

JULIANA APARECIDA PRETO DE GODOY

**"INFLUÊNCIA DOS GLICOSAMINOGLICANOS E
DA TERAPIA CELULAR NA INFLAMAÇÃO APÓS
LESÃO ARTERIAL EM CAMUNDONGOS."**

**"INFLUENCE OF GLYCOSAMINOGLYCANS AND
CELLULAR THERAPY IN THE INFLAMMATION
AFTER ARTERIAL LESION IN MICE."**

Campinas, 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

JULIANA APARECIDA PRETO DE GODOY

**"Influência dos glicosaminoglicanos e da terapia celular
na inflamação após lesão arterial em camundongos"**

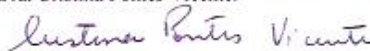
Orientadora: Dra. Cristina Pontes Vicente

**"Influence of glycosaminoglycans and cellular therapy in
the inflammation after arterial lesion in mice"**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutora em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.

Doctorate thesis presented to the State University of Campinas in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Cellular and Structural Biology, Postgraduate Program in Cellular and Structural Biology, in the Biology Institute, in the area of Cellular Biology.

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna *Juliana Aparecida Preto de Godoy* e orientada pela Dra. Cristina Pontes Vicente.



Assinatura da Orientadora

Campinas, 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

G548i Godoy, Juliana Aparecida Preto de, 1983-
Influência do glicosaminoglicanos e da terapia celular na inflamação após
lesão arterial em camundongos / Juliana Aparecida Preto de Godoy. – Campinas,
SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Cristina Pontes Vicente.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Glicosaminoglicanos. 2. Inflamação. 3. Aterosclerose. 4. Células-tronco. 5.
Endotélio. I. Vicente, Cristina Pontes, 1965-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Influence of glycosaminoglycans and cellular therapy in the
inflammation after arterial lesion in mice

Palavras-chave em inglês:

Glycosaminoglycans

Inflammation

Atherosclerosis

Stem cells

Endothelium

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Cristina Pontes Vicente [Orientador]

Arnaldo Rodrigues dos Santos Junior

Helena Coutinho Franco de Oliveira

Silvia Borges Pimentel de Oliveira

Alexandre Bruni Cardoso


Data de defesa: 29-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 29 de agosto de 2014.

BANCA EXAMINADORA

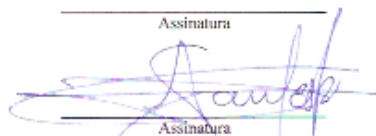
Dra. Cristina Pontes Vicente (Orientadora)


Assinatura

Dr. Paulo Antonio de Souza Mourão

Assinatura

Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Junior


Assinatura


Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira


Assinatura

Dr. Fábio Trindade Maranhão Costa

Assinatura

Dra. Silvia Borges Pimentel de Oliveira


Assinatura

Dr. Alexandre Bruni Cardoso


Assinatura

Dra. Fernanda Gonçalves Pereira Cunha

Assinatura

RESUMO

A aterosclerose é uma doença que acomete os vasos sanguíneos através da formação exacerbada de placas de gordura, interrompendo o fluxo de sanguíneo. A intervenção cirúrgica mais utilizada nesses casos é a angioplastia coronária percutânea, entretanto, esse procedimento pode ocasionar uma lesão ao endotélio, onde os processos trombótico e inflamatório são iniciados. Neste processo ocorre o recrutamento de células inflamatórias e a migração e adesão das células progenitoras endoteliais (CPE) para o local da lesão de modo a recuperar o dano endotelial. As CPE são células existentes na população de células mononucleares (MNC) da medula óssea e podem estar envolvidas no processo de reparo endotelial. Os glicosaminoglicanos, como o dermatan sulfato (DS) e o condroitin sulfato fucosilado (CSF), são moléculas que atuam como agentes antitrombóticos, anticoagulantes e anti-inflamatórios. Neste estudo, analisamos a influência do DS e CSF e da terapia com CPE na inflamação e trombose após lesão arterial em camundongos selvagens (C57BL/6) e deficientes em apolipoproteína E (ApoE^{-/-}). Todos os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico na artéria carótida comum esquerda, mimetizando a lesão causada por angioplastia em humanos. Proteínas/fatores envolvidos nos processos iniciados logo após a lesão endotelial foram analisados por western blotting (ICAM-1, P-selectina, eNOS e SDF-1) e por Elisa (TNF- α , IL-10, SDF-1 e TGF- β); as artérias carótidas lesionadas foram analisadas histologicamente para se verificar a formação de trombo e a atividade de gelatinases por zimografia 'in situ'. Todas as análises foram realizadas 1 e 3 dias após a lesão arterial. Observamos nos camundongos C57BL/6 que o tratamento com DS foi capaz de diminuir a reação inflamatória inicial e, ao mesmo tempo, estimular a migração de células progenitoras para o local da lesão; tal resultado foi observado em relação ao uso de CSF, apesar deste não prevenir a formação de trombo. A terapia utilizando MNC isoladas ou em conjunto com DS ou CSF aumentou a resposta inflamatória inicial. O uso de CPE também ocasiona essa resposta, mas quando utilizamos a EPC junto com DS obtemos uma menor resposta inflamatória e, ao mesmo tempo, aumento da expressão de eNOS, melhorando o tônus vascular. Nos camundongos ApoE^{-/-}, os tratamentos não foram capazes de melhorar a resposta inflamatória; o tratamento com CPE e CSF foi o mais eficaz, diminuindo a resposta inflamatória e melhorando o tônus vascular. Concluimos que as

terapias com os glicosaminoglicanos (DS ou CSF) foram capazes de diminuir as respostas trombóticas e inflamatórias iniciais. Além disso, que a injeção de MNC leva a um aumento da resposta inflamatória provavelmente devido ao caráter inflamatório destas células. Concluimos, que os GAGs podem estar atuando como moléculas de quimioatração das células ao mesmo tempo em que evitam a trombose e inflamação iniciais exacerbadas e que podem ser utilizados como agentes coadjuvantes na terapia celular para a recuperação de dano endotelial.

ABSTRACT

Atherosclerosis is a disease that undertakes blood vessels by exacerbated atheroma plaque formation, and blocking blood flow. The most used surgical intervention in these cases is the angioplasty, however, this procedure can cause a lesion to the endothelium, where thrombotic and inflammatory processes are initiated, recruiting inflammatory cells to the lesion site and also promoting migration and adhesion of endothelial progenitor cells (EPC) in order to recovery endothelial damage. Glycosaminoglycans (GAGs), like dermatan sulfate (DS) and fucosylated chondroitin sulfate (FCS), are molecules that act as antithrombotic, anticoagulant and anti-inflammatory agents. EPC are cells that exist in bone marrow mononuclear (MNC) cells fraction population and can be involved in vascular repair. In this study, we analyzed the influence of DS and FCS and cellular therapy using EPC in inflammation and thrombosis after arterial lesion in wild-type (C57BL6) and apolipoprotein E deficient (ApoE^{-/-}) mice. All animals were submitted to a surgical procedure in the left common carotid artery, mimicking the lesion caused by angioplasty in humans. Proteins/factors involved in the initial process after an endothelial lesion were analyzed by western blotting (ICAM-1, P-selectina, eNOS and SDF-1) and by Elisa (TNF- α , IL-10, SDF-1 and TGF- β); lesioned carotid artery were analyzed histologically to verify thrombus formation and gelatinase activity by zimography 'in situ'. All analyzes were done 1 and 3 days after arterial lesion. We observed that C57BL6 mice treatment with DS was able in decrease the initial inflammatory reaction and, at the same time, stimulate progenitor cells migration to the lesion site; this result was also observed in relation to FCS use, despite its did not prevent thrombus formation. Therapy using MNC alone or with DS or FCS increased the initial inflammatory response. Use of EPC also promoted this response but when used together with DS, we can obtain a decreased inflammatory response and, at the same time, an increased in the eNOS expression, improving vascular tonus. In ApoE^{-/-} mice, treatments were not able in improving inflammatory response; treatment with EPC and FCS was the one with best action, decreasing inflammatory response and improving the vascular tonus. GAGs (DS or FCS) therapy was able to decrease the initial inflammation. Besides, MNC injection leads to an increase in inflammation probably due to its inflammatory characteristics. We conclude that GAGs can

be acting quimio-attracting molecules to the cells and, at the same time, avoiding the initial thrombosis and inflammation after injury and they can be used as supporting agents in cellular therapy use to help in vascular recovery after injury.

Sumário

I.	LISTA DE ABREVIATURAS.....	xix
II.	INTRODUÇÃO.....	1
1.	Impacto das doenças cardiovasculares.....	1
2.	O endotélio.....	3
3.	A aterosclerose.....	6
a.	Moléculas de adesão.....	8
b.	Óxido nítrico sintase endotelial.....	10
c.	Fator derivado de estroma 1.....	13
d.	Fator beta de crescimento.....	14
e.	Fator de necrose tumoral.....	14
f.	Interleucina-10.....	15
4.	Regeneração vascular.....	16
5.	Células progenitoras endoteliais.....	16
6.	O dermatan sulfato.....	18
7.	Condroitin sulfato fucosilado.....	20
8.	Modelo de aterosclerose.....	21
III.	OBJETIVO GERAL.....	23
IV.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
V.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
VI.	RESULTADOS.....	37
VII.	DISCUSSÃO.....	117
VIII.	RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS.....	131
IX.	CONCLUSÃO.....	133
X.	BIBLIOGRAFIA.....	135
XI.	COMITÊ DE ÉTICA.....	155
XII.	ANEXOS.....	157
1.	Expressão Gênica PCR Real Time.....	157

Dedico

À minha família....

