 3155-3160.

Buschmann IR, Schaper W. (2000) The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol*; 190(3): 338-42.

Buschmann I R, Busch HJ, Mies G, Hossmann KA. (2003) Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via granulocyte-macrophage – colony stimulating factor. *Circulation* ; 108:610-615.

Carmeliet P, Luttun A. (2001). The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in therapeutic angiogenesis. *Thromb Haemost*; 86(1): p. 289-97.

Cooke JP, Losordo D W. (2002) Nitric Oxide and Angiogenesis. *Circulation*; 105:2133-2135.

Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*. 2001; 414:92-7.

Dormandy JA, Heeck L, Vig S. (1999) Predictors of early disease in the lower limbs. *Semin Vasc Surg*; 12:109-117

Dormandy JA, Rutheford RB. (2000) Management of peripheral arterial disease TASC Working Group. *J Vasc Surg*; 31(1 Pt 2): S1-S296.

Emmerich J. (2005) Current state and perspective on medical treatment of critical leg ischemia: gene and cell therapy .*Low Extrem Wounds*; 4:234-241.

Escoffre JM, Portet T, Wasungu L, Teissie´J, Dean D, Rols MP. (2009) what is (Still not) known of the Mechanism by Which Electroporation Mediates Gene Transfer and Expression in Cells and Tissues. *Mol Biotechnol*; 41:286– 295.

Folkman J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*; 285(21):1182-6.

Grines CL, Watkins MW, Helmer G, Penny W , Brinker J, Marmur JD, West A, Rade JJ, Marrott P, Hammond HK, Engler R L. (2002) ,Angiogenic Gene Therapy (AGENT) Trial in Patients With Stable Angina Pectoris. [Report]. *Circulation*, 105(11): 1291-1297.

Hamano K, Nishida M, Hirata K, Mikamo , Li TS, Harada M, Miura T, Matsuzaki M, Esato K. (2001) Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ J*; 65(9): p. 845-7.

Hebel and Rudolf. (1976) Anatomy of the laboratory rat.

Huang P, Yang X, Li S, et al. (2007) Randomized comparison of G-CSF mobilized peripheral blood mononuclear cells versus bone marrow – mononuclear cells for the treatment of patients with lower limb arteriosclerosis obliterans. *Thromb Hemost*; 98:1335-1342.

Iba O, Matsubara H , Nozawa Y, Fujiyama S, Amano K , Mori Y, Kojima H, Iwasaka T. (2002) Angiogenesis by implantation of Peripheral Blood Mononuclear Cells and Platelets Into Ischemic Limbs . *Circulation*; 106:2019.

Ikenaga S D, Hamano K, Nishida M, Kobayashi T, Li TS, Kobayashi S, Matsuzaki M, Zempo N, Esato K. (2001) Autologous bone marrow implantation induced angiogenesis and improved deteriorated exercise capacity in a rat ischemic hind limb model. *J Surg Res*, 96(2): p. 277-83.

Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Walsh K, Symes J F. (1996) Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF<sub>165</sub> in patient with ischemic limb. [Report] . *Lancet*, 348(9024): 370-374.

Jackson KA, Susan MM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Mark W, Majesky , Entman ML , Michael LH, Hirschi KK , Goodell MA . (2001) Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*; 107(11): p. 1395-402.

Jain RK. (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*; 9:685-93.



Kajigushi M, Kondo T, Izawa H, et al. (2007) Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patient with critical limb ischemia .*Cir J* ; 71:196-201 .

Kalka C. (2000) VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg*; 70(3): p. 829-34.

Kalka C, Baumgartner I . (2008) Gene and stem cell therapy in peripheral arterial occlusive disease *Vasc Med*; 13: 157-172.

Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, Masaki H, Mori Y, Iba O, Tateishi E, Kosaki A, Shintani S, Murohara T, Imaizumi T, Iwasaka T. (2001) Implantation of Bone Marrow Mononuclear Cells into Ischemic Myocardium enhances Collateral Perfusion and Regional Function via side supply of angioblasts, Angiogenic ligands, and Cytokines. *Circulation*; 104(9): p. 1046-52.

Kannel W B, McGee DL. (1985) Update on some epidemiological features of intermittent claudication: the Framingham Study. *J Am Geriatr Soc*; 33:13-18.

Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. (2004) Marrow-Derived Stromal Cells Express Genes Encoding a Broad Spectrum of Arteriogenic Cytokines and Promote In Vitro and In Vivo Arteriogenesis Through Paracrine Mechanisms . *Circ Res*; 94:678-685.

Kucia M, Wysoczynski M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. (2007) Identification of very small embryonic like stem cells in bone marrow. *Cell Tissue Res*. Sep 9 ; [Epub ahead of print].

