

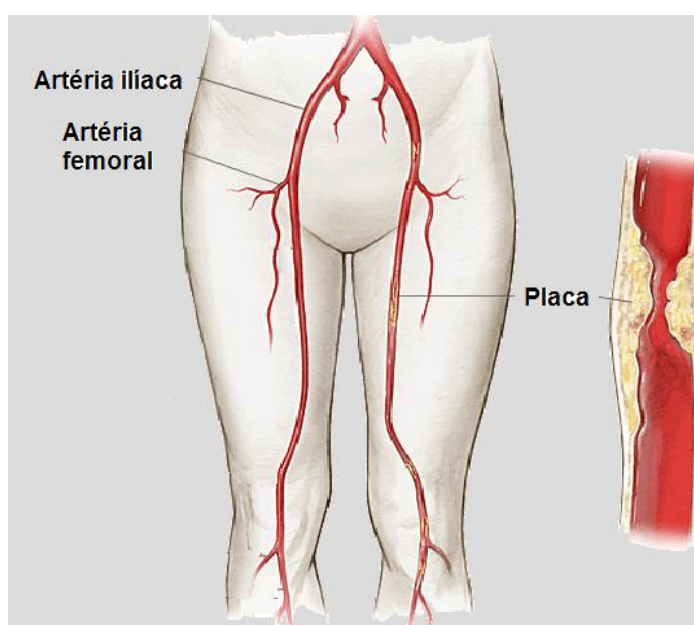
PARTICIPAÇÃO DAS SELECTINAS NAS INTERAÇÕES ENTRE CÉLULAS  
ANGIOGÊNICAS DA MEDULA ÓSSEA E ENDOTÉLIO DE MÚSCULOS  
ISQUÊMICOS DE MEMBROS INFERIORES EM MODELO MURINO

## **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença arterial periférica

A doença arterial periférica (DAP) é caracterizada pela progressiva obstrução do fluxo sanguíneo arterial e pode ser provocada por ateroma, formação de trombo local ou embolização nos membros. O desenvolvimento dessa doença nos membros inferiores é caracterizado pelo estreitamento e pela oclusão dos vasos arteriais (Figura 1), o que provoca redução da perfusão distal, e também por mecanismos locais de compensação, entre os quais o crescimento de novos capilares e o desenvolvimento de vasos colaterais (ARONOW, 2004; CASSAR E BACHOO; 2006; MUKHERJEE E EAGLE, 2010).



**FIGURA 1: Desenho ilustrativo da oclusão de um segmento arterial de membro inferior.** A DAP se inicia com a obstrução do fluxo sanguíneo arterial nos membros inferiores. Muitas vezes, essa obstrução se deve à formação de uma placa aterosclerótica nas artérias dos membros inferiores. Figura adaptada de: < <http://uvahealth.com/services/vascular-center/treatment/peripheral-arterial-disease> >.

As projeções epidemiológicas para a DAP indicam uma prevalência de 15% a 20% em indivíduos com mais de 70 anos de idade, com uma ocorrência estimada de 500 a 1000 novos casos por um milhão de habitantes a cada ano na Europa e na América do Norte (NORGREN, 2007; AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2010). Alguns estudos epidemiológicos para a DAP realizados no Brasil indicam uma prevalência de 2,5% em indivíduos com idade superior a 65 anos de idade na cidade de Bambui no estado de Minas Gerais (PASSOS *et al.*, 2001) e uma prevalência de 36,7% em indivíduos com idade superior a 75 anos na cidade de São Paulo (MAKDISSE *et al.*, 2007).

Além disso, a prevalência da DAP é mais elevada (cerca de 20-30%) entre a população que apresenta fatores de risco, tais como diabetes mellitus, hipertensão, tabagismo e/ou dislipidemia. Geralmente, esses pacientes apresentam comorbidades como, por exemplo, a doença coronariana ou outras doenças cardiovasculares, o que aumenta a mortalidade nesse grupo de indivíduos (MURABITO, 2003; ARONOW, 2004).

A isquemia presente na DAP pode ser parcial ou total. É parcial quando o fluxo arterial é capaz de manter a viabilidade celular, porém com risco de evoluir para morte celular, e total quando o fluxo arterial se torna insuficiente para manter a integridade tecidual. A isquemia aguda de membro é caracterizada por qualquer decréscimo agudo ou piora da perfusão do membro, o que provoca potencial ameaça à integridade da extremidade. Já a isquemia crônica de membro ocorre quando há dor durante o exercício físico (claudicação intermitente) e alívio no repouso. Esse tipo pode progredir para a isquemia crônica crítica de membro, caso em que a estenose ou a oclusão arterial prejudica o fluxo sanguíneo de tal forma que os mecanismos compensatórios, como a formação de vasos colaterais, não podem suprir as exigências nutritivas do membro, e os pacientes apresentam, portanto, forte e intensa dor em repouso, úlceras e/ou gangrena (BAPTISTA, 2004; ARONOW, 2004).

Os indivíduos que pertencem ao grupo de risco são aconselhados a adotar um comportamento preventivo (com o controle da glicemia, do fumo (não fumar),

entre outros). Entretanto, com o eventual surgimento da doença, segue-se à utilização de terapias antiplaquetárias, à administração de fármaco antitrombótico e/ou à revascularização cirúrgica. No entanto, no caso de pacientes com isquemia crônica crítica, estima-se que em 20% a 30% dos casos não há a possibilidade do tratamento de revascularização e, quando a terapia farmacológica ou as técnicas vasculares cirúrgicas não podem ser realizadas ou são ineficazes, cerca de 40% dos pacientes com DAP são encaminhados para a amputação do membro afetado. Entre estes, 20% podem morrer antes mesmo da cirurgia (SINGH *et al.*, 1996; NIELS, 2001; NORGREN, 2007). Dessa forma, o estudo e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para promover a revascularização reparadora da musculatura isquêmica são de grande importância.

### **1.1.1 Modelos experimentais de isquemia de membros posteriores**

O avanço das pesquisas científicas e o desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas dependem do desenvolvimento de estratégias que precisam ser testadas adequadamente em modelos animais de modo a validar seus potenciais efeitos antes de sua aplicação clínica (MADEDDU *et al.*, 2006).

Existem atualmente vários modelos animais que foram desenvolvidos para o estudo da doença arterial periférica. Esses estudos têm utilizado modelos animais de isquemia de membros inferiores para delinear os múltiplos fatores que influenciam na resposta dos tecidos à isquemia e, em especial, na angiogênese. Em geral, os modelos em grandes animais, como coelhos, oferecem a facilidade de identificação precisa dos vasos dos membros inferiores, bem como uma série de medidas do fluxo sanguíneo. Por outro lado, os modelos desenvolvidos em pequenos animais, como camundongos e ratos, oferecem a disponibilidade de obtenção de animais isogênicos, além de ferramentas para a análise genética de alterações na expressão gênica e protéica (SHIREMAN & QUINONES, 2005; MADEDDU *et al.*, 2006).

Nos modelos experimentais, o nível de isquemia depende, principalmente, da extensão da oclusão da artéria e da capacidade inter- e intra-espécies do

desenvolvimento de capilares e/ou vasos colaterais (MADEDDU *et al.*, 2006). O modelo de excisão completa da artéria femoral e de seus ramos laterais, por exemplo, foi originalmente desenvolvido em coelhos (COUFFINHAL *et al.*, 1998). Atualmente, muitos estudos têm utilizado este modelo a partir da oclusão arterial em camundongos. Seu uso inclui variações que vão desde a simples ligadura da artéria femoral até a excisão extensa do conjunto artéria femoral, veia e de um ou ambos os membros posteriores. O modelo de oclusão unilateral, por exemplo, permite o uso do membro contra-lateral como controle e o acompanhamento e caracterização da recuperação endógena do fluxo sanguíneo no membro afetado (JACOBI *et al.*, 2004).

Tem-se verificado que as respostas nos músculos frente à isquemia no membro inferior são diferentes em regiões anatomicamente distintas. Em áreas de isquemia severa, geralmente abaixo do joelho, ocorre necrose dos músculos, que é acompanhada por um intenso processo inflamatório e regeneração muscular. A arteriogênese ocorre predominantemente em regiões proximais à oclusão do vaso (SHIREMAN, 2007; SCHOLZ, 2003). Além disso, a angiogênese é induzida, principalmente pela hipóxia, ocorrendo portanto o aumento da densidade capilar em áreas de isquemia (TANG *et al.*; 2005).

A regeneração do músculo ocorre a partir do exterior do feixe muscular para as regiões internas, e isso se dá mediante a formação de novos vasos sanguíneos. Assim, a angiogênese é fundamental para que ocorra a recuperação da perfusão no membro afetado e conseqüentemente, a regeneração muscular. Algum impedimento no processo de formação de novos vasos sanguíneos pode levar, portanto, a uma regeneração muscular alterada e o agravamento do quadro de isquemia (SCHOLZ, 2003).

### **1.2 Angiogênese terapêutica**

A angiogênese é um processo crítico para o reparo de lesões teciduais e é importante para conter a isquemia tecidual (HERSHEY *et al.*, 2001). No caso da DAP, por exemplo, a isquemia tecidual ativa mecanismos fisiológicos na tentativa de

promover a revascularização do membro afetado. Entretanto, evidências clínicas e experimentais indicam que essa revascularização fisiológica do indivíduo com DAP é insuficiente para alcançar a recuperação total do membro afetado. Dessa maneira, a indução da neovascularização no membro isquêmico tornou-se alvo de estudos para o desenvolvimento de nova estratégia terapêutica para a DAP (MADEDDU, 2005; BURT, 2008).