MEU PORTO SEGURO

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Martin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela força e determinação durante essa caminhada. Por me dar a certeza de que tudo dará certo e que as coisas se ajeitam no momento exato.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente pelo companheirismo, confiança e ética durante a execução desse trabalho. Obrigada pelo enorme contribuição no meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada pelos ensinamentos!!

Aos Professores: Dr. José Camillo Novelo, Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira e Dra. Mary Anne Heidi Dolder pelo cuidado e atenção durante a qualificação da tese e pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Claudio Werneck pela disposição, atenção e excelentes sugestões durante o aprimoramento deste trabalho.

Ao Professor Dr. Mervin C. Yoder pela oportunidade de trabalho no Herman B Wells Center for Pediatric Research, na Indiana University School of Medicine. Este estágio teve enorme contribuição na minha formação profissional e pessoal. As discussões e participação em projetos paralelos do laboratório foram enriquecedores. Estendo meus agradecimentos aos funcionários

Chris, Mike e Momoko pelo indispensável auxílio nos experimentos e análises.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural e a todos os seus docentes, os quais lutam para que esse curso seja reconhecido como um dos melhores do país.

A secretária Lílíam Alves Senne Panagio, pela eficiência e enorme auxílio concedido durante esses anos de UNICAMP, principalmente nos momentos antecedentes à tese.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo imprescindível suporte financeiro.

Aos meus amigos de laboratório, Giane, Michelli e Denise. Obrigada por me auxiliarem quando precisei ou simplesmente me escutarem quando eu precisava desabafar.

Aos colegas de trabalho: Ju Nascimento, Maria, Débora, Cíntia, Daniel, Alessandra, Taize, Andrea, Guilherme, Cris, Stênio, Kaleb, Ana e todos os que ali passaram durante esses anos.

Aos colegas da Proteômica: Talita, Daniela, Camila e Neto. Obrigada por sempre me receberem tão bem e por me auxiliarem quando eu precisei.

Aos meus amigos, Danilo, Rony e Sílvia, pelos inúmeros almoços juntos. Obrigada por me escutarem nos momentos felizes e, principalmente, naqueles em que eu apenas precisava que me escutassem. Agradeço por saber que vocês sempre estarão ao meu lado, independente do que aconteça.

À minha amiga pedreirense, Ju, pelos incontestáveis conselhos pessoais e profissionais, pelas reuniões de fim de tarde, pelas saídas aos finais de semana, pelos puxões de orelha (Eu sei que merecia...rsrs) e pela sua presença, SEMPRE! Muito obrigada!

A todos os amigos de faculdade (Biologia Rio Claro 2003) pelos encontros, mesmo de vez em quando. Vocês não imaginam como me fazem bem. Amo, adoro e é 10!!! SEMPRE!!!

Aos meus pais, Flávio e Cleide, pelo exemplo de vida e pelos sacrifícios que fizeram para me proporcionar todas as oportunidades, possibilitando a realização de inúmeros sonhos. Amo vocês! SEMPRE!!

Ao meu irmão, pela torcida e pelo apoio. SEMPRE! Te amo!

A meus primos, tios e tias, obrigada por acreditarem em mim, me apoiarem e me proporcionarem momentos inesquecíveis. E a família crescendo: Helena estamos te aguardando!

Ao meu tio Chinês, meu avô Mário e meu tio Zé (in memoriam). Sei que onde vocês estiverem, estão sempre torcendo por mim.

As minhas avós, Elvira e Amabile, pelos exemplos de vida e sábios conselhos.

Enfim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente fizeram parte dessa caminhada, me apoiando (Enquanto eu tiver perguntas e não houver respostas... continuarei a escrever... - Clarice Lispector).

I. LISTA DE ABREVIATURAS

AC133: marcador células-tronco hematopoiéticas
ApoE^{-/-}: camundongo deficiente na apolipoproteína E
CD34: cluster of differentiation 4
CML: células musculares lisas
COX-2: ciclo-oxigenase-2
CPE: célula progenitora endotelial
CSF: condroitin sulfato fucosilado
CXCR4: receptor quimiocina CXC-4
DMEN: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DS: dermatan sulfato
EGM-2: meio de crescimento endotelial-2
eNOS: óxido nítrico sintase endotelial
FT: fator tecidual
FvW: fator de vonWillebrand
GAG: glicosaminoglicano
HCII: cofator II da heparina
HDL: lipoproteínas de alta densidade
ICAM-1: molécula de adesão intercelular 1
IL-10: interleucina 10
IL-8: interleucina 8
LDL: lipoproteínas de baixa densidade
LPS: lipopolissacarídeos
MMP: metaloproteinase
MNC: células mononucleares
NF-κB: fator nuclear κB
NO: óxido nítrico
ROS: espécies reativas de oxigênio

SDF-1: fator derivado de estroma 1

TGF β : fator de crescimento transformante β

TIMP: inibidores teciduais de metaloproteinase

TNF α : fator de necrose tumoral α

TT: tempo de trombina

TTPa: tempo de tromboplastina parcial ativada

VCAM-1: molécula de adesão celular vascular-1

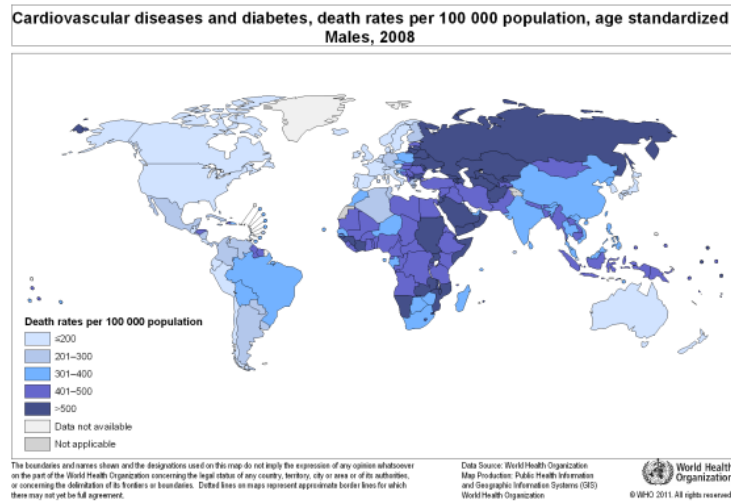
VEGFR2: receptor do fator de crescimento vascular 2

II. INTRODUÇÃO

1. Impacto das doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) houve um total de aproximadamente 16 milhões de mortes no ano de 2011 devido a doenças cardiovasculares, sendo que 7 milhões foram relacionadas a doenças cardíacas isquêmicas (Global Health Estimates, 2013 – http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/). Apesar de uma tendência global crescente, a sua incidência tende a diminuir nos países desenvolvidos. Tal fato talvez esteja relacionado a uma maior conscientização da população acerca dos fatores de risco e, em especial, aos avanços científicos que possibilitaram o desenvolvimento de meios de diagnóstico e tratamentos. De acordo com o gráfico mostrado na figura 1 obtido do site da OMS (WHO, 2011), as maiores taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares e diabetes se localizam em países com índices menores de industrialização tanto em pessoas do sexo masculino como do sexo feminino.

(A)



(B)

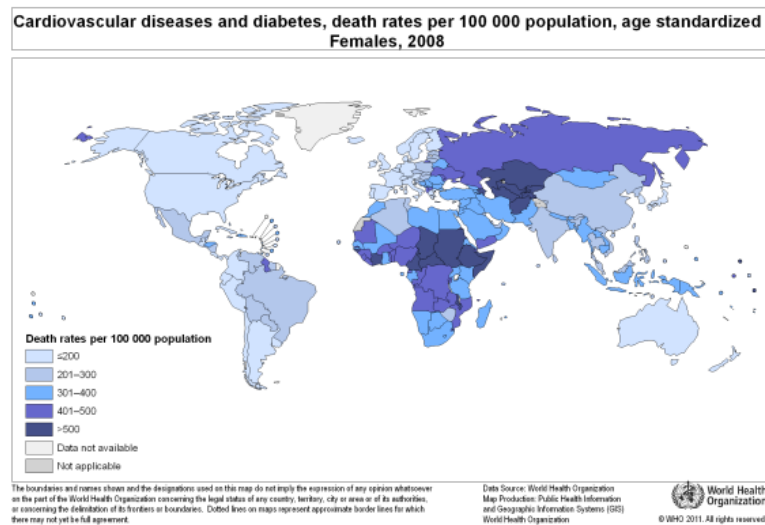


Figura 1. Mortalidade por doenças cardiovasculares e diabetes em (A) homens e (B) mulheres. As doenças cardiovasculares apresentam prevalência na taxa de mortalidade em países subdesenvolvidos devido à dificuldade de acesso a tratamentos inovadores e falta de conhecimento acerca dos fatores de risco para essas doenças.

Ainda de acordo com a OMS (WHO, 2011), o Brasil apresentou um índice de 33% de mortalidade por doenças cardiovasculares, sendo a principal causa de morte entre a população em geral (http://www.who.int/nmh/countries/bra_en.pdf?ua=1).