Kusumanto YH, Van W V, Mulder NH, Smit AJ, Dungen VD, Hooymans JMM, Sluiter WJ, Tio RA, Quax PHA, Gans ROB, Dullaart RPF, Hospers GAP. (2006) Treatment with Intramuscular Vascular Endothelial Growth Factor Gene Compared with Placebo for Patients with Diabetes Mellitus and Critical Limb Ischemia: a Double-Blind Randomized trial .*Hum Gene Ther*; 17:683-691.

Lazarous DF, Unger EF, Epstein SE, Stine A, Arevalo JL, Chew EY, Quyyumi AA. (2000) Basic fibroblast growth factor in patients with intermittent claudication: results of a phase I trial. *J Am Coll Cardiol*; 36: 1239 –1244.

Lederman RJ , Tenaglia A N, Anderson D, Hermiller JB , Rocha-Singh K, Mendelsohn FO, Hiatt WR, Moon T, Whitehouse MJ, Annex BH. (2001) Design of the Therapeutic Angiogenesis with Recombinant Fibroblast Growth Factor-2 for Intermittent Claudication (TRAFFIC) Trial. *AJC*; 88: p. 192-195.

Losordo DW, Vale PR, Isner JM, (1999) Gene Therapy for Myocardial Angiogenesis: Initial Clinical Results with Direct Injection of phVEGF<sub>165</sub> as Sole Therapy for Myocardial Ischemia. [Abstract]. *Journal of Vascular & Interventional Radiology*; 10(6): 838-839.

Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, Milliken CE, Fortuin FD, Cummings N, Schatz RA, Asahara T, Isner JM , Kuntz RE . (2002) Phase 1/2 Placebo-Controlled, Double-Blind, Dose-Escalating Trial of Myocardial Vascular Endothelial Growth Factor 2 Gene Transfer by Catheter Delivery in Patients With Chronic Myocardial Ischemia. [Report]. *Circulation*; 105(17): 2012-2018.

Makinen K, Manninen H, Hedman M, et al. (2002) Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol Ther*; 6:127-133.

Martin M J , Hulley S B, Browner W S, Kuller LH, Wentworth D. (1986) Serum cholesterol, blood pressure, and mortality: implications from a cohort of 361.662 men. *Lancet*; 2:933-936.

Menasche P, Hagege AA, Scorsin N, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. (2001) Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*; 357: p. 279-280.

Murabito JM, D'agostinho RB, Silbershatz H, Wilson WF. (1997) Intermittent claudication: a risk profile from the Framingham heart study. *Circulation*; 96:44-49.

Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM. (1998) Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest*; 1; 101(11): 2567-78.

Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler NR, Harris KA, Fowlkes FG. (2007) TASC for the management of peripheral arterial disease –(TASC II). *J Vasc Surg*; Jan; 45( Suppl. S): S5-67.

Perin EC, Dohmann HFR, Borojevic R, Silva SA, Sousa ALS, Mesquita CT, Rossi MDI, Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJF, MD Silva GV, Belém L, Vivacqua R, Rangel FOD, Esporcatte R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JAR, Mesquita ET, Willerson JT. (2003) Transendocardial, Autologous Bone Marrow Cell Transplantation for Severe, Chronic Ischemic Heart Failure. *Circulation*; 107(18): p. 2294-302.

Ramirez-Bergeron DL, Simon MC. (2001) Hypoxia - inducible factor and the development of stem cells of the cardiovascular system. *Stem Cells*; 19:279-86.

Reis PEO. (2005) Bone marrow stem cells and their role in angiogenesis. *J Vasc Br.*; 4: 366-70.

Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 2001; 98:2615-25.

Rissanen TT, Vajanto I, Yla-Herttuala S. (2001) Gene therapy for therapeutic angiogenesis in critically ischemic lower limb - on the way to the clinic. *Eur J Clin Invest*; 31(8):649-50.

Rutherford RB, Flanigan PD, Gupta SK, et al. (1986) Suggested standards for reports dealing with lower extremity ischemia. *J Vasc Surg*; 4:80

Sacramento CB, Cantagalli DV, Grings M, Carvalho LP, Silva JCCB, Beutel A, Bergamashi CT, Junior RRC, Moraes JZ, Takiya CM, Samoto VY, Borojevic R, Silva FH, Nardi NB, Dohmann HF, Junior HS, Valero VB, Han SW. (2009) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene based therapy for acute limb ischemia in a mouse model. *J Gene Med*; 11:345-353.

Saigawa T, Kato K, Ozawa T, et al. (2004) Clinical application of bone marrow implantation in patients with arteriosclerosis obliterans, and the association between efficacy and the number of implanted bone marrow cells. *Circ J*; 68: 1189 -1193.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis. (1989) Molecular cloning. New York, Cold Spring Harbor *Lab. Press*; 2 Ed: vol 3.