Essa terapia é genericamente denominada de “angiogênese terapêutica” e tem como objetivo final a recuperação do membro afetado através da estimulação da revascularização desse membro (YOSHIDA, 2005). Atualmente, esses estudos têm sido direcionados para a administração de fatores de crescimento (como por exemplo, de fator de crescimento do endotélio vascular, VEGF, e de fator de crescimento de fibroblastos, FGF), para a terapia gênica (como por exemplo, a utilização de vetores virais que carregam genes que expressam VEGFs) e para a terapia celular (como por exemplo, mediante a utilização de células-tronco angiogênicas). (COLINSON & DONNELLY, 2004; MADEDDU, 2005).

A neovascularização, ou seja, a formação de novos vasos sanguíneos exerce papel importante tanto em processos fisiológicos quanto em patológicos. Em processos fisiológicos, ocorre durante o desenvolvimento embrionário, na vascularização do cérebro e do rim (AUERBACH, R. & AUERBACH, W, 1997), no ciclo reprodutivo feminino, na proliferação endometrial, no desenvolvimento do folículo ovariano e na formação da rede capilar placentária (FREDERICK *et al.*, 1984) e, em processos de reparação tecidual como, por exemplo, na cicatrização de feridas (NISSEN *et al.* 1998). Em processos patológicos, a neovascularização pode estar associada ao crescimento exagerado de vasos sanguíneos como, por exemplo, em tumores (CARMELIET & JAIN, 2000), na retinopatia diabética (RUDERMAN *et al.*, 1992), na psoríase (CREAMER *et al.*, 1997) e artrite reumatóide (CLAVEL *et al.*, 2003), ou pode estar relacionada ao crescimento insuficiente de vasos, como, por exemplo, na doença isquêmica do coração (infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca congestiva), cérebro ou membro inferior, dentre outras (FOLKMAN, 1995; CARMELIET, 2003).

Existem três principais conceitos descritos para a neovascularização no indivíduo adulto: angiogênese, arteriogênese e vasculogênese, os quais representam diferentes aspectos de um processo integrado (ASAHARA *et al.*, 1997 ; WEEL *et al.*, 2008).

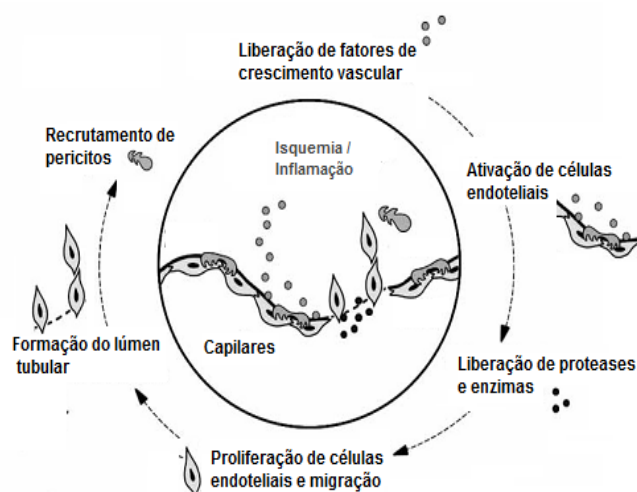
### 1.2.1 Angiogênese

A angiogênese, termo às vezes também utilizado genericamente como sinônimo de neovascularização, envolve, especificamente, o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de microvasculatura (capilares e vênulas pós-capilares) pré-existente em resposta a diversos estímulos. Um forte estímulo para que ocorra a formação de novos vasos é a hipóxia, que estimula a liberação de fatores pró-angiogênicos como, por exemplo, o VEGF (FOLKMAN, 1995; CARMELIET, 2003; WAHLBERG, 2003). Os novos vasos sanguíneos contribuem para o suprimento de oxigênio e de nutrientes, bem como para a remoção de produtos de excreção (WHALEN & ZETTER, 1992). Os vasos resultantes são pequenos, com diâmetro aproximado de 10-20  $\mu\text{m}$  e, por isso, não são suficientes para compensar a oclusão de uma artéria de grande diâmetro como, por exemplo, a artéria femoral (HIROTA *et al.*, 2006).

A angiogênese obedece a uma sequência altamente organizada de eventos, os quais requerem coordenado aparecimento espacial e temporal de células e de moléculas específicas (LIEKENS *et al.*, 2001). Após o estímulo desencadeador da resposta angiogênica (Figura 2), a primeira fase desta está associada com a alteração na adesão entre células endoteliais adjacentes e pericitos (SCHLINGEMANN *et al.*, 1991). As células endoteliais são ativadas por fatores de crescimento vascular e começam a produzir novas moléculas como, por exemplo, enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação da membrana basal e da matriz extracelular (STETLER-STEVENSON, 1999; MOSES, 1997). Em seguida, as células endoteliais migram em direção ao sítio de origem do estímulo angiogênico, ocasionando a formação de brotos capilares. Posteriormente, as

células endoteliais proliferam e se diferenciam, se alinhando para a formação do lúmen tubular (PAPETTI & HERMAN, 2002; BUSSOLINO *et al.*, 1997).

Durante a fase de maturação e estabilização do novo vaso sanguíneo, novos componentes da matriz extracelular são produzidos e depositados sob a forma de nova membrana basal e os pericitos migram para o local do vaso formado, associando-se intimamente à superfície das células endoteliais, provendo suporte estrutural e contribuindo para o controle do crescimento deste. Os vasos em formação, eventualmente, se conectam a outros vasos também recém-formados e/ou àqueles pré-existentes (formação de anastomoses) e o fluxo sanguíneo é, então, estabelecido e os novos vasos podem persistir ou até mesmo sofrer regressão caso não sejam mais necessários (GRIFFIOEN & MOLEMA, 2000; BECK Jr & D'AMORE, 1997).



**FIGURA 2: Esquema ilustrativo das etapas da angiogênese.** A isquemia tecidual é um dos quadros clínicos que leva à liberação de fatores de crescimento vascular que, por sua vez, ativam as células endoteliais que liberam enzimas e degradam a matriz extracelular, possibilitando a proliferação e a migração das células endoteliais e a formação dos novos vasos sanguíneos. Adaptado de Lawall *et al.* 2010.



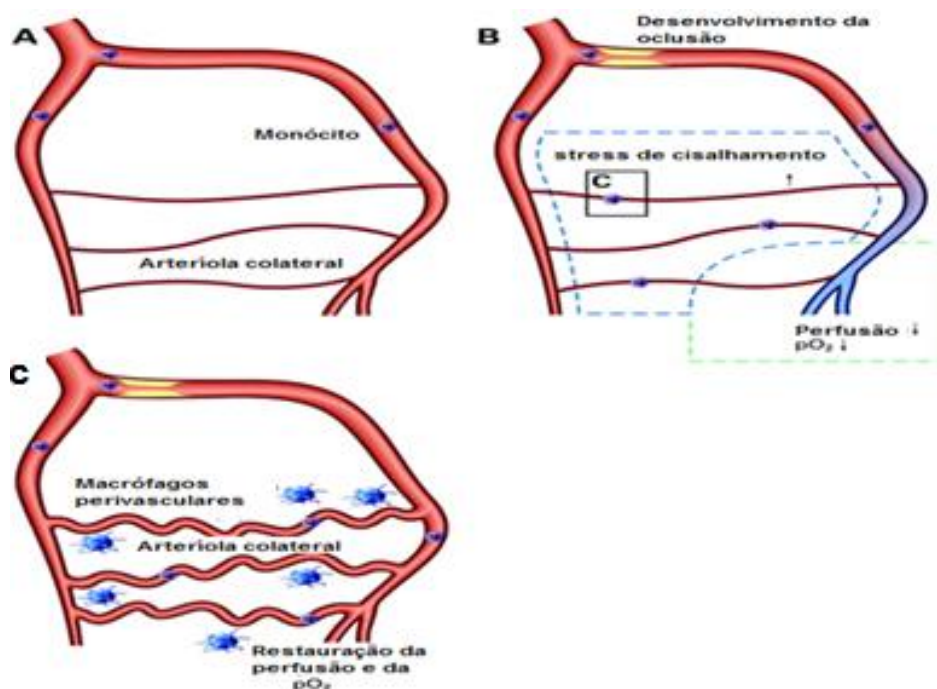
### 1.2.2 Arteriogênese

A arteriogênese, por outro lado, envolve o desenvolvimento de vasos colaterais a partir de uma rede de arteríolas pré-existentes. O crescimento de novos vasos colaterais, seja por crescimento de novo (LOWER, 1932), seja por remodelamento (SHAPER, 1971) de ramos arteriais pouco ou não perfundidos, pode ser estimulado, principalmente, por forças físicas e/ou pelo processo inflamatório. Sabe-se, por exemplo, que o aumento da pressão exercida pela força de cisalhamento após a oclusão de um ramo arterial e/ou o recrutamento de monócitos são importantes estímulos para a arteriogênese (VAN ROYEN *et al.*, 2001; DEIND, 2001; HERSHEY, 2001; SCHAPER, 2003).

No caso de crescimento de novo, ocorre o crescimento de arteríolas colaterais a partir da proliferação de células endoteliais e da musculatura lisa presentes em arteríolas pré-existentes. Por outro lado, no caso de remodelamento de estruturas pré-existentes, o que ocorre é o alargamento do vaso a partir da estimulação da proliferação e migração de células endoteliais e de músculo liso, o estímulo inicial para a promoção do remodelamento é o estresse de cisalhamento decorrente da obstrução de uma arteríola principal. O endotélio ativado libera fatores pró-angiogênicos e MCP-1. Os monócitos recrutados por sua vez liberam mais substâncias pró-angiogênicas e levam a formação de um novo lúmen com, posterior anastomose com outras arteríolas *ou* a estimulação da proliferação de CEs e musculatura lisa, provocando um aumento no diâmetro dos vasos colaterais pouco ou não funcionais pré-existentes. Dessa forma, o aumento do diâmetro dos vasos colaterais é provocado pelo aumento do número de células musculares lisas e células endoteliais, estes vasos passam então a contribuir para a perfusão sanguínea tecidual (SHAPER, *et al.*, 2003).