Diante dos óbitos relacionados a doenças cardiovasculares, os gastos com o tratamento dessas enfermidades é uma preocupação presente nos sistemas de saúde de inúmeros países e regiões do mundo. De acordo com Nichols et al. (2012), os custos diretos dos sistemas de saúde com as doenças cardiovascular foi de aproximadamente € 106 bilhões em 2009 nos países europeus; entretanto os custos totais, onde se somam a perda de produtividade devido à mortalidade e morbidade e os custos informais, chegam a € 195 bilhões.

2. O endotélio

A hemostasia é o processo pelo qual o organismo evita a perda sanguínea ou formação de trombos devidos a uma lesão vascular. O equilíbrio natural entre os sistemas pró e anti-coagulantes garantem o êxito da hemostasia; distúrbios nesse equilíbrio podem resultar em hemorragias ou formação de trombos (Dahlbäck, 2000).

O sistema vascular é composto por inúmeros vasos (artérias, arteríolas, veias, vênulas e capilares) que carregam sangue levando oxigênio e nutrientes para os vários tecidos do corpo. O lúmen dos vasos é revestido pelo endotélio, que é constituído por uma monocamada de células que reveste a superfície interna dos vasos sanguíneos e que está em íntimo contato com o sangue; essa camada está apoiada sobre uma matriz extracelular composta por uma série de proteínas sintetizadas pelas células endoteliais como colágeno, laminina, fibronectina, proteoglicanos e proteases (Sumpio et al., 2002).

O endotélio produz importantes fatores regulatórios como a prostaciclina (prostaglandina I₂) e óxido nítrico (NO) onde ambos atuam de modo a promover o relaxamento das células musculares lisas e inibir a ativação plaquetária (Moncada e Higgs, 2006). Em um endotélio saudável, o NO e prostaciclina mantêm os níveis ótimos de pressão sanguínea, reduzem a força de cisalhamento e inibem a ativação plaquetária. Modelos animais confirmam a função antitrombótica desses fatores; camundongos com falta da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) apresentam uma resposta vasodilatadora prejudicada nos vasos sanguíneos e camundongos, onde a ação de prostaciclina está alterada ou dependente de ciclo-oxigenase-2 (COX-2), apresentam uma predisposição a

eventos trombóticos (Funk e FitzGerald, 2007). Esses efeitos anti-trombóticos na parede vascular são abolidos quando ocorre lesão endotelial.

Em um estado normal, o endotélio não participa da ativação da coagulação possuindo em sua superfície luminal anticoagulantes naturais como proteoglicanos similares a heparina, inibidores do fator tecidual e a trombomodulina. Proteoglicanos similares a heparina aceleram a inibição das proteases envolvidas com coagulação através da anti trombina, cuja deficiência está associada a doenças trombóticas. A inibição do fator tecidual acontece pela reação reversível do complexo fator tecidual-fator VIIa-fator Xa. E a trombomodulina se liga a trombina e esse complexo leva a ativação da proteína C gerando proteína C ativa, a qual é anticoagulante degradando fator Va e VIIIa. Esses inibidores bloqueiam a iniciação da cascata de coagulação e também a formação de fibrinogênio mediada por trombina e ativação plaquetária (Esmon e Esmon, 2011).

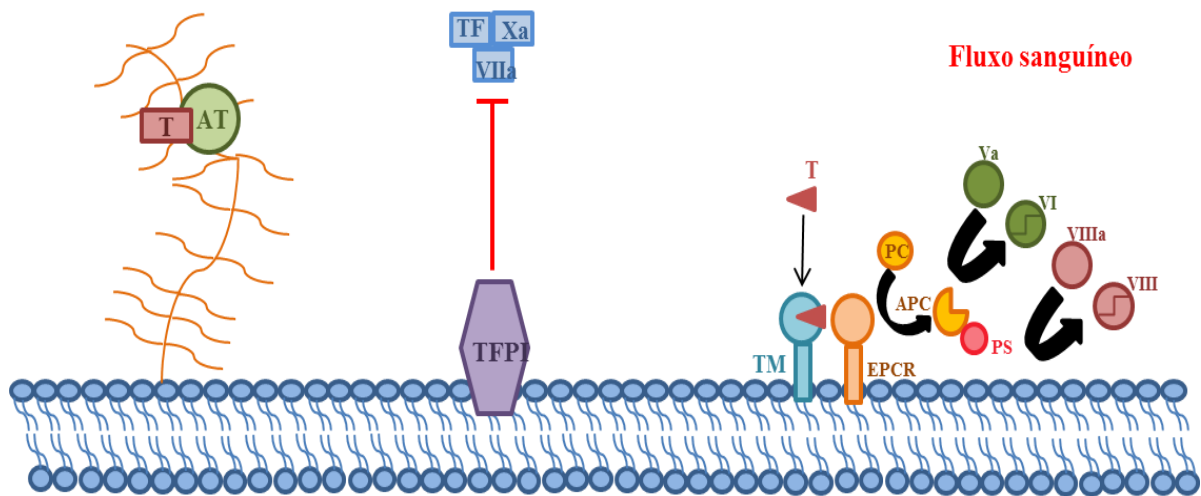


Figura 2. Características anticoagulantes das células endoteliais. (a) proteoglicanos similares a heparina estão localizados na superfície celular aumentando a capacidade de inibição da antitrombina (AT). (b) o inibidor da sinalização do fator tecidual (TFPI) inibe a habilidade do fator tecidual (TF) em iniciar a cascata de coagulação. TFPI se liga ao fator VIIa, o qual interage com o TF. Esta inibição é aumentada pela ligação com o fator Xa, também inibido pelo TFPI. (c) a atividade procoagulante de trombina (T) é inibida pela trombomodulina (TM) permitindo a ativação da proteína C (PC) pela trombina através da

via do receptor endotelial da proteína C (EPCR). A proteína C ativada (APC) se desacopla do EPCR e interage com a proteína S (PS), inativando o fator Va e VIIIa da cascata de coagulação (Figura modificada de Bouvy et al., 2014).

A maioria dos fatores de risco cardiovasculares ativam maquinarias moleculares no endotélio resultando na expressão de quimiocinas, citocinas e moléculas de adesão de modo a interagir com leucócitos e plaquetas (Hansson, 2005). A principal mudança envolvendo esse processo está na sinalização mediada por NO, a qual é silenciada através da ativação da sinalização mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS na presença de superóxido dismutase levam a geração de peróxido de hidrogênio, o qual do mesmo modo que NO, se difunde rapidamente pela célula e reage com grupamentos cisteína nas proteínas alterando sua função (Rhee, 2006). A sinalização de ROS endotelial pode ser iniciada por exposição à citocinas inflamatórias e fatores de crescimento e pela interação do endotélio com leucócitos; independente da origem de ROS, as interações entre ROS e NO iniciam um círculo vicioso, resultando em inflamação e ativação endotelial (Deanfield et al., 2007).

Danos químicos, como os ocorridos na disfunção endotelial, e mecânicos, como os que ocorrem em procedimentos cirúrgicos, causam a exposição do fator tecidual (FT) para o sangue circulante, o qual se liga ao fator VIIa; o complexo FT-fator VIIa inicia a coagulação sanguínea através da ativação do fator IX e X e suas respectivas serinas proteases (IXa e Xa) (Butenas et al., 2009).

O fator Xa gera traços de trombina, a qual pode ativar o fator XI, ativando XIa, o qual ativa novamente o fator IX; o fator IXa junto com o cofator VIIa gera mais fator Xa resultando em trombina suficiente para converter fibrinogênio em fibrina. Finalmente, polímeros de fibrina ligados ao fator XIIIa em conjunto com plaquetas e eritrócitos formam um coágulo sanguíneo (Winckers et al., 2013).

Em vasos lesionados, o FT é abundantemente expresso em placas ateroscleróticas e está superexpresso em células musculares lisas imediatamente após uma injúria arterial (Winckers et al., 2013).

3. A aterosclerose

A aterosclerose é uma doença que acomete as paredes arteriais e, geralmente, ocorre nas artérias de maior calibre. Se inicia com a retenção, oxidação e modificação lipídicas, o que provoca uma inflamação crônica, levando ao quadro de trombose ou estenose. As lesões ateroscleróticas podem causar estenose com o potencial de provocar isquemia distal letal ou podem provocar oclusão pela formação de trombos nas maiores artérias do coração, cérebro, membros inferiores e outros órgãos. As lesões se iniciam na camada íntima e progressivamente afetam toda a parede vascular, incluindo as camadas média e adventícia (Insull, 2009).

Inúmeros fatores de risco podem intensificar ou provocar a aterosclerose através de seus efeitos nas partículas lipoprotéicas de baixa densidade (LDL) e na inflamação. Entre esses fatores se incluem a hipertensão, tabagismo, diabetes mellitus, obesidade e predisposição genética (Insull, 2009).

A aterosclerose subclínica se desenvolve e progride silenciosamente ao longo de muitas décadas antes de repentinamente causar manifestações clínicas (Libby e Theroux, 2005). A presença de fatores de risco como hipercolesterolemia, hipertriglicemia, diabetes, tabagismo, hipertensão arterial e sedentarismo também ocasionam a disfunção endotelial e, podem conseqüentemente, ocasionar o desenvolvimento da aterosclerose (Stoll et al., 2008).