Sarkar N, Rück A, Källner G, Y-Hassan S, Blomberg P, Islam KB, Lindblom JVDLD, Nygren AT, Lind B, Brodin LA, Drvota V, Sylvén C. (2001) Effects of intramyocardial injection of phVEGF-A<sub>165</sub> as sole therapy in patients with refractory coronary artery disease - 12-month follow-up: Angiogenic gene therapy. [Article] *Journal of Internal Medicine*; 250(5): 373-381.

Schiekofer S, Galasso G, Sato K, Kraus BJ, Walsh K. (2005) Impaired revascularization in a mouse model of type 2 diabetes is associated with dysregulation of a complex angiogenic-regulatory network. *Arterioscler Thromb Vasc*; 25:1603-1609.

Second European consensus. (1991) Second European consensus document on chronic critical leg ischemia. *Circulation*; 84:1-26.

Shah PB, Lotun K, Losordo DW. (2000) Cardiovascular gene therapy. In: Templeton NS. Gene and cell therapy. New York, Marcel Dekker. p707-719.

Shi Q, Rafii S, Hong De Wu M, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MAS, Storb RF, Hammond WP. (1998) Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*; 92(2): p. 362-7.

Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma TMD, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. (2001) Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*; 103(23): p. 2776-9.

Silva JC, Moraes MR, Han SW. (2004) Doença aterosclerótica generalizada e aterosclerose da ciência experimental à abordagem clínica e à terapia celular. In: Sitrângelo Jr C, Kauffman P, editores. *Doença aterosclerótica Periférica*. Volume 1. São Paulo: BBS Editora; p.29-50

Silva JC, Chester BS. (2008) Princípios da Terapia Gênica para Isquemia Crônica Crítica dos Membros Volume I. *Cirurgia Vascular* : Revinter Editora; p.488-498 .

Spichler D . (2003) Amputações maiores de membros inferiores no município do Rio de Janeiro, por doença arterial periférica e *diabetes mellitus* : incidência, mortalidade hospitalar e tardia. Período 1990-2000. Tese de Doutorado; UNIFESP. X iii 136f.

Sprengers R, Lips D, Moll F, et al. (2008) Progenitor cell therapy in patients with critical limb ischemia without surgical options. *Ann Surg*; 247:411-420

Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schümichen C, Nienaber CA, Freund F, Steinhoff G. (2003) Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*, 361(9351): p. 45-6.

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wener P. (2002) Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*; 106(15): p. 1913-8.

Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. (1994) Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*; 93(2): 662-70.

Takeshita S, Weir L, Chen D, Zheng LP, Riessen R, Bauters C, Symes JF, Ferrara N, Isner JM. (1996) Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hindlimb ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*; 227(2):628-35.

Takeshita S, Isshiki T, Mori H, Tanaka E, Eto K, Miyazawa Y, Tanaka A, Chinozaki Y, Hyodo K, Ando M, et al. (1997) Use of synchrotron radiation microangiography to assess development of small collateral arteries in a rat model of hind limb ischemia. *Circulation*; 95:805-808.

Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T. (2002) Therapeutic Angiogenesis for patients with limb Ischemia by autologous transplantation of bone marrow cell: a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet*; 360: p. 427-435.

Tsurumi Y, Kearney M, Chen D, Silver M, Takeshita S, Yang J, Symes JF, Isner JM. (1997) Treatment of acute limb ischemia by intramuscular injection of vascular endothelial growth factor gene. *Circulation*; 96(9 Suppl): II-382-8.

Van Huyen J, Smadja D, Bruneval P, et al. (2008) Bone marrow –derived mononuclear cell therapy induces distal angiogenesis after local injection in critical leg ischemia. *Modern Pathol*; 21:837-846.

Van Royen N, Piek JJ, Legemate DA, Schaper W, Oskam J, Ataveser B, et al. (2005) 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*; 112:1040-1046.

Van Tongeren RB, Hamming JF, Fibbe WE, et al. (2008) Intramuscular or combined intramuscular /intra-arterial administration of bone marrow mononuclear cells: a clinical trial in patients with advanced limb ischemia. *J Cardiovasc Surg*; 49:51-58.

Van Weel V, de Vries M, Voshol PJ, et al. (2006) Hypercholesterolemia reduces collateral artery growth more dominantly than hyperglycemia or insulin resistance in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 26:1383-1390.

Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and oportunities. *Science*. 2000; 287:1442-6.

Ylä-Herttuala S, Alitalo K. (2003) Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med*; 9(6): 694 -701.

Yoshida WB. (2005) Angiogênese, arteriogênese e vasculogênese: tratamento do futuro para isquemia crítica de membros? *J Vasc Br*, 4 (4): 316 - 8.

# 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](#)