Interessantemente, quando a arteriogênese leva ao alargamento de arteríolas pré-existentes, inicialmente não perfundidas, estas podem aumentar cerca de 20 vezes o seu diâmetro durante esse processo. Evidências experimentais demonstram que a arteriogênese pode restaurar quase totalmente a condutância vascular normal em animais com isquemia de membro posterior induzida pela oclusão da artéria

femoral (OAF). Esse dado se correlaciona bem com a observação clínica de que alguns pacientes com DAP não apresentam os sintomas da isquemia, já que sua rede de vasos pode fornecer sangue suficiente para atender a necessidade de perfusão do membro inferior afetado (DIEHM *et al.*, 2007).

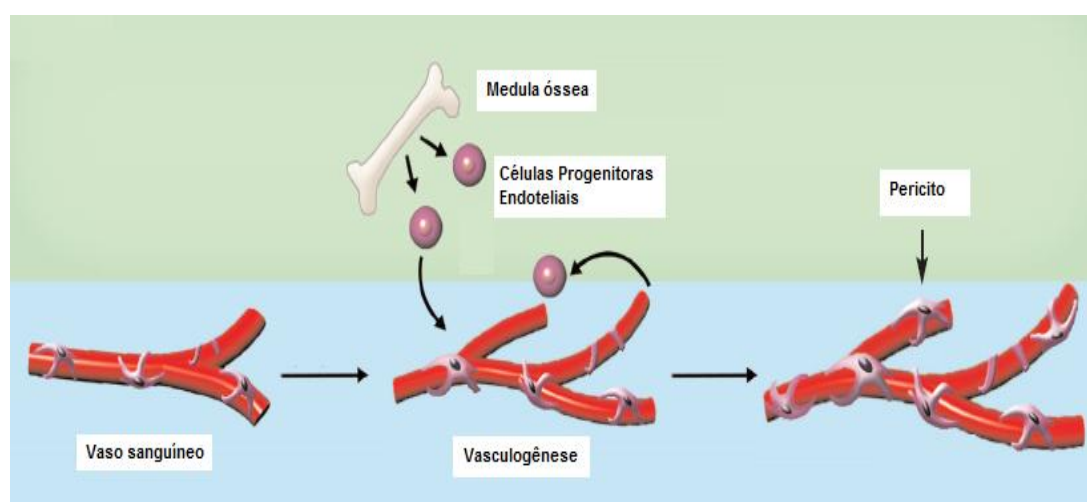


**FIGURA 3: Esquema ilustrativo da arteriogênese.** A- Vaso sem estenose, com fluxo sanguíneo sem alterações e arteríolas colaterais com pouco fluxo sanguíneo. B- Início do desenvolvimento da oclusão arterial e aumento do stress de cisalhamento nas arteríolas colaterais. C- Em um estado ativado, o endotélio expressa moléculas de adesão que se ligam a monócitos circulantes. Os monócitos transmigram para o tecido perivascular, diferenciam-se em macrófagos e secretam fatores de crescimento e citocinas que estimulam a proliferação das células musculares lisas e células endoteliais. Adaptado de Schirmer *et al.* (2009).

### 1.2.3 Vasculogênese

Outro processo de neovascularização que pode ocorrer no indivíduo adulto é a vasculogênese que é o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de angioblastos ou de células progenitoras endoteliais (CPE). Acreditava-se que esse

processo ocorria somente na fase embrionária; no entanto, Asahara *et al.* (1997), verificaram que a vasculogênese também ocorre na fase adulta a partir de CPEs derivadas da medula óssea ou provenientes de reserva tecidual local. Essas células são capazes de se diferenciar em células endoteliais funcionais e podem proliferar quando estimuladas por um trauma vascular ou por hipóxia (CARMELIET *et al.*, 2003). No entanto, em condições fisiológicas, o número dessas células circulantes é relativamente pequeno (GIL *et al.*, 2001).



**FIGURA 4: Esquema ilustrativo das etapas da vasculogênese.** A vasculogênese envolve o recrutamento de CPEs da medula óssea (ou de fontes teciduais locais – não representadas no esquema) em resposta a um estímulo angiogênico, seguido de proliferação e diferenciação destas em células endoteliais adultas e sua incorporação aos vasos em formação. Similarmente à angiogênese, os pericitos migram para o local do vaso neoformado, provendo suporte estrutural e contribuindo para o controle do crescimento deste. Adaptado de Cao *et al.*, 2010.

### 1.3 Terapia celular com células-tronco

Células-tronco são funcionalmente definidas como células que têm a capacidade de auto-renovação, bem como a capacidade de gerar células diferenciadas. Na fase pós-embrionária, essas células podem ser encontradas na

medula óssea ou em *pools* regionais nos diversos tecidos corporais. Desta forma, acredita-se que as células-tronco tenham papel regenerativo quando ocorre uma lesão tecidual (BLAU *et al.*, 2001; FODOR, 2003).

A medula óssea (MO) é uma importante fonte de células-tronco adultas com potencial angiogênico, incluindo células-tronco hematopoéticas, células progenitoras endoteliais (CPEs), as células mesenquimais estromais e células progenitoras adultas multipotentes (EGUCHI *et al.*, 2007).

A indução terapêutica da formação de novos vasos sanguíneos através-do transplante de células-tronco é uma opção promissora para a recuperação de tecidos isquêmicos. O transplante de células-tronco angiogênicas da medula óssea, por exemplo, pode atuar através da formação direta de vasos ou, de forma indireta, por meio da secreção parácrina de fatores pró-angiogênicos, promovendo, assim, a neovascularização reparadora (MADEDDU, 2005; BURT, 2008, COLLINSON & DONNELLY, 2004).

Estudos em animais experimentais e testes clínicos com utilização do transplante de células derivadas da medula óssea (incluindo a fração mononuclear e as CPEs) em pacientes com doenças isquêmicas agudas e crônicas demonstram que o transplante celular é seguro e praticável (SCHACHINGER *et al.*, 2006). Por exemplo, o transplante de células-tronco angiogênicas pode melhorar a perfusão sanguínea da musculatura de membro afetada pela isquemia crônica crítica levando a uma melhora do quadro sintomático, como aumento da pressão segmental, cicatrização de feridas tróficas e diminuição da dor ao repouso (LARA-HERNANDEZ *et al.*, 2010; BURT *et al.*, 2010). Entretanto, apesar dos estudos promissores os resultados dos estudos clínicos são ainda modestos (MARSBOOM & JANSSENS, 2008; VAN ROYEN *et al.*, 2001; INVERNICI *et al.*, 2007).

### 1.3.1 Células-tronco angiogênicas

As células-tronco angiogênicas podem ser isoladas de várias fontes como medula óssea, sangue periférico, sangue de cordão umbilical e podem também estar presentes nas paredes de artérias (ASAHARA *et al.*, 1997; PEICHEV, 2000;

NARUSE, 2005; ZENGIN, 2006). Essas células têm sido amplamente estudadas também como biomarcadores para doenças cardiovasculares e como opção para a terapia celular (LOSORDO & DIMMELER, 2004; GUVEN, 2006).

As células-tronco angiogênicas expressam várias proteínas de membrana que atuam como marcadores específicos que as identificam como células angiogênicas. As moléculas mais comumente descritas como biomarcadores para essa população de células, incluem o CD34 e o CD133 no caso de células humanas (PEICHEV, 2000) e c-kit e Sca-1 no caso de células derivadas de roedores (ZHAO *et al.*, 2009), os quais são, na verdade, marcadores para uma população capaz de originar células hematopoiéticas e CPEs, as quais, acredita-se, possuem um ancestral em comum (CASE *et al.*, 2007). Recentemente, vários grupos de pesquisa têm utilizado o receptor do fator de crescimento do endotélio vascular 2 (VEGFR2, Flk-1) e o CD31 (PECAM-1) como marcadores juntamente com CD34, CD133, Sca-1, c-kit ou com a população Lin<sup>-</sup> (onde Lin<sup>-</sup> representa a população de células negativas para marcadores de células de linhagem hematopoiética, tais como, linfócitos, macrófagos, neutrófilos e eritrócitos) para designar as células progenitoras com potencial angiogênico (SANG-MO KNOW *et al.*, 2011).

O número de células progenitoras no sangue periférico é normalmente muito pequeno, representando uma pequena porcentagem (cerca de 0,1%) do total da fração de células mononucleares (MNCs) circulantes. Entretanto, como mencionado anteriormente, tem sido demonstrado que, após um trauma vascular ou isquemia, ocorre um aumento do número dessas células no sangue circulante (GILL *et al.*, 2001). As células-tronco angiogênicas são, portanto, uma pequena fração das células MNCs e podem ser isoladas destas. Em vista disso, a maioria dos estudos que envolvem a terapia celular em pacientes com DAP tem sido realizados com as células MNCs da medula óssea (HIGASHI, 2004; HUANG, 2005; KAWAMURA, 2005).

Estudos têm demonstrado que essas células-tronco angiogênicas derivadas da medula óssea podem manter a integridade do endotélio vascular em pacientes com infarto agudo do miocárdio, além de auxiliar na melhora funcional do infarto

cardíaco, sugerindo que a administração das dessas células pode ser uma terapia promissora para salvar danos isquêmicos (URBICH *et al.*, 2004).