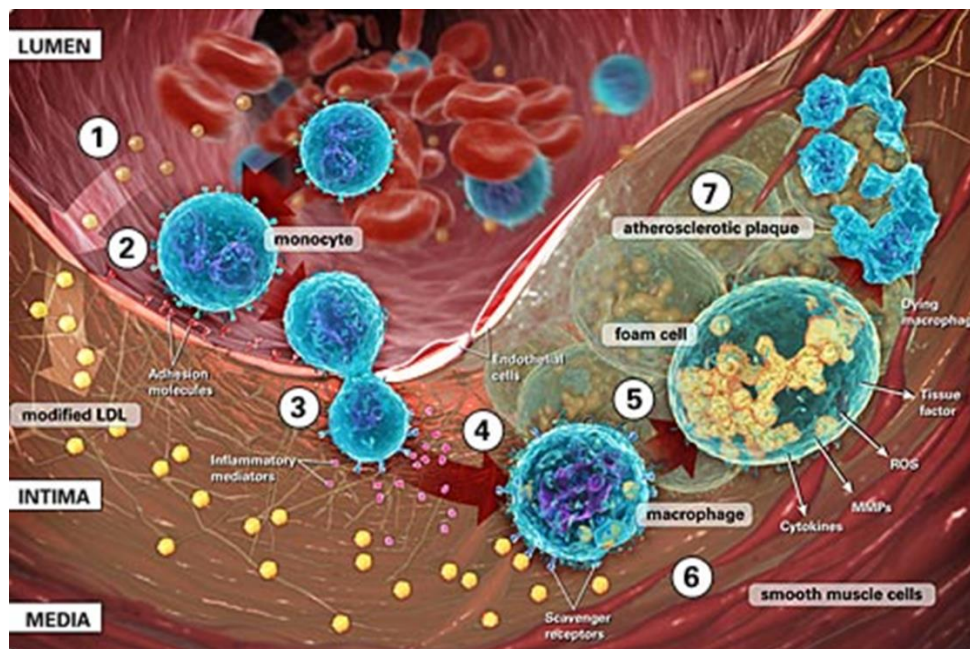


Figura 3. Essa figura esquematiza os passos no recrutamento de células da linhagem monocítica-macrofágica para a placa aterosclerótica em formação. Quando as células endoteliais são ativadas pela inflamação, elas aumentam a expressão de moléculas de adesão, recrutando inúmeros monócitos (2). Uma vez aderidos, esses monócitos realizam a diapedese por entre as células endoteliais, alcançando o espaço subendotelial (3). Os monócitos quando na parede vascular, adquirem características de macrófagos, expressando receptores do tipo *scavenger* que ligam partículas lipoprotéicas oxidadas (4) e as internalizam se diferenciando nas chamadas células espumosas (foam cells) (5). Essas células secretam inúmeras citocinas pró-inflamatórias, amplificando a resposta local com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). As células espumosas também produzem metaloproteinases (MMPs), degradando a matriz extracelular (6). Quando a placa se rompe, o sangue entra em contato com o fator tecidual, um potente pró-coagulante (7) (InVivo Communication Inc., Resverlogix Corp.)

Os principais tratamentos para a aterosclerose estão relacionados com procedimentos que levam a revascularização tais como, *bypass*, endarterectomia e angioplastia percutânea. Grande parte das lesões coronárias obstrutivas é passível de tratamento percutâneo, onde atualmente, se incluem a colocação de *stents* medicamentados com a redução das taxas de restenose, as quais variavam entre 0% em lesões altamente

selecionadas e maiores que 16% em uma ampla gama de pacientes e lesões. Apesar dos significativos avanços na tecnologia dos *stents* medicamentados, a chamada falha do *stent* (incidência de restenose com necessidade de revascularização local) é estimada entre 5 e 10%, com aproximadamente 200.000 revascularizações nos Estados Unidos (Farooq et al., 2011). A necessidade de procedimentos diagnósticos e terapêuticos repetitivos determina um marcante prejuízo à evolução dos pacientes que desenvolvem restenose e eleva, significativamente, os custos globais do tratamento.

A trombose e a retração elástica ocorrem momentos após a intervenção cirúrgica ocasionando tanto a hiperplasia da neointima (processo de reparo onde inúmeros fatores de coagulação e de inflamação são ativados, estimulação das células musculares lisas a proliferar e formação de matriz extracelular no local da lesão) como o remodelamento vascular, representando o maior contribuinte para a patologia da restenose (Kim e Dean, 2011).

A expressão de determinadas proteínas/fatores envolvidos na resposta inflamatória permite verificar a magnitude do processo inflamatório e da possível cicatrização/recuperação após lesão arterial; entre essas proteínas/fatores estão os responsáveis pela adesão de macrófagos e plaquetas (ICAM-1), adesão de leucócitos às células endoteliais (P-selectina) permeabilidade dos vasos sanguíneos (eNOS), migração de células progenitoras (SDF-1), fator de crescimento transformante β (TGF- β), o fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) e a interleucina Il-10, conhecida por seu efeito anti-inflamatório.

a. Moléculas de adesão

O endotélio desempenha uma importante função na regulação da resposta inflamatória. Moléculas de adesão como selectinas, receptores de imunoglobulina, integrinas e caderinas são expressas na superfície endotelial, participando de inúmeras interações. Em circunstâncias normais, elas medeiam interações entre células endoteliais e matriz e regulam a permeabilidade vascular. A expressão superficial das moléculas de adesão é alterada durante o processo inflamatório, participando de interações entre

leucócitos e a superfície endotelial ativada e também na ativação e extravasamento leucocitários.

As moléculas de adesão, receptores de membrana, são capazes de mediar inúmeras interações, reconhecidos por ter um papel fundamental numa variedade de fenômenos patológicos (Rojas e Ahmed, 1999; Jaitovich e Etcheverry, 2004; Batistatou et al., 2006). As selectinas participam da interação de baixa afinidade entre leucócitos e células endoteliais num processo chamado de rolamento leucocitário. Essa ligação transitória resulta em ativação leucocitária seguida de uma adesão mais firme e a migração transendotelial de leucócitos (Krieglstein e Granger, 2001; Yong e Khwaja, 1990; Tailor e Granger, 2000). A P-selectina é armazenada dentro de grânulos específicos, denominados corpos Weibel-Palade, a partir de onde são rapidamente mobilizadas para a superfície celular em resposta a uma variedade de agentes inflamatórios (Rondaij et al., 2006). Esses corpos fornecem ao endotélio a habilidade em responder rapidamente a mudanças no ambiente. O maior constituinte desses corpos é a proteína multimérica chamada de Fator de Von Willebrand (FVW) (Wagner et al., 1982; Reinders et al., 1984), a qual é requisitada para a correta homeostase através de sua função na adesão plaquetária em locais de injúria vascular (Rondaij et al., 2006). Além do FVW, inúmeros componentes são estocados nos corpos Weibel-Palade, o que torna o endotélio hábil em responder rapidamente a mudanças em seu micro-ambiente. Perturbação das células endoteliais e subsequente exocitose desses corpos pode iniciar a homeostase (FVW), induzir a vasoconstrição de modo a prevenir a perda desnecessária de componentes sanguíneos (endotelina-1), regular as respostas inflamatórias (P-selectina, interleucina-8, angiopoietina-2, CD63, α 1,3-fucosiltransferase VI, osteoprotegerina) e direcionar a fibrinólise (ativador do plasminogênio tecidual – tPA) (McEver et al., 1989; Utgaard et al., 1998; Ozaka et al., 1997; Kobayashi et al., 2000; Schnyder-Candrian et al., 2000; Huber et al., 2002; Fiedler et al., 2004; Zannettino et al., 2005).

Embora as selectinas atuem como mediadoras da adesão, elas não fornecem uma ancoragem firme. Para que tais eventos possam ocorrer, moléculas de superfície celular pertencentes a superfamília de genes da imunoglobulina estão envolvidas; entre essas

moléculas, destaca-se o papel desempenhado pela molécula de adesão intercelular denominada de ICAM (molécula de adesão intercelular).

As ICAM-1 estão estruturalmente relacionadas a glicoproteínas da superfamília das imunoglobulinas e são ligantes da integrina $\beta 2$ presente em leucócitos (Hubbard e Rothlein, 2000). A ICAM-1 está localizada na superfície apical e basolateral das células endoteliais de modo a facilitar a transmigração leucocitária nas reações inflamatórias (Hua, 2013) (Figura 4).

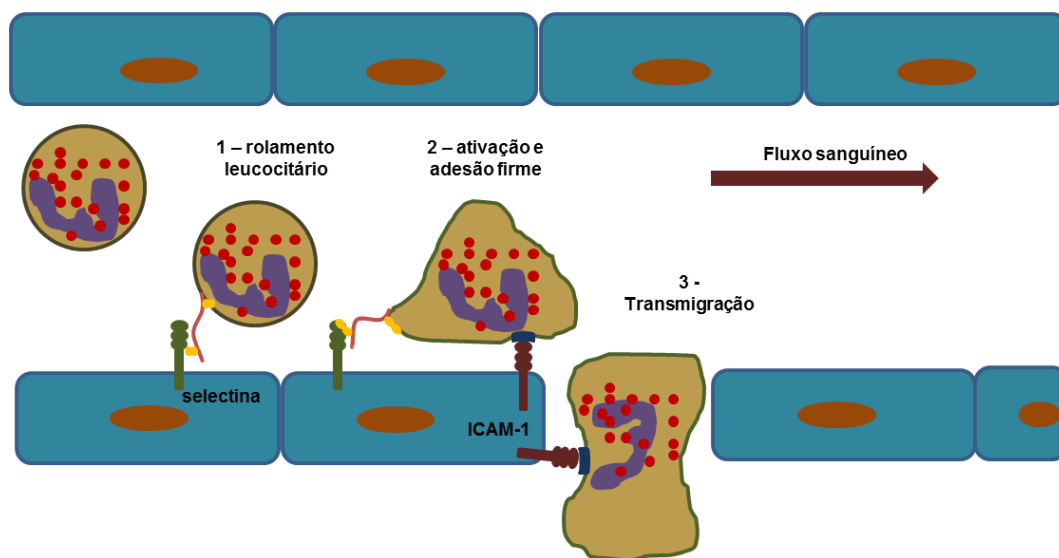


Figura 4. Adesão de leucócitos e, posterior transmigração para o espaço subendotelial.

Em resposta a fatores inflamatórios, moléculas de adesão como as selectinas estão mais expressas nas células endoteliais e leucócitos; os leucócitos são capazes de realizar o processo conhecido como 'rolamento' ao longo da parede endotelial através de ligações fracas mediadas por selectinas (1). Esse evento é seguido por uma adesão firme de leucócitos ao endotélio através da ligação de integrinas na superfície leucocitária às moléculas de ICAM-1 na superfície endotelial (2). Conseqüentemente, os leucócitos transmigram através da parede vascular (3). (adaptado de Yuan et al., 2012).

b. Óxido nítrico sintase endotelial.

A óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), é a forma principal de NOS presente no sistema vascular, sendo responsável pela produção de NO por esse tecido (Förstermann et

al., 1994). O NO vascular dilata todos os tipos de vasos sanguíneos através da estimulação da guanil ciclase solúvel e aumento da guanosina monofosfato cíclico (cGMP) nas células musculares lisas (CML) (Förstermann et al., 1994). A liberação de NO no lúmen vascular é um potente inibidor da adesão e agregação plaquetárias. O NO também pode inibir a adesão leucocitária à parede vascular tanto por interferir na habilidade adesiva da molécula de adesão leucocitária CD11/CD18 ou por inibir sua expressão em leucócitos. A adesão leucocitária é um dos eventos iniciais na formação da aterosclerose, ou seja, NO protege contra o início dessa patologia. O NO endotelial representa uma importante defesa anti-aterogênica no sistema vascular (Förstermann et al., 1994).

NO liberado como um mensageiro intercelular a partir do endotélio possui uma função importante na modulação do tônus microvascular e no fluxo sanguíneo local (Moncada et al., 1991).

O NO gerado pela eNOS é fisiologicamente importante para a homeostase vascular. O bloqueio da síntese de NO com inibidores farmacológicos causa vasoconstrição periférica e elevação da pressão sanguínea. Do mesmo modo, camundongos com defeito no gene de eNOS são hipertensos e apresentam vasodilatação mediada por NO (Huang et al, 2005). Inibidores farmacológicos da eNOS causam aterosclerose precoce em coelhos (Cayatte et al., 1994) e em camundongos (Kauser et al., 2000), e a deficiência genética de eNOS acelera o desenvolvimento da aterosclerose em camundongos ApoE^{-/-} (Kuhlencordt et al., 2001) (Figura 5).

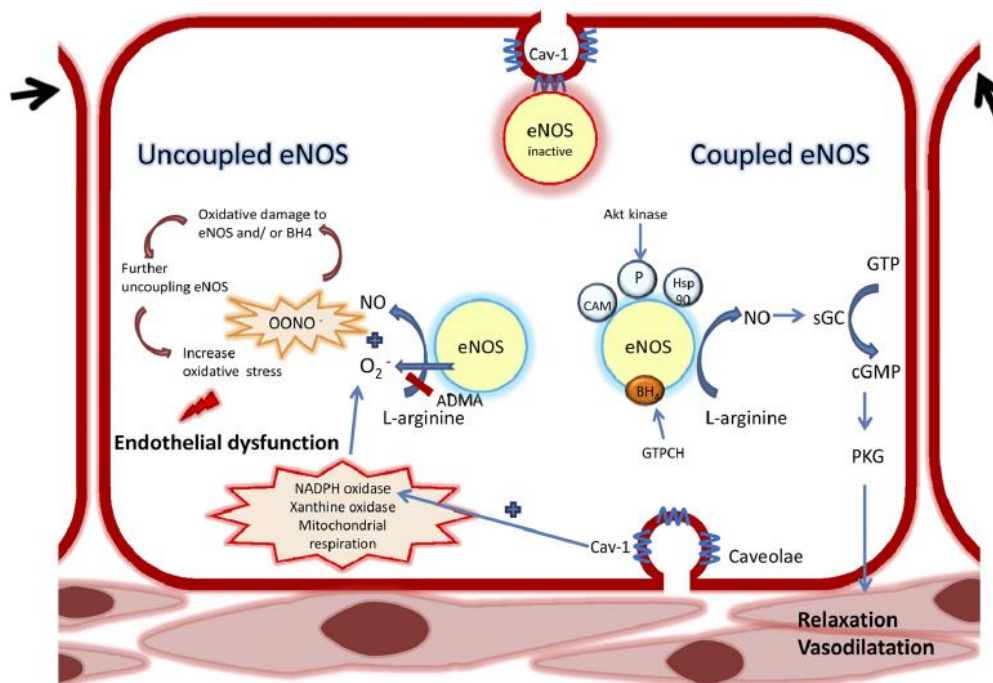


Figura 5. Função central do desacoplamento de eNOS na disfunção endotelial. eNOS está localizado nas cavéolas da membrana plasmática. Nas células endoteliais, eNOS está inativo quando ligado à caveolina 1 (cav-1); quando se torna ativo, eNOS se dissocia de cav-1 e se liga a calmodulina (Krieglstein e Granger) e proteína heat shock 90 (Hsp90) ao mesmo tempo em que ocorre a fosforilação de sítios de serina. A proteína eNOS funcional é um dímero (eNOS acoplado). Tetrahydrobiopterina (BH4) é um cofactor essencial para a ótima atividade de eNOS. BH4 facilita a transferência de elétrons do NADPH de eNOS reductase para o domínio de oxigenase, convertendo L-arginina em NO e L-citrulina. NO desempenha um importante papel no relaxamento das células musculares que circundam as arteríolas, mantendo a função vascular pela inibição da vasoconstrição. Agregação plaquetária, adesão leucocitária e proliferação celular através da cascata de sinalização dependente de cGMP. A interação entre L-arginina e dimetilarginina assimétrica (ADMA: inibidor endógeno de eNOS) atuam como competidores direto por eNOS. Quando níveis de L-arginina ou BH4 estão inadequados, eNOS se torna instável e se desacopla, levando a uma menor produção de NO e maior geração de superóxido. Além disso, interação entre NO e superóxidos leva a formação de peroxinitrito, um potente oxidante, o qual oxida BH4,

resultando em maior quantidade de eNOS desacoplado, com subsequente disfunção endotelial. (Kietadisorn et al. 2012).

c. Fator derivado de estroma 1

O fator derivado do estroma 1 (SDF-1) é constitutivamente expresso em células estromais da medula óssea e regula inúmeros processos fisiológicos, como desenvolvimento embrionário e homeostase (Ratajczak et al., 2006). SDF-1 é o único membro das alfa-quimiocinas e se apresenta sob 2 formas: SDF-1 α e SDF-1 β , os quais apresentam sequências de aminoácidos idênticas exceto pela presença de 4 aminoácidos adicionais na extremidade carboxil do SDF-1 β (Shirozu et al., 1995).

O SDF-1 α e seu receptor CXCR4 regulam uma série de funções celulares incluindo o recrutamento e adesão de células-tronco (Abbott et al., 2004; Askari et al., 2003; Ceradini et al., 2004). Estudos mostram que o aumento de SDF-1 α após infarto do miocárdio foi o principal responsável por uma maior retenção de células-tronco mesenquimais no estroma da medula óssea (Abbott et al., 2004). Um estudo mostrou que células progenitoras cardíacas cultivadas em condições de hipóxia foram capazes de migrar para o miocárdio infartado de uma maneira mais eficiente, a qual foi mediada pelo eixo SDF-1 α /CXCR4 (Tang et al., 2009). A isquemia causa a expressão de vários sinais de hipóxia (Ceradini et al., 2004), que induzem uma maior mobilização de células-tronco para o sangue circulante. Um dos principais mecanismos de migração de células-tronco para o reparo cardíaco é dependente de um gradiente de SDF-1 α existente entre a medula óssea, o sangue circulante e o tecido cardíaco lesionado (Ghadge et al., 2011). A expressão de RNAm de SDF-1 α no miocárdio é aumentada 2 vezes após o infarto (Abbott et al., 2004). Entretanto, essa resposta é curta e os níveis basais são restabelecidos dentro de 1 semana devido a rápida difusão da molécula e sua degradação por enzimas proteolíticas (Zaruba et al., 2009). O SDF-1 é capaz de ativar integrinas nas CPE e induzem angiogênese e neovascularização em tecidos isquêmicos, em modelos animais (Zemani et al., 2008).

d. Fator de crescimento transformante β (Transforming Growth factor- β - TGF- β).