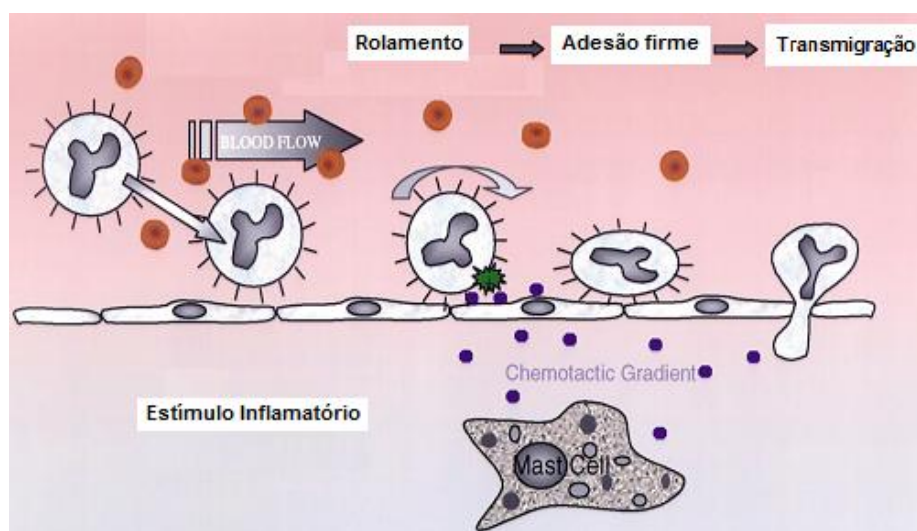
### 1.4 Recrutamento celular

A migração das células transplantadas via rota vascular da circulação sanguínea para o tecido lesionado e a incorporação dessas células aos vasos sanguíneos são requisitos importantes para que a terapia celular seja bem sucedida. Entretanto, ao se investigar o recrutamento e a incorporação das células transplantadas, seja em modelos animais ou em testes clínicos, apenas uma pequena percentagem dessas células é detectável nos tecidos lesionados (CHAVAKIS *et al.*, 2008).

O recrutamento e a incorporação dessas células requer uma coordenada sequência de eventos, com quimiotaxia, migração, adesão e, finalmente, diferenciação em células endoteliais (NUMAGUSHI *et al.* 2006). Apesar da também conhecida importância das ações parácrinas das células-tronco transplantadas na recuperação de lesões, o fato de essas células não migrarem com eficiência, seja da circulação para o tecido isquêmico, seja dentro do próprio tecido para áreas específicas de lesão, poderia estar contribuindo para a baixa eficácia terapêutica e a ausência de sucesso integral dos estudos realizados até o momento. Alguns estudos sugerem que os mecanismos de recrutamento de CPEs para locais de neovascularização tumoral ou para sítios de isquemia possuem algumas características comuns com o recrutamento de leucócitos para sítios de inflamação, já que moléculas de adesão, sabidamente envolvidas no rolamento e na adesão firme de leucócitos, podem ser reguladores chave para o *homing* de CPEs (VAJKOCZY *et al.*, 2003; FOUBERT *et al.*, 2007).

Enquanto o estudo do recrutamento de leucócitos para sítios inflamatórios encontra-se em um estágio bem avançado, os mecanismos de recrutamento de células-tronco angiogênicas para locais lesionados ainda são bastante desconhecidos. Durante a inflamação, por exemplo, o recrutamento de células inflamatórias ocorre em vênulas pós-capilares e requer uma sequência coordenada de eventos de adesão e de sinalização, incluindo rolamento mediado por selectinas,

ativação de integrinas de leucócitos, mediada por quimiocinas, adesão firme mediada por integrinas dos leucócitos sobre as células endoteliais das vênulas, diapedese através da camada endotelial e, finalmente, a migração pela matriz extracelular envolvendo processos dependentes de integrinas e de proteases que degradam a matriz (KUBES & KERFOOT, 2001) (Figura 5).

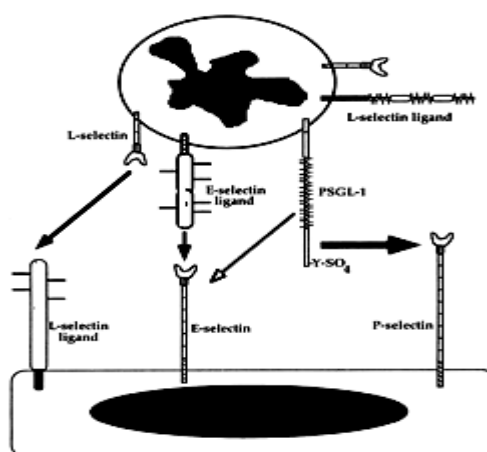


**FIGURA 5: Esquema ilustrativo das etapas do recrutamento de leucócitos**  
Etapas do recrutamento de leucócitos durante um processo inflamatório designadas como rolamento, adesão firme ao endotélio e transmigração celular. Adaptado de KUBES & KERFOOT, 2001.

#### **1.4.1 A importância das selectinas**

O passo inicial para o recrutamento de leucócitos envolve seu rolamento sobre o endotélio mediado predominantemente por moléculas de adesão de baixa afinidade denominadas selectinas. A família de selectinas consiste em três membros conhecidos: L-selectina, E-selectina e P-selectina. A L-selectina é constitutivamente expressa na superfície celular da maioria dos leucócitos, já a expressão de E-selectina é induzida em células endoteliais ativadas por citocinas inflamatórias como, por exemplo, IL-1 e TNF- $\alpha$  e a P-selectina fica armazenada em grânulos no interior das células endoteliais e de plaquetas e são rapidamente induzidas por exocitose na superfície celular após estimulação e ativação celular por citocinas inflamatórias. As

selectinas se ligam a carboidratos sialilados (“sialyl-Lewis-X-like”) ou fucosilados como, por exemplo, o ligante de P-selectina, PSGL-1 (da expressão inglesa *P-selectin ligand-1*) e o ligante de E-selectina, ESLG-1 (da expressão inglesa *E-selectin-glycoprotein ligand-1*) (KANSAS, *et al.*, 1996). Além disso, a molécula de superfície CD44 também já foi descrita como ligante de selectinas em linfócito T e neutrófilos em modelo murino de inflamação (NACHER *et al.*, 2011).



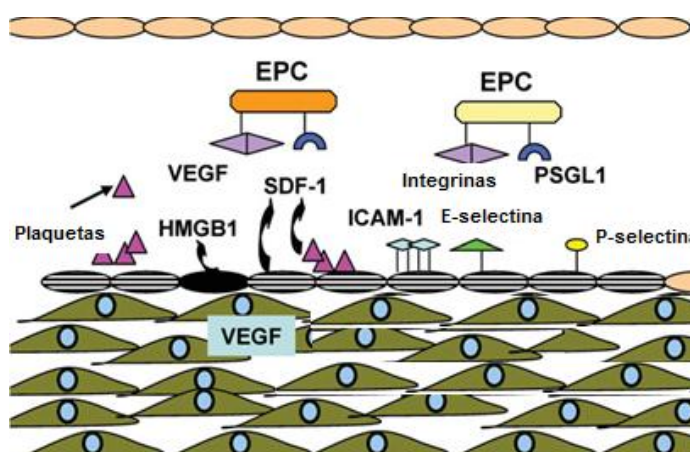
**FIGURA 6: Esquema ilustrativo das interações entre selectinas e seus ligantes em leucócitos e células endoteliais.** As células endoteliais expressam E-selectina e P-selectina. Os leucócitos expressam a L-selectina, ligante de E-selectina e PSGL-1. Adaptado de Kansas, 1996.

Estudos têm demonstrado que a interação entre PSGL-1 e P-selectina leva à ativação de proteínas quinases em diferentes tipos celulares e inicia a ativação de integrinas, moléculas importantes para promover a adesão celular firme ao endotélio (Cao *et al.* 2010). Interessantemente, Foubert *et al.* (2007) demonstraram que a PSGL-1 participa do recrutamento de CPE para sítios isquêmicos e, com isso, auxiliam na neovascularização em modelo de isquemia de membro posterior. Corroborando esses dados, recentemente Cao *et al.*, 2010, demonstraram, *in vitro*, que a superexpressão de PSGL-1 melhora as propriedades de adesão das CPEs através da ativação de Syk e consequente ativação de integrinas.



Estudos realizados por Vajkoczy *et al.*, (2003) demonstraram que a E-selectina, a P-selectina e a PSGL-1 estão envolvidas na adesão inicial de CPEs embrionárias ao endotélio tumoral *in vivo*, apesar de elas não apresentarem o fenômeno de rolamento. Além disso, Oh *et al.* (2007) demonstraram que camundongos deficientes da expressão de E-selectina apresentam reduzida capacidade de revascularização associada a reduzida presença de CPEs em músculos isquêmicos.

Baseando-se nesses e em outros estudos, Zampetaki (2008) propôs que, após a lesão vascular como, por exemplo, em um processo de isquemia vascular, a monocamada endotelial é ativada e a agregação e a ativação plaquetária ocorrem muito rapidamente. Níveis elevados de VEGF e da quimiocina CXCL12/SDF-1 $\alpha$ , dentre outras substâncias, são observados. Neste contexto, ocorre a interação entre selectinas e seus ligantes, além de integrinas e moléculas de adesão celular que são expressos nas CPEs e/ou nas células endoteliais ativadas (Figura 7), culminando com o recrutamento das células angiogênicas para o tecido lesado. Entretanto, essas prováveis interações nunca foram de fato avaliadas *in loco* e em tempo real.



**Figura 7: Esquema ilustrativo dos prováveis mecanismos de recrutamento de células progenitoras endoteliais.** Após a lesão vascular, a monocamada de células endoteliais é ativada. Ocorre rapidamente, então, a agregação plaquetária sobre o endotélio e essas passam a secretar altos níveis de SDF-1 e elevados níveis

de VEGF. As células endoteliais ativadas passam a expressar moléculas de adesão como por exemplo, E-selectina e P-selectina as quais auxiliam no recrutamento celular. Adaptado de Vajkoczy *et al.*, 2003.