O TGF- β é uma citocina pleitrópica que pertence a superfamília de polipeptídeos extracelulares, que regulam inúmeras atividades celulares como adesão, migração, divisão, diferenciação e produção de diversos componentes da matriz extracelular (Ghosh et al., 2005; Ruiz-Ortega et al., 2007). O TGF- β pode estimular as células musculares lisas e fibroblastos a aumentar a síntese de colágeno (Wang et al., 2006), diminuir a atividade das metaloproteinases de matriz (MMPs) (Theruvath et al., 2012), aumentar a atividade dos inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) e aumentar a atividade do inibidor de plasminogênio ativado 1; todas essas funções contribuem para um fenótipo pró-fibrótico (Ghosh et al., 2005; Ruiz-Ortega et al., 2007).

TGF- β é produzido por inúmeros tipos celulares como células endoteliais, células musculares lisas, macrófagos e plaquetas. Estudos sugerem que o TGF- β regula a aterosclerose através da modulação de CML e células endoteliais (CE) (Galkina e Ley, 2009). A introdução de anticorpos capazes de bloquear TGF- β ou tratamento com o receptor II de TGF- β aceleram a aterosclerose com diminuição significativa na quantidade de colágeno (Tedgui e Mallat, 2006). A inibição farmacológica do TGF- β atenua a formação da neointima e remodelação vascular após a injúria arterial (Ward et al., 2002).

e. Fator de necrose tumoral- α

Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), é uma citocina pleitrópica, que apresenta uma importante função na migração e proliferação das CML presentes na parede vascular (Rajesh et al., 2008). Em camundongos, a superexpressão crônica de TNF- α tem sido associada ao remodelamento vascular pulmonar (Fujita et al., 2002); essa citocina apresenta uma função crucial na patofisiologia vascular, onde é capaz de regular a expressão de MMPs (Sprague et al., 2009).

As MMPs, especialmente as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) são enzimas proteolíticas com substratos específicos e são reguladas por transcrição gênica, quebra de pró-peptídeos reguladores e interação com inibidores, onde se inclui os TIMPs (Khokha et al., 2013).

Em vários tipos celulares, o TNF- α exerce seu efeito através da ligação com seu receptor na membrana celular com subsequente ativação do fator nuclear de transcrição kappa-B (NF)- κ B (Chen et al., 1999). Em células não estimuladas, o NF- κ B está presente no citoplasma ligado ao I κ B (inibidor), o qual previne a entrada dessa molécula no núcleo celular. A fosforilação de I κ B resulta na ubiquitinação dessa molécula e, conseqüente, degradação. O NF- κ B é liberado e se transloca para o núcleo, se ligando a elementos regulatórios de genes-alvo. Como a maioria dos genes regulados por TNF- α contem sítios de ligação ao NF- κ B (Chen et al., 1999), a ativação de NF- κ B por TNF- α tende a ser um passo crucial para uma resposta inflamatória efetiva.

Roy et al. (2013) demonstrou que, em cultura de células musculares lisas provenientes de artéria pulmonar bovina, TNF- α promoveu a ativação da pró-MMP2 através do aumento da expressão de MT1-MMP, uma MMP associada a membrana que cliva a forma pró-MMP2 em MMP-2, com a diminuição de RNAm de TIMP-2.

f. Interleucina-10

IL-10 é uma citocina anti-inflamatória produzida por inúmeras células como linfócitos, monócitos/macrófagos, células endoteliais e CML vasculares. Estudos demonstraram os efeitos de IL-10 em eventos vasculares em cultura; IL-10 diminuiu a expressão de ICAM-1, a produção de ROS e diminuição de linfócitos apresentadores de antígeno. Os efeitos anti-inflamatórios estão, em parte, associados com a inibição do NF- κ B. Isso sugere que IL-10 poderia inibir a inflamação vascular (Zimmerman et al., 2004).

O efeito protetor de IL-10 no desenvolvimento da aterosclerose induzida pela alimentação poderia também ser atribuído à não ativação das células inflamatórias. Em um modelo de angioplastia usando balão ou implantação de *stent* em coelhos hipercolesterolêmicos, o tratamento com IL-10 humana recombinante reduziu a infiltração macrofágica e hiperplasia íntima (Feldman et al., 2000). Mecanismos adicionais de proteção vascular por IL10 endógeno inclui a diminuição da produção de superóxido nos vasos sanguíneos em resposta ao lipopolissacarídeo, o qual previne a incapacidade de relaxamento dependente do endotélio (Gunnnett et al., 2000).

4. Regeneração vascular

Além da análise da magnitude da lesão através desses fatores, a regeneração do endotélio vascular é um evento importante e deve ocorrer nos primeiros momentos após a injúria vascular para se prevenir a formação de neointima. Essa regeneração pode ocorrer pela migração e proliferação das células endoteliais maduras circulantes. Entretanto, as células endoteliais maduras são células diferenciadas com baixo poder proliferativo e sua capacidade de substituir o endotélio é limitada. Com isso, essa regeneração precisa do suporte de outros tipos celulares (Hristov et al., 2003).

Em 1997, um grupo de pesquisadores (Asahara et al., 1997) obteve, pela primeira vez, células progenitoras endoteliais CD34⁺ a partir do sangue periférico de adultos; essas células se diferenciaram *ex vivo* em células com um fenótipo endotelial. Essas células são chamadas de “células progenitoras endoteliais” (CPE), as quais se originam da medula óssea adulta e são descritas como uma população de células pluripotentes dentro do sangue periférico capazes de se diferenciar em células endoteliais (Werner e Nickenig, 2006). As CPE podem ser a base para uma nova estratégia terapêutica com o objetivo de recuperar o endotélio vascular mais rapidamente. Alguns grupos de pesquisa demonstraram que a transfusão sistêmica ou mobilização intrínseca das células progenitoras endoteliais melhoram a reconstituição do endotélio após dano, diminuindo a formação da neointima (Werner et al., 2003; Walter et al., 2002; Werner et al., 2002; Godoy et al., 2011). A rápida regeneração da monocamada endotelial pode prevenir o desenvolvimento da restenose através da síntese endotelial de mediadores anti-proliferativos como o óxido nítrico (Urbich e Dimmeler, 2004).

5. Células progenitoras endoteliais

As células progenitoras endoteliais, por definição, não apenas possuem a capacidade de promover a formação de novos vasos através da angiogênese, como também possuem o potencial de reparo endotelial pela substituição das células danificadas do endotélio (Roberts et al., 2005). As células progenitoras endoteliais são principalmente caracterizadas pela presença de 3 marcadores: CD34, AC133 e o receptor para o fator de crescimento endotelial vascular-2 (VEGFR-2) (Peichev et al., 2000; Gehling et al., 2000). Células com

esses marcadores são encontradas preferencialmente na medula óssea (Quirici et al., 2001; Donahue et al., 2013). No sangue circulante são encontradas células endoteliais mais maduras, as quais não expressam o marcador AC133. Essa perda de marcador reflete uma certa diferenciação em direção às células endoteliais maduras.

A molécula de CD34 é uma proteína transmembrana altamente glicosilada com 75 à 120 kd e é, possivelmente, uma molécula de adesão com uma importante função no início da hematopoiese por mediar a ligação das células-tronco à matriz extracelular da medula óssea; por causa disso, ele é comumente utilizado para o isolamento e manipulação das células-tronco (Healy et al., 1995). O CD34 é altamente expresso nos progenitores hematopoiéticos, bem como nas células endoteliais, cérebro e testículos.

O marcador AC133, inicialmente expresso nos hemangioblastos, tem sua expressão diminuída durante a diferenciação. Esse marcador é um polipeptídeo glicosilado de 120 kd que contém 5 domínios transmembrana com uma porção extracelular N-terminal e um resíduo C-citoplasmático (Miraglia et al., 1997; Yin et al., 1997). A função desse marcador ainda não é conhecida, mas o isolamento de uma subpopulação de células CD34+ usando um anticorpo monoclonal humano AC133 resultou na identificação de uma população de células progenitoras endoteliais funcionais CD34+ (Peichev et al., 2000).

O VEGFR-2 é um dos três receptores de tirosino-quinase específicos para endotélio, os quais são caracterizados pela presença de 7 domínios de imunoglobulinas extracelulares, um domínio transmembrana e um domínio tirosino-quinase citoplasmático. VEGF é considerado o ligante preferencial de VEGFR-2 (Lacaud et al., 2004; Yancopoulos et al., 2000).

Todas as manifestações de doenças coronarianas são acompanhadas por redução do número e capacidade migratória das CPE (Vasa et al., 2001). Dados experimentais demonstraram que a transfusão sistêmica de CPE saudáveis em condições de danos às artérias pode melhorar a reendotelização resultando em uma formação reduzida da neo-íntima (Werner et al., 2003).

Inúmeros estudos têm avaliado a função das CPE derivadas da medula óssea depois de um dano tecidual e durante a angiogênese; eles demonstraram que após uma injúria

profunda (infarto do miocárdio, angioplastia, transplante e queimadura), o número de CPE circulantes aumenta significativamente (Gill et al., 2001; Shintani et al., 2001).

O passo inicial para o recrutamento de células progenitoras para tecidos lesionados envolve a adesão das células progenitoras às células endoteliais ativadas por citocinas e a transmigração das células progenitoras através da monocamada endotelial (Vajkoczy et al., 2003). Devido ao baixo número de células progenitoras circulantes, a quimioatração pode ser um importante passo para permitir o recrutamento de um número razoável de células progenitoras para os tecidos lesionados (Urbich e Dimmeler, 2004). Baseado nessa hipótese, o dermatan sulfato e o condroitim sulfato fucosilado poderiam ser possíveis quimio-atratores de células progenitoras endoteliais para locais de injúria.

6. O dermatan sulfato

O dermatam sulfato (DS), também conhecido como condroitin sulfato B, é composto de cadeias de polissacarídeos lineares formadas por unidades dissacarídicas repetitivas que contém uma hexosamina, N-acetil-galactosamina e o ácido idurônico, ligados por ligações β 1-4. Um papel importante do dermatam sulfato está relacionado à sua interação com o cofator II da heparina (HCII). Esta serpina, homóloga a antitrombina III, age inibindo o efeito procoagulativo da trombina, sendo este efeito 1000 x aumentado na presença de dermatam sulfato (Tollefsen, 2007). Isto sugere que o DS pode ser uma poderosa ferramenta clínica para o tratamento e/ou prevenção da trombose (Trowbridge e Gallo, 2002).

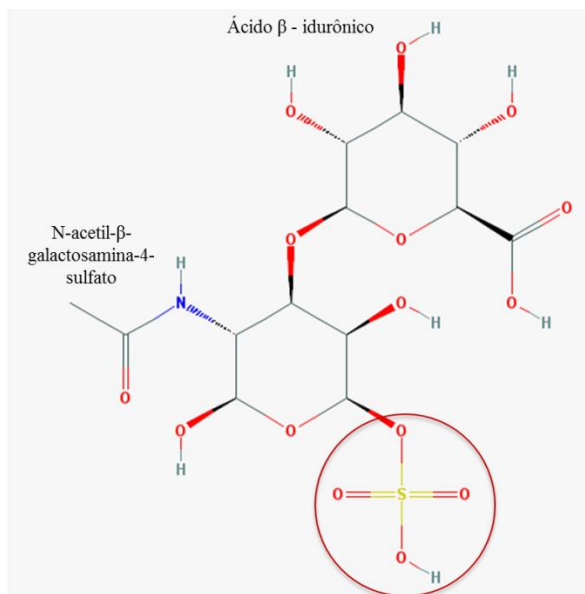


Figura 6. Estrutura da molécula de dermatam sulfato de suínos. Círculo vermelho indica a sulfatação (PubChem).

Foi observado que o DS é o principal polissacarídeo antitrombótico e anticoagulante encontrado na parede das artérias e veias humanas, enquanto o heparan sulfato corresponde a apenas 5% do total de glicosaminoglicanos (GAG) dos vasos. Estes resultados demonstram que deve haver uma via anticoagulante relacionada com as camadas subendoteliais e que esta via é dependente de DS e sua interação com o HCII e estaria ativada em situações patológicas como as observadas após a lesão arterial (Tovar et al., 2005). Foi demonstrando por He et al (2008) que o DS está localizado principalmente na camada adventícia da artéria carótida e que após a injúria arterial o HCII é capaz de se difundir do plasma para esta camada onde é ativado.

O DS é capaz de se ligar a vários fatores ligantes de heparina como: FGF-2, fator de crescimento de hepatócitos, fibronectina, HCII e com fator plaquetário 4 inibidor de proteína C, nestes dois últimos casos agindo com o fator antitrombótico e anticoagulante. Foi observado em determinadas lesões epiteliais que o DS é o principal GAG liberado e o único capaz de ativar a expressão de I-CAM na superfície das células endoteliais em cultura e aumentar os níveis circulantes destas moléculas *in vivo*. As modificações da parede dos vasos sanguíneos, em relação ao perfil de GAG que ocorrem na lesão arterial, estão relacionadas com a capacidade deste durante a recuperação da lesão.

Vicente et al. (2007) observaram que a injeção de DS, imediatamente após lesão arterial, inibe a proliferação de neointima e restenose arterial, provavelmente inibindo a atividade de trombina no local da lesão. Belmiro et al (2009) demonstraram que o DS possui uma atividade anti-inflamatória em modelos de colite em ratos. Um estudo do nosso laboratório mostrou que a administração de DS em conjunto com as células mononucleares da medula óssea foi capaz de promover uma maior adesão de células no local da lesão em um modelo de injúria arterial (Godoy et al., 2011). Esse estudo também mostrou que DS foi capaz de diminuir a presença de P-selectina no local da lesão, oferecendo evidência sobre uma possível ação anti-inflamatória desse GAG.

7. Condroitín sulfato fucosilado

O condroitín sulfato fucosilado (CSF) foi isolado do pepino do mar *Ludwigothurea grisea* e apresenta unidades dissacarídicas compostas de ácido glucurônico e N-acetilgalactosamina, contendo ramificações de α -L-fucopiranosose sulfatada, ligadas à posição 3 do resíduo de ácido glucurônico.

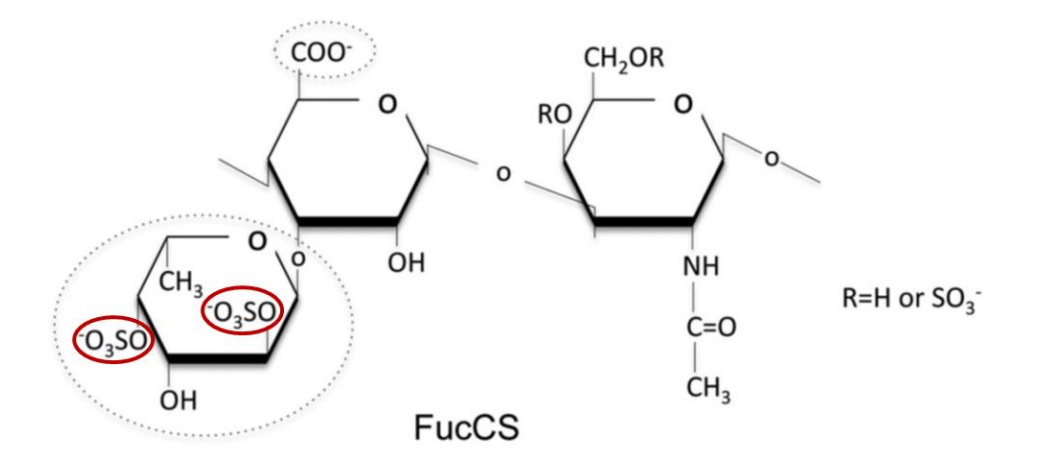


Figura 7. Estrutura da molécula de condroitín sulfato fucosilado. Círculos vermelhos indicam sulfatações (Bastos et al., 2014).

O CSF apresenta alta atividade anticoagulante devido à sua habilidade em potencializar a inibição da trombina principalmente pelo HCII. Medidas da atividade anticoagulante do CSF nativo e quimicamente modificado mostraram que a atividade

anticoagulante do polissacarídeo do pepino do mar é devida, principalmente, às ramificações de fucose sulfatadas ligadas à cadeia central (Mourão et al., 1996).

Pacheco et al. (2000) estudaram a ação antitrombótica deste polissacarídeo, utilizando um modelo experimental de trombose em ratos, que combina a estase venosa com uma situação de hipercoagulabilidade, obtida pelo estímulo da fase de iniciação da coagulação. Observou-se que o CSF é um efetivo agente antitrombótico quando administrado por via intravascular e previne a trombose de uma maneira dose-dependente. O CSF é também capaz de, na presença de FGF-2, estimular o processo de angiogênese em cultura, onde células endoteliais cultivadas em matrigel na presença de FGF-2 e CSF são capazes de maior formação de tubos (Tapon-Bretaudière et al., 2002).

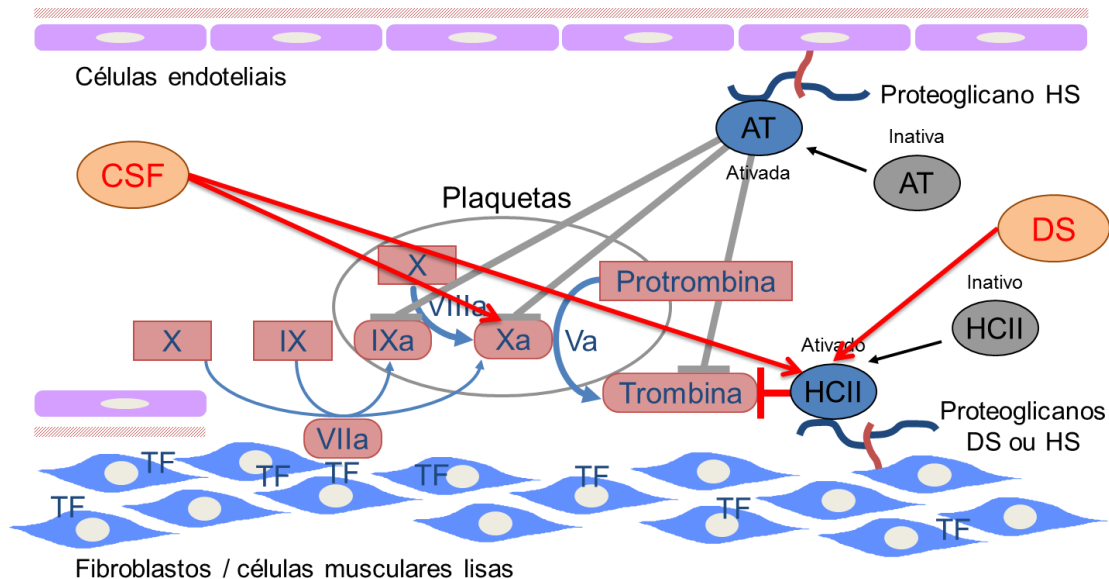


Figura 8. Modelo de ativação do HCII e antitrombina ‘in vivo’ e interação das moléculas de DS ou CSF com fatores da cascata de coagulação. HS: heparan sulfato; AT: antitrombina; TF: fator tecidual.