### 1.4.2 Microscopia intravital

Apesar da existência de técnicas que permitem a visualização de imagens e a determinação detalhada dos eventos de migração *in vivo*, como por exemplo, a microscopia intravital, o padrão de migração de células-tronco para músculos isquêmicos ainda é amplamente desconhecido.

A microscopia intravital, seja ela óptica, de epifluorescência ou confocal, é a técnica mais utilizada atualmente para se examinar as quatro dimensões (x, y, z e tempo) de um fenômeno que ocorre *in vivo*, permitindo o estudo do recrutamento celular em condições realísticas mais próximas possível daquelas fisiológicas. Ela permite, a visualização e mensuração de cada passo do recrutamento celular como rolamento, velocidade de rolamento, adesão e emigração de forma qualitativa e quantitativa *in loco* e em tempo real. Considerando-se os estudos na área do recrutamento leucocitário, por exemplo, várias estruturas, movimentos e comportamentos já foram elucidados utilizando-se essa tecnologia (CARA & KUBES, 2004). Essa técnica é, portanto, uma ferramenta de pesquisa sofisticada que permite estudar a microcirculação e analisar complexas interações biológicas e mecanismos de recrutamento celular em várias doenças.

Embora a microscopia intravital seja comumente utilizada para o estudo do recrutamento de leucócitos para sítios inflamatórios, nunca foi utilizada para o estudo do recrutamento de células-tronco angiogênicas para músculos de membros posteriores isquêmicos.

PARTICIPAÇÃO DAS SELECTINAS NAS INTERAÇÕES ENTRE CÉLULAS  
ANGIOGÊNICAS DA MEDULA ÓSSEA E ENDOTÉLIO DE MÚSCULOS  
ISQUÊMICOS DE MEMBROS INFERIORES EM MODELO MURINO

**JUSTIFICATIVA**

## **2 JUSTIFICATIVA**

A Doença Arterial Periférica (DAP) é uma doença crônica que progressivamente prejudica a circulação arterial do membro. Atualmente, existem várias formas de tratamento, no entanto, quando estes não podem ser realizados ou são ineficazes, os pacientes com DAP são encaminhados para a amputação do membro afetado. Frente a esse quadro, a terapia celular tem sido amplamente discutida como nova estratégia terapêutica.

Na última década, estudos de fase pré-clínica e clínica, utilizando diferentes tipos de células-tronco angiogênicas, têm sido realizados e, apesar de ainda modestos, os resultados obtidos são promissores. Entretanto, ao se investigar a incorporação tecidual das células transplantadas, seja em modelos animais ou em testes clínicos, apenas uma pequena percentagem dessas células é detectável nos tecidos lesionados. Uma possível explicação é que a baixa eficiência de migração, seja da circulação para o tecido isquêmico seja dentro do próprio tecido para áreas específicas de lesão, poderia estar contribuindo para a baixa eficácia terapêutica e ausência de sucesso integral dos estudos realizados até o momento. Portanto, o conhecimento detalhado dos mecanismos de migração celular parece ser crucial para a formulação de intervenções que visem o aumento da eficiência do transplante de células-tronco. No entanto, é importante ressaltar que se sabe muito pouco sobre os mecanismos específicos que as células-tronco utilizam para migrar da circulação sanguínea para um tecido isquêmico.

A microscopia intravital é considerada o padrão-ouro para a exploração da microcirculação *in vivo*. Essa técnica permite a visualização de vasos e de células circulantes (hemácias, leucócitos e plaquetas) em animais, entretanto, até o momento, nunca foi utilizada para avaliar os eventos envolvidos na migração de células-tronco para músculos isquêmicos.

Dessa maneira, o presente estudo tem como meta principal, gerar conhecimento sobre os mecanismos fisiológicos de recrutamento *in vivo* de células angiogênicas da medula óssea para músculos isquêmicos, utilizando, para isso, a

técnica de microscopia intravital. Essa estratégia proporcionará a avaliação em tempo real das interações entre as células angiogênicas da medula óssea e o endotélio vascular sob condições que preservam a microvasculatura local, permitindo, assim, um melhor entendimento das etapas que culminam com a entrada dessas células no músculo isquêmico.

PARTICIPAÇÃO DAS SELECTINAS NAS INTERAÇÕES ENTRE CÉLULAS  
ANGIOGÊNICAS DA MEDULA ÓSSEA E ENDOTÉLIO DE MÚSCULOS  
ISQUÊMICOS DE MEMBROS INFERIORES EM MODELO MURINO

**OBJETIVOS**

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a participação das selectinas nas interações entre células angiogênicas da medula óssea e o endotélio de músculos isquêmicos de membros inferiores.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Adaptar o método da difusão da fluoresceína, desenvolvido por Andrade *et al.* (1997), para a caracterização da redução do fluxo sanguíneo após a oclusão da artéria femoral (OAF) de camundongos e para a documentação temporal da restauração endógena desse fluxo;
2. Investigar a existência de eventos de rolamento e de adesão de células circulantes sobre o endotélio de músculos de membros inferiores isquêmicos e determinar o perfil temporal de ocorrência desses eventos;
3. Isolar e caracterizar células angiogênicas da medula óssea de camundongos;
4. Investigar a ocorrência de eventos de rolamento, de adesão e de “crawling” de células isoladas da medula óssea de camundongos sobre a microvasculatura de músculos isquêmicos;
5. Avaliar a expressão de ligantes de selectinas em células mononucleares e células negativas para marcadores de linhagem hematopoiética da medula óssea, BM-MNC e BM-Lin<sup>-</sup>, respectivamente;
6. Avaliar a participação das selectinas em mediar interações entre BM-MNC ou BM-Lin<sup>-</sup> transplantadas e o endotélio microvascular de músculos isquêmicos;

7. Avaliar a participação de plaquetas em mediar os eventos de rolamento e de adesão de BM-MNC ou células BM-Lin<sup>-</sup> transplantadas, sobre o endotélio microvascular de músculos isquêmicos;
8. Avaliar o fluxo sanguíneo, bem como a angiogênese e a arteriogênese nos músculos isquêmicos após 7 e/ou 14 dias da OAF nos camundongos tratados com as células-tronco angiogênicas para análise do efeito terapêutico das mesmas na presença ou ausência de inibição de selectinas e/ou de plaquetas.



PARTICIPAÇÃO DAS SELECTINAS NAS INTERAÇÕES ENTRE CÉLULAS  
ANGIOGÊNICAS DA MEDULA ÓSSEA E ENDOTÉLIO DE MÚSCULOS  
ISQUÊMICOS DE MEMBROS INFERIORES EM MODELO MURINO

**CONCLUSÃO**

## **7 CONCLUSÃO**

Os dados apresentados neste trabalho sugerem que:

1. A adaptação do método de difusão da fluoresceína sódica se mostrou adequada para a avaliação do fluxo sanguíneo em músculos de membros posteriores isquemiados;
2. A técnica de microscopia intravital evidenciou um aumento nas interações leucócito-endotélio em músculos de membros inferiores isquemiados;
3. Células angiogênicas isoladas da medula óssea (BM-MNC e BM-Lin<sup>-</sup>) rolam sobre e aderem ao endotélio de músculos de membros posteriores isquemiados;
4. BM-MNC transplantadas apresentam o comportamento de *crawling* sobre o endotélio de músculos de membros posteriores isquemiados;
5. BM-MNCs e BM-Lin<sup>-</sup> expressam constitutivamente os ligantes de selectinas PSGL-1, ESGL-1 e CD44;
6. O bloqueio de selectinas reduz as interações de células angiogênicas da medula óssea com o endotélio e o efeito terapêutico destas sobre a restauração dos músculos isquêmicos;
7. Os eventos de rolamento e de adesão das BM-MNC parecem depender, principalmente, de P-selectinas;
8. As plaquetas participam expressivamente dos eventos de rolamento e de adesão das BM-MNCs e BM-Lin<sup>-</sup> ao endotélio de músculos de membros posteriores isquemiados.

Como **conclusão geral**, os resultados sugerem que as interações entre células angiogênicas da medula óssea (BM-MNC e BM-Lin<sup>-</sup>) e o endotélio de músculos isquêmicos de membros inferiores e, conseqüentemente, a migração dessas células para o tecido isquêmico durante a terapia celular, são dependentes, pelo menos parcialmente, de selectinas e de plaquetas.

PARTICIPAÇÃO DAS SELECTINAS NAS INTERAÇÕES ENTRE CÉLULAS  
ANGIOGÊNICAS DA MEDULA ÓSSEA E ENDOTÉLIO DE MÚSCULOS  
ISQUÊMICOS DE MEMBROS INFERIORES EM MODELO MURINO

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN B, LÜDEMANN C, RATEI R, SCHMIDT-LUCKE JA. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for induction of arteriogenesis for limb salvage in critical limb ischaemia. **Zentralbl Chir.** Aug;134(4):298-304. 2009.

ANDONEGUI G, KERFOOT SM, MCNAGNY K, EBBERT KV, PATEL KD, KUBES P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. **Blood.** Oct 1;106(7):2417-23. 2005.

ANDONEGUI, G., S. M. KERFOOT, K. MCNAGNY, K. V. EBBERT, K. D. PATEL, KUBES P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. **Blood.** 106:2417–2423. 2005.

ANDRADE SP, MACHADO RD, TEIXEIRA AS, BELO AV, TARSO AM, BERALDO WT. Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. **Microvasc Res.** Nov;54(3):253-61. 1997.

ARAÚJO DJ, ARAÚJO FDJ, CIORLIN E, RUIZ AM, GRECO TO, ARDITO VR, LARGO M. Células-tronco da medula óssea em isquemia crítica de membros. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia.** 31(supl 1):128-139. 2009.

ARONOW W. S. Management of peripheral arterial disease of the lower extremities in elderly patients. **Journal of gerontology: Medical sciences.** 59:172-177. 2004.

ASAHARA T, MASUDA H, TAKAHASHI T, KALKA C, PASTORE C, SILVER M, KEARNE M, MAGNER M, ISNER GM: Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for post-natal vasculogenesis in physiological neovascularization. **Circulation Res.** 85:221-228. 1999.

ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, SILVER M, VAN DER ZEE R, LI T, WITZENBICHLER B, SCHATTEMAN G, ISNER JM: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science.**; 275:964-967 1997.

AUERBACH, R. & AUERBACH, W. Profound effects on vascular development caused by perturbations during organogenesis. **Am J Pathol,** 151, 1183-6. 1997.

AUFFRAY C, FOGG D, GARFA M, ELAIN G, JOIN-LAMBERT O, KAYAL S, SARNACKI S, CUMANO A, LAUVAU G, GEISSMANN F. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. **Science.** Aug 3;317(5838):666-70. 2007.

BAPTISTA JCCS: Isquemia crônica crítica de membro: diagnóstico clínico. **Isquemia crônica crítica.** 2004.

BECK, L., JR. & D'AMORE, P.A. Vascular development: cellular and molecular regulation. **Faseb J**, 11, 365-73. 1997.

BLAU, H.M., BRAZELTON, T.R., AND WEIMANN, J.M. The evolving concept of a stem cell: entity or function? **Cell** .105, 829–841. 2001.

BOJAKOWSKI K, ABRAMCZYK P, BOJAKOWSKA M, ZWOLIŃSKA A, PRZYBYLSKI J, GACIONG Z. Fucoïdan improves the renal blood flow in the early stage of renal ischemia/reperfusion injury in the rat. **J Physiol Pharmacol**. 52(1):137-43. 2001.

BURT R, PEARCE WH, RODRIGUEZ HE. The use of stem cells in the treatment of inoperable limb ischemia. **Perspectives and vascular surgery endovascular therapy**. Mar;20(1):45-7. 2008.

BURT RK, TESTORI A, OYAMA Y, RODRIGUEZ HE, YAUNG K, VILLA M, BUCHA JM, MILANETTI F, SHEEHAN J, RAJAMANNAN N, PEARCE WH. Autologous peripheral blood CD133+ cell implantation for limb salvage in patients with critical limb ischemia. **Bone Marrow Transplant**. Jan;45(1):111-6. 2010.

BUSSOLINO F, MANTOVANI A, PERSICO G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. **Trends Biochem Sci**. 22(7):251-6. 1997.

CAO L, LI L, YANG H, YIN H. Overexpression of P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances adhesive properties of endothelial progenitor cells through Syk activation. **Acta Biochim Biophys Sin**. Aug;42(8):507-14. 2010.

CARA DC, KUBES P. Intravital microscopy as a tool for studying recruitment and chemotaxis. **Methods Mol Biol**. 239:123-32. 2004.

CARMELIET P. Angiogenesis in health and disease. **Nat Med**;9:653-660. 2003.

CARMELIET, P., AND JAIN, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature** 407, 249–257. 2000.

CASE J, MEAD LE, BESSLER WK, PRATER D, WHITE HA, SAADATZADEH MR, BHAVSAR JR, YODER MC, HANELINE LS, INGRAM DA. Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. **Exp Hematol**. Jul;35(7):1109-18. 2007.

CASSAR K, BACHOO P. Peripheral arterial disease. **Clin Evid**. Jun;(15):164-76. 2006.

CHAVAKIS E, URBICH C, DIMMELER S. Homing and engraftment of progenitor cells: a prerequisite for cell therapy. **J Mol Cell Cardiol**. Oct;45(4):514-22. 2008.

CHO SW, MOON SH, LEE SH, KANG SW, KIM J, LIM JM, KIM HS, KIM BS, CHUNG HM. Improvement of postnatal neovascularization by human embryonic stem cell derived endothelial-like cell transplantation in a mouse model of hindlimb ischemia. **Circulation**. Nov 20;116(21):2409-19. 2007.

CLAVEL, G., BESSIS, N. & BOISSIER, M.C. Recent data on the role for angiogenesis in rheumatoid arthritis. **Joint Bone Spine**, 70, 321-6. 2003.

COLLINSON D. J., DONNELLY R. Therapeutic Angiogenesis in Pheripheral Arterial disease: Can biotechnology produce an effective collateral circulation? **Eur J. Vascular Surg**. 9-23. 2004.

COUFFINHAL T, SILVER M, ZHENG LP, KEARNEY M, WITZENBICHLER B, ISNER JM. Mouse model of angiogenesis. **Am J Pathol**. Jun;152(6):1667-79. 1998.

CREAMER, D., ALLEN, M.H., SOUSA, A., POSTON, R. & BARKER, J.N. Localization of endothelial proliferation and microvascular expansion in active plaque psoriasis. **Br J Dermatol**, 136, 859-65. 1997.

DEINDL E, BUSCHMANN I, HOEFER IE, PODZUWEIT T, BOENGLER K, VOGEL S, VAN ROYEN N, FERNANDEZ B, SCHAPER W. Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. **Circ Res**. Oct 26;89(9):779-86. 2001.

DIEHM C, ALLENBERG JR, PITTRROW D, DARIUS H. Importance of the ankle-brachial index (ABI) in the prevention of cardiovascular diseases. Ten questions and answers. **Herz**. 32(5):404-9. 2007.

DIMMELER S, ZEIHNER AM; REPAIR-AMI Investigators. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. **Eur Heart J**. Dec;27(23):2775-83. 2006.

DONALD LLOYD-JONES, MD, SCM, FAHA; ROBERT J. ADAMS, MD, FAHA; TODD M. BROWN, MD; MERCEDES CARNETHON, PHD, FAHA; SHIFAN DAI, MD, PHD\*; GIOVANNI DE SIMONE, MD; T. BRUCE FERGUSON, MD; EARL FORD, MD, MPH\*; KAREN FURIE, MD; CATHLEEN GILLESPIE; ALAN GO, MD; KURT GREENLUND, PHD\*; NANCY HAASE; SUSAN HAILPERN, DPH; P. MICHAEL HO, MD, PHD; VIRGINIA HOWARD, PHD, FAHA; BRETT KISSELA, MD; STEVEN KITTNER, MD; DANIEL LACKLAND, PHD, FAHA; LYNDIA LISABETH, PHD; ARIANE MARELLI, MD; MARY M. MCDERMOTT, MD; JAMES MEIGS, MD; DARIUSH MOZAFFARIAN, MD, PHD, FAHA; MICHAEL MUSSOLINO, PHD; GRAHAM NICHOL, MD, FAHA; VÉRONIQUE L. ROGER, MD, FAHA; WAYNE ROSAMOND, PHD, FAHA; RALPH SACCO, MD, FAHA; PAUL SORLIE, PHD; RANDALL STAFFORD, MD; THOMAS THOM; SYLVIA WASSERTHIEL-SMOLLER,

PHD; NATHAN D. WONG, PHD; JUDITH WYLIE-ROSETT, EDD, ON BEHALF OF THE AMERICAN HEART Heart Disease and Stroke Statistics—2010 Update. **American Heart Association** Statistical Update. 2010.

DORMANDY J, HEECK L, VIG. S. Predicting which patients will develop chronic critical leg ischemia. **Semin. Vasc. Surg.**; 12:138-141. 1999.

DREGELID E. Letter by dregelid regarding article, "autologous bone-marrow mononuclear cell implantation reduces long-term major amputation risk in patients with critical limb ischemia: a comparison of atherosclerotic peripheral arterial disease and buerger disease". **Circ Cardiovasc Interv.** Apr 1;4(2):e12. 2011.

EGAMI K, MUROHARA T, AOKI M, MATSUSHI T. Ischemia-induced angiogenesis: role of inflammatory response mediated by P-selectin. **J Leukoc Biol.** May;79(5):971-6. 2006.

EGUCHI M, MASUDA H, ASAHARA T. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. **Clin Exp Nephrol.** Mar;11(1):18-25. 2007.

FODOR W. L. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: The potential to replace, repair and regenerate. **Reproductive Biology and Endocrinology** 1:10. 2003.

FOLKMAN J. Angiogenesis an cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Net Med**; 1:27-31. 1995.

FOUBERT P, SILVESTRE JS, SOUTTOU B, BARATEAU V, MARTIN C, EBRAHIMIAN TG, LERÉ-DÉAN C, CONTRERES JO, SULPICE E, LEVY BI, PLOUËT J, TOBELEM G, LE RICOUSSE-ROUSSANNE S. PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. **J Clin Invest.** Jun;117(6):1527-37. 2007.

FRANZ RW, PARKS A, SHAH KJ, HANKINS T, HARTMAN JF, WRIGHT ML. Use of autologous bone marrow mononuclear cell implantation therapy as a limb salvage procedure in patients with severe peripheral arterial disease. **J Vasc Surg.** Dec;50(6):1378-90. 2009.

FREDERICK, J.L., SHIMANUKI, T. & DIZEREGA, G.S. Initiation of angiogenesis by human follicular fluid. **Science**, 224, 389-90. 1984.

GILL M, DIAS S, HATTORI K, RIVERA ML, HICKLIN D, WITTE L, GIRARDI L, YURT R, HIMEL H, RAFII S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of GRIFFIOEN, A.W. & MOLEMA, G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. **Pharmacol Rev**, 52, 237-68. 2000.

GÜVEN H, SHEPHERD RM, BACH RG, CAPOCCIA BJ, LINK DC. The number of endothelial progenitor cell colonies in the blood is increased in patients with angiographically significant coronary artery disease. **J Am Coll Cardiol.** 48(8):1579-87. 2006.

HAMBURGER SA, MCEVER RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. **Blood.** Feb 1;75(3):550-4. 1990.

HEIL M, EITENMULLER I, SCHMITZ-RIXEN T, SCHAPER W. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. **J cell Mol Med;** 10:45-55. 2006.

HERSHEY JC, BASKIN EP, GLASS JD, HARTMAN HA, GILBERTO DB, ROGERS IT, COOK JJ. Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between capillary sprouting and arteriogenesis. **Cardiovascular research.** Feb 16;49(3):618-25. 2001.

HICKS AE, NOLAN SL, RIDGER VC, HELLEWELL PG, NORMAN KE. Recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 directly inhibits leukocyte rolling by all 3 selectins in vivo: complete inhibition of rolling is not required for anti-inflammatory effect. **Blood.** Apr 15;101(8):3249-56. 2003.

HICKS AE, ABBITT KB, DODD P, RIDGER VC, HELLEWELL PG, NORMAN KE. The anti-inflammatory effects of a selectin ligand mimetic, TBC-1269, are not a result of competitive inhibition of leukocyte rolling in vivo. **J Leukoc Biol.** 77(1):59-66. 2005.

HIDALGO A, FRENETTE SP. Enforced fucosylation of neonatal CD34+ cells generates selectin ligands that enhance the initial interactions with microvessels but not homing to bone marrow. **Blood.**577-576. 2004.

HIGASHI Y, KIMURA M, HARA K, NOMA K, JITSUIKI D, NAKAGAWA K, OSHIMA T, CHAYAMA K, SUEDA T, GOTO C, MATSUBARA H, MUROHARA T, YOSHIZUMI M. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. **Circulation.** Mar 16;109(10):1215-8. 2004.

HIROTA K, SEMENZA GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. **Critical reviews in oncology and hematology.** Jul;59(1):15-26. 2006.

HIRSCH AT, HASKAL ZJ, HERTZER NR, BAKAL CW, CREAGER MA, HALPERIN JL, HIRATZKA LF, MURPHY WR, OLIN JW, PUSCHETT JB, ROSENFELD KA, SACKS D, STANLEY JC, TAYLOR LM JR, WHITE CJ, WHITE J, WHITE RA, ANTMAN EM, SMITH SC JR, ADAMS CD, ANDERSON JL, FAXON DP, FUSTER V, GIBBONS RJ, HALPERIN JL, HIRATZKA LF, HUNT SA, JACOBS AK, NISHIMURA R, ORNATO JP, PAGE RL, RIEGEL B: ACC/AHA 2005 guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal,



mesenteric, and abdominal aortic): executive summary a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease) endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. **J Am Coll Cardiol**, 47:1239-1312. 2006.

HUANG P, LI S, HAN M, XIAO Z, YANG R, HAN ZC. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes. **Diabetes Care**. 28:2155–2160. 2005.

IL-YOUNG OH, CHANG-HWAN YOON, JIN HUR, JI-HYUN KIM, TAE-YOUN KIM, CHOON-SOO LEE, KYUNG-WOO PARK, IN-HO CHAE, BYUNG-HEE OH, YOUNG-BAE PARK AND HYO-SOO KIM. Involvement of E-selectin in recruitment of endothelial progenitor cells and angiogenesis in ischemic muscle. **Blood**. Dec 1;110(12):3891-9. 2007.

INVERNICI G, EMANUELI C, MADEDDU P, CRISTINI S, GADAU S, BENETTI A, CIUSANI E, STASSI G, SIRAGUSA M, NICOSIA R, PESCHLE C, FASCIO U, COLOMBO A, RIZZUTI T, PARATI E, ALESSANDRI G. Human fetal aorta contains vascular progenitor cells capable of inducing vasculogenesis, angiogenesis, and myogenesis in vitro and in a murine model of peripheral ischemia. **Am J Pathol**. Jun;170(6):1879-92. 2007.

ISACKE CM, YARWOOD H. The hyaluronan receptor, CD44. **Int J Biochem Cell Biol**. Jul;34(7):718-21. 2002.

JACOBI J., TAM BY, WU G, HOFFMAN J, COOKE JP, KUO CJ. Adenoviral gene transfer with soluble vascular endothelial growth factor receptors impairs angiogenesis and perfusion in a murine model of hindlimb ischemia. **Circulation**. Oct 19;110(16):2424-9. 2004.

KANSAS GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. **Blood**. Nov 1;88(9):3259-87. 1996.

KAWAMURA A, HORIE T, TSUDA I, IKEDA A, EGAWA H, IMAMURA E, IIDA J, SAKATA H, TAMAKI T, KUKITA K, MEGURO J, YONEKAWA M, KASAI M. Prevention of limb amputation in patients with limbs ulcers by autologous peripheral blood mononuclear cell implantation. **Ther Apher Dial**. Feb;9(1):59-63. 2005.

KHAN NA, RAHIM SA, ANAND SS, SIMEL DL, PANJU A. Does the clinical examination predict lower extremity peripheral arterial disease? **JAMA**. Feb 1;295(5):536-46. 2006.

KUBES P, KERFOOT SM. Leukocyte recruitment in the microcirculation: the rolling paradigm revisited. **News Physiol Sci**. Apr;16:76-80. 2001.

LARA-HERNANDEZ R, LOZANO-VILARDELL P, BLANES P, TORREGUITART-MIRADA N, GALMÉS A, BESALDUCH J. Safety and efficacy of therapeutic angiogenesis as a novel treatment in patients with critical limb ischemia. **Ann Vasc Surg**. Feb;24(2):287-94. 2010.

LAWALL H, BRAMLAGE P, AMANN B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. A critical appraisal. **Thromb Haemost**. 103(4):696-709. 2010.

LIEKENS, S., DE CLERCQ, E. & NEYTS, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochem Pharmacol**, 61, 253-70. 2001.

LOSORDO DW, DIMMELER S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part I: angiogenic cytokines. **Circulation**. Jun 1;109(21):2487-91. 2004.

LOWER R. Early science in Oxford. **Oxford: Oxford University Press**;1932.

MADEDDU P, EMANUELI C, SPILLMANN F, MELONI M, BOUBY N, RICHER C, ALHENC-GELAS F, VAN WEEL V, EEFTING D, QUAX PH, HU Y, XU Q, HEMDAHL AL, VAN GOLDE J, HUIJBERTS M, DE LUSSANET Q, STRUIJKER BOUDIER H, COUFFINHAL T, DUPLAA C, CHIMENTI S, STASZEWSKY L, LATINI R, BAUMANS V, LEVY BI. Murine models of myocardial and limb ischemia: diagnostic end-points and relevance to clinical problems. **Vascular Pharmacology**. Nov;45(5):281-301. 2006.

MADEDDU P. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. **Exp Physiol**. May;90(3):315-26. 2005.

MAKDISSE M, NASCIMENTO NETO R, CHAGAS ACP, BRASIL D, BORGES JL, OLIVEIRA A. Versão em português, adaptação transcultural e validação do questionário de claudicação de Edimburgo". **Arq Bras Cardiol**. 88 (5): 501-6. 2007.

MARHABA R, ZÖLLER M. CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. **J Mol Histol**. Mar;35(3):211-31. 2004.

MARSBOOM G, JANSSENS S. Endothelial progenitor cells: new perspectives and applications in cardiovascular therapies. **Expert Rev Cardiovasc Ther**. 6(5):687-701. 2008.

MENGER MD, LEHR HA. Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo. **Immunol Today**. Nov;14(11):519-22. 1993.

MOSES, M.A. The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Stem Cells**, 15, 180-9. 1997.

MUKHERJEE D.; EAGLE K. The importance of early diagnosis and treatment in peripheral arterial disease: insights from the PARTNERS and REACH registries. **CurrVasc. Pharmacol**. May; 1;8(3):293-300. 2010.

MURABITO JM, EVANS JC, LARSON MG, NIETO K, LEVY D, WILSON PW The ankle-brachial index in the elderly and risk of stroke, coronary disease, and death: the Framingham Study.; Framingham Study. **Arch Intern Med**. Sep 8;163(16):1939-42. 2003.

MURPHY MP, LAWSON JH, RAPP BM, DALSING MC, KLEIN J, WILSON MG, HUTCHINS GD, MARCH KL.. Autologous bone marrow mononuclear cell therapy is safe and promotes amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. **J Vasc Surg**. Apr 21. 2011.

NÁCHER M, BLÁZQUEZ AB, SHAO B, MATESANZ A, PROPHETE C, BERIN MC, FRENETTE PS, HIDALGO A. Physiological Contribution of CD44 as a Ligand for E-Selectin during Inflammatory T-Cell Recruitment. **Am J Pathol**. May;178(5):2437-46. 2011.

NARUSE K, HAMADA Y, NAKASHIMA E, KATO K, MIZUBAYASHI R, KAMIYA H, Therapeutic neovascularization using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy. **Diabetes**. Jun;54(6):1823-8. 2005.

NIELS VAN ROYEN: Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. **Cardiovascular Res**,; 543-553. 2001.

NISSEN C, TICHELLI A, GRATWOHL A, SPECK B, MILNE A, GORDON-SMITH EC, SCHAEDELIN, J. Failure of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy in aplastic anemia patients with very severe neutropenia. **Blood**. Dec;72(6):2045-7. 1988.

NORGREN L. ,HIATT A. W.R. , DORMANDY B J.A., NEHLER M.R. , HARRIS K.A. Inter-Society Consensus for the Management of peripheral arterial disease (TASC II). **Eur J Vasc Endovasc Surg**. 33:S5-S75. 2007.

NUMAGUCHI Y, SONE T, OKUMURA K, ISHII M, MORITA Y, KUBOTA R, YOKOUCHI K, IMAI H, HARADA M, OSANAI H, KONDO T, MUROHARA T. The impact of the capability of circulating progenitor cell to differentiate on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. **Circulation**. Jul 4;114(1 Suppl):1114-9. 2006.

Oh IY, Yoon CH, Hur J, Kim JH, Kim TY, Lee CS, Park KW, Chae IH, Oh BH, Park YB, Kim. Involvement of E-selectin in recruitment of endothelial progenitor cells and angiogenesis in ischemic muscle. **Blood**. 2007 Dec 1;110(12):3891-9.

OSSELAER NV, RAMPART M, HERMAN AG. Differential inhibition of polymorphonuclear leukocyte recruitment in vivo by dextran sulphate and fucoidan. **Mediators Inflamm**.;5(5):346-57. 1996.

PALMER-KAZEN U, WAHLBERG E: Arteriogenesis in peripheral arterial disease. **Endothelium**.; 10:225-232. 2003.

PAPETTI M, HERMAN IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. **Am J Physiol Cell Physiol**. 282(5):C947-70. 2002.

PASSOS VMA, BARRETO SM, GUERRA HL, FIRMO JOA, VIDIGAL PG, LIMA-COSTA MFF. The Bambuí Health and Aging Study (aBHAS): prevalence of intermittent claudication in the aged population of the community of Bambuí and its associated factors. **Arq Bras Cardiol**. 77: 458-62. 2001.

PEICHEV M, NAIYER AJ, PEREIRA D, ZHU Z, LANE WJ, WILLIAMS M, OZ MC, HICKLIN DJ, WITTE L, MOORE MA, RAFII S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. **Blood**. Feb 1;95(3):952-8. 2000.

QIN G, II M, SILVER M, WECKER A, BORD E, MA H, GAVIN M, GOUKASSIAN DA, YOON YS, PAPANNOPOULOU T, ASAHARA T, KEARNEY M, THORNE T, CURRY C, EATON L, HEYD L, DINESH D, KISHORE R, ZHU Y, LOSORDO DW. Functional disruption of alpha4 integrin mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitors and augments ischemic neovascularization. **J Exp Med**. Jan 23;203(1):153-63. 2006.

RUDERMAN, N.B., WILLIAMSON, J.R. & BROWNLEE, M. Glucose and diabetic vascular disease. **Faseb J**, 6, 2905-14. 1992.

RÜSTER B, GÖTTIG S, LUDWIG RJ, BISTRAN R, MÜLLER S, SEIFRIED E, GILLE J, HENSCHLER R. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. **Blood**. Dec 1;108(12):3938-44. 2006.

SAAB F, MUKHERJEE D, GURM H, MOTIVALA A, MONTGOMERY D, KLINE-ROGERS E, RUBENFIRE M, EAGLE KRISK Factors in first presentation acute

coronary syndromes (ACS): how do we move from population to individualized risk prediction?. **Angiology**. Dec-2010 Jan;60(6):663-7. 2009.

SALAMEH MJ, RATCHFORD EV. Update on peripheral arterial disease and claudication rehabilitation. **Phys Med Rehabil Clin N Am**. Nov;20(4):627-56. 2009.

SANG-MO KWON, YUN-KYUNG LEE, AYUMI YOKOYAMA, SEOK-YUN JUNG, HARUCHIKA MASUDA, ATSUHIKO KAWAMOTO, YOU MIE LEE, TAKAYUKI ASAHARA. Differential activity of bone marrow hematopoietic stem cell subpopulations for EPC development and ischemic neovascularization. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. 2011.

SCHÄCHINGER V, ERBS S, ELSÄSSER A, HABERBOSCH W, HAMBRECHT R, HÖLSCHERMANN H, YU J, CORTI R, MATHEY DG, HAMM CW, SÜSELBECK T, WERNER N, HAASE J, NEUZNER J, GERMING A, MARK B, ASSMUS B, TONN T, SCHAPER W. On arteriogenesis--a reply. **Basic Res Cardiol**. May;98(3):183-4. 2003.

SCHIRMER S H.; VAN NOOIJEN F C.; PIEK J J.; VAN ROYEN N. Stimulation of collateral artery growth: travelling further down the road to clinical application. **Heart**.95:191-197. 2009.

SCHLINGEMANN, R.O., RIETVELD, F.J., KWASPEN, F., VAN DE KERKHOF, P.C., DE WAAL, R.M. & RUITER, D.J. Differential expression of markers for endothelial cells, pericytes, and basal lamina in the microvasculature of tumors and granulation tissue. **Am J Pathol**, 138, 1335-47. 1991.

SCHMITT-SODY M, METZ P, GOTTSCHALK O, BIRKENMAIER C, ZYSK S, VEIHELMANN A, JANSSON V. Platelet P-selectin is significantly involved in leukocyte-endothelial cell interaction in murine antigen-induced arthritis. **Platelets**. Aug;18(5):365-72. 2007.

SCHOLZ D., THOMAZ S., SASS S., PODZUWEIT T. Angiogenesis and myogenesis as two facets of inflammatory post-ischemic tissue regeneration. **Mol Cell Biochem**. Apr;246(1-2):57-67. 2003.

SHIREMAN P. K.; CONTRERAS-SHANNON V., OCHOA O., KARIA B. P., MICHALEK J. E., MCMANUS L.M. MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration. **J Leukoc Biol**. Mar;81(3):775-85. 2006.

SHIREMAN P. K.; QUINONES M. P. Differential necrosis despite similar perfusion in mouse strains after ischemia. **J Surg Res**. Dec;129(2):242-50. 2005.

SINGH S.; EVANS L., DATTA D., GAINES P., BEARD J. D.; The costs of managing lower limb-threatening ischaemia. **Eur j vasc endovasc surg.** OCT;12(3):359-62. 1996.

SPRENGERS RW, LIPS DJ, MOLL FL, VERHAAR MC. Progenitor cell therapy in patients with critical limb ischemia without surgical options. **Ann Surg.** Mar;247(3):411-20. 2008.

STETLER-STEVENSON, W.G. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. **J Clin Invest,** 103, 1237-41. 1999.

TANG GL, CHANG DS, SARKAR R; WANG R, MESSINA LM. The effect of gradual or acute arterial occlusion on skeletal muscle blood flow, arteriogenesis, and inflammation in rat hindlimb ischemia. **Journal of vascular surgery.** Feb;41(2):312-20. 2005.

TATEISHI-YUYAMA E, MATSUBARA H, MUROHARA T, IKEDA U, SHITANI S, MASAKI H, AMANO K, KISHIMOTO Y, YOSHIMOTO K, AKASHI H, SHIMADA K, IWASAKA T, IMAIZUMI T: Therapeutic angiogenesis using cell transplantation (TACT) study investigators; Therapeutic angiogenesis for patients for limb ischemia by autologous transplantations of bone marrow cells: a pilot study and randomized controlled trial. **Lancet,**; 360:427-435. 2002.

UNIVERSITY OF VIRGINIA, HEARTH SYSTEM. Doença arterial periférica. Disponível na Internet no endereço: <http://uvahealth.com/services/vascular-center/treatment/peripheral-arterial-disease>.

URBICH C, DIMMELER S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. **Circ Res.** Aug 20;95(4):343-53. 2004.

VAJKOCZY P, BLUM S, LAMPARTER M, MAILHAMMER R, ERBER R, ENGELHARDT B, VESTWEBER D, HATZOPOULOS AK. Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. **J Exp Med.** Jun 16;197(12):1755-65. 2003.

VAN ROYEN N, PIEK JJ, BUSCHMANN I, HOEFER I, VOSKUIL M, SCHAPER W. Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. **Cardiovasc Res.** Feb 16;49(3):543-53. 2001.

WAHLBERG E. Angiogenesis and arteriogenesis in limb ischemia. **J Vasc Surg.** Jul;38(1):198-203. 2003.

WALBERG E. Angiogenesis and arteriogenesis in limb ischemia. **Journal of vascular surgery**.38:198-203. 2003.

WANG W, LIU C, QIAO T, LIU C, HUANG D. Clinical efficacy of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in treating lower limb thromboangiitis obliterans. **Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi**. Apr;24(4):420-3. 2010.

WEEL V, TONGEREN RB, HINSBERGH VW, BOCKEL JH, QUAX PH. Vascular growth in ischemic limbs: a review of mechanisms and possible therapeutic stimulation. **Annals of vascular surgery**. Jul-Aug;22(4):582-97. 2008.

WHALEN, G. F, & ZETTER, B. R. Wound Healing: Biochemical and Clinical Aspects. **Angiogenesis**. 77-95. 1992.

WONG CH, HEIT B, KUBES P. Molecular regulators of leucocyte chemotaxis during inflammation. **Cardiovasc Res**. May 1;86(2):183-91. 2010.

YAMAMOTO K, KONDO T, SUZUKI S, IZAWA H, KOBAYASHI M, EMI N, KOMORI K, NAOE T, TAKAMATSU J, MUROHARA T. Molecular evaluation of endothelial progenitor cells in patients with ischemic limbs: therapeutic effect by stem cell transplantation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. Dec;24(12):e192-6. 2004.

YILMAZ G, VITAL S, YILMAZ CE, STOKES KY, ALEXANDER JS, GRANGER DN. Selectin-mediated recruitment of bone marrow stromal cells in the postischemic cerebral microvasculature. **Stroke**. Mar;42(3):806-11. 2011.

YOSHIDA J, OHMORI K, TAKEUCHI H, SHINOMIVA K, NAMBA T, KONDO I, KIYOMOTO H, KOHNO M. Treatment of ischemic limbs based on local recruitment of vascular endothelial growth factor-producing inflammatory cells with ultrasonic microbubble destruction. **Journal american college of cardiology**. Sep 6;46(5):899-905. 2005.

ZAMPETAKI A, KIRTON JP, XU Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells. **Cardiovasc Res**. Jun 1;78(3):413-21. 2008.

ZENGIN E, CHALAJOUR F, GEHLING UM, ITO WD, TREEDE H, LAUKE H, WEIL J, REICHENSPURNER H, KILIC N, ERGÜN S. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. **Development**. Apr;133(8):1543-51. 2006.