8. Modelo de aterosclerose

Camundongos ApoE^{-/-} desenvolvem aterosclerose após dieta do tipo Western (rica em gorduras). Estes animais demonstraram que a hiperlipidemia é um pré-requisito essencial para a formação da placa aterosclerótica (Pendse et al., 2009). A apolipoproteína E (ApoE)

exerce um papel fundamental na “captura” de lipídios periféricos e na hemostase energética e, conseqüentemente, no desenvolvimento da síndrome metabólica, a qual se caracteriza pela combinação de severas condições como obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertensão, dislipidemia e um estado pro inflamatório (Grundy et al., 2004). O estudo das lesões arteriais e formação de neointima em animais ateroscleróticos são essenciais para compreender como o processo de recuperação de endotélio pode ocorrer nesta situação patológica.

O colesterol plasmático em camundongos normais, quando submetidos à uma dieta normal, é de aproximadamente 80 mg/dl, o qual é carregado preferencialmente em partículas lipoprotéicas de alta densidade (HDL), os camundongos possuem pequena quantidade de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e outras apolipoproteínas aterogênicas. Já em humanos a maior parte do colesterol plasmático é carregado em partículas LDL sendo que apresenta uma concentração plasmática de aproximadamente 110mg/dl (Havel, 1989). Apesar dessas diferenças em relação ao colesterol plasmático, o transporte e metabolismo desta molécula é suficientemente similar nas duas espécies, garantindo que um distúrbio no metabolismo lipoprotéico no plasma de camundongos possa induzir a aterosclerose nestes animais, o que tornou a criação do camundongo ApoE^{-/-} um importante modelo de estudo da aterosclerose em humanos (Pendse et al., 2009)

Em um estudo com camundongos ApoE^{-/-} que receberam uma medula óssea de um doador normal, os autores observaram que as lesões ateroscleróticas foram diminuídas. Essa diminuição se deve à migração de células da medula óssea do camundongo normal para o local da injúria (Rauscher et al., 2003).

Diferentes patologias levam a uma diminuição do número de CPE circulantes e conseqüentemente à uma diminuição da capacidade de recuperação de lesões; a busca de novas alternativas terapêuticas para a recuperação destas lesões tem sido objeto de muitos estudos. A utilização de injeções de células progenitoras endoteliais para a recuperação de lesões e de drogas, como o DS ou CSF, que estimulem a migração e adesão destas células para o local da lesão pode ser uma boa alternativa para o tratamento de lesões arteriais que possam levar a doenças cardiovasculares.

III. Objetivo geral

Analisar a ação de glicosaminoglicanos, como DS e CSF, na inflamação e trombose após lesão arterial e sua influência na mobilização de células progenitoras endoteliais para o local da lesão em camundongos C57BL6 e deficientes em apolipoproteína E.

IV. Objetivos específicos

- a. Estudar o papel do DS e o CSF na inibição da trombose inicial
- b. Estudar o efeito do DS e o CSF na migração das células progenitoras endoteliais injetadas nos animais para o local da lesão arterial.
- c. Analisar a expressão de fatores como P-selectina, ICAM-1, SDF-1, e-NOS, TGF- β , TNF- α e IL-10 na ausência e presença do tratamento com DS e CSF, após a injúria arterial em animais normais e ApoE^{-/-} alimentados com dieta aterogênica.
- d. Estudar a influência do DS e do CSF na coagulação sanguínea em animais injetados com estes glicosaminoglicanos.

V. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Camundongos

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 adquiridos no CEMIB/UNICAMP e camundongos deficientes em apolipoproteína E (gentilmente cedidos pelo professor Douglas Tollefsen, Washington University of Saint Louis, MO), sendo estes dois últimos criados e mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica da UNICAMP sob a responsabilidade do Prof. Dr. Claudio C. Werneck e da Profa. Dra. Cristina P. Vicente. Nosso trabalho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (CEUA no. 2265-1).

2. Lesão arterial

Camundongos pesando $25\text{g} \pm 2$ com 8 semanas de idade foram anestesiados com 16 mg/kg de xilazina e 100 mg/kg de ketamina. O fluxo sanguíneo das artérias carótidas esquerdas comum e interna foi interrompido utilizando um clamp atraumático (Figura A), a carótida externa foi puncionada com uma agulha 30G e uma sonda metálica de 0,63 mm de diâmetro foi introduzida até a artéria carótida comum através da artéria carótida externa (esse procedimento foi repetido 3x) (Leidenfrost et al., 1993) (Figura B). Esta sonda provoca uma dilatação do vaso em cerca de 2,5 x seu tamanho, o que provoca lesão endotelial. A sonda foi retirada e a carótida externa foi ligada nos dois lados da arteriotomia (Figura C), os grampos foram removidos o fluxo restaurado e a pele foi suturada com fio 6.0 (Figura D). O camundongo esteve em recuperação; 1 e 3 dias após a cirurgia, o animal foi sacrificado e as carótidas comum esquerda e direita foram retiradas; as artérias carótidas comum direitas foram usadas como controle.

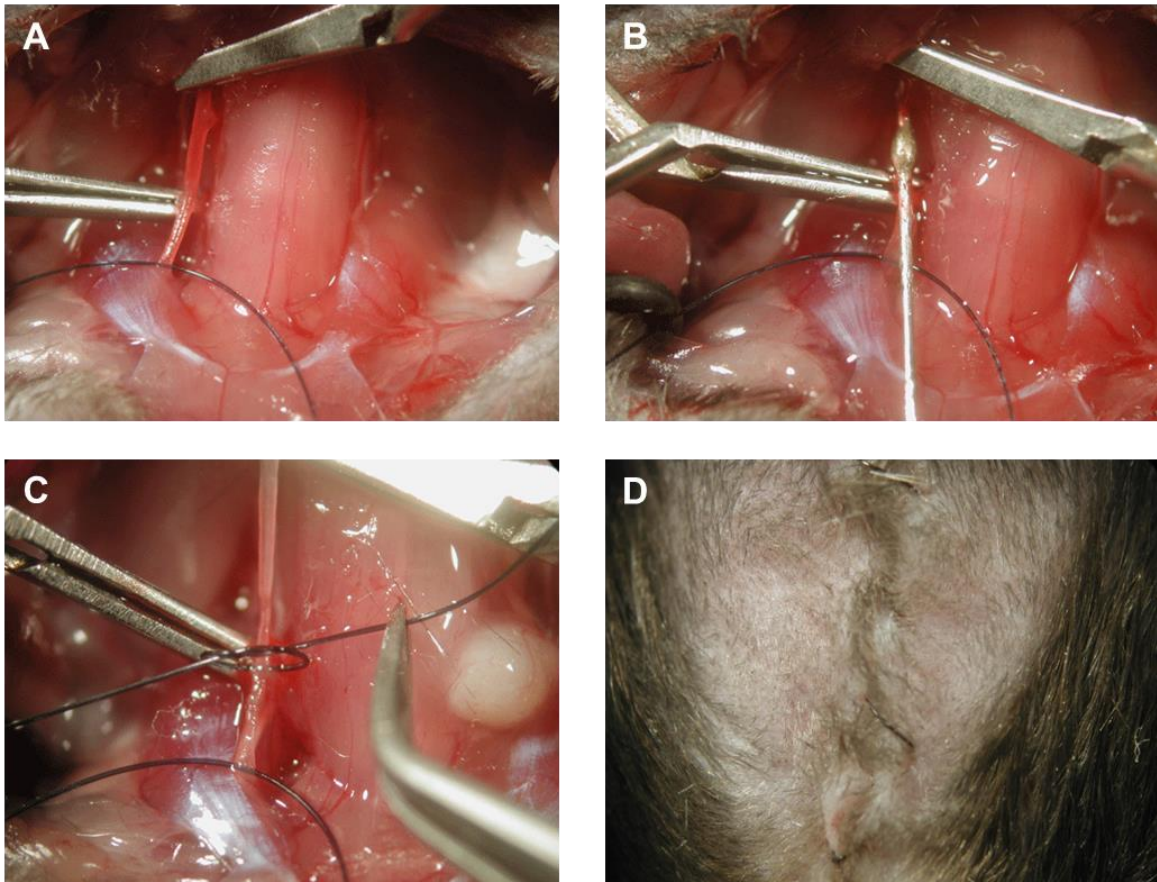


Figura 9. Modelo de lesão arterial. (A) Isolamento da artéria carótida comum. (B) introdução da sonda metálica, a qual é introduzida 3x. (C) isolamento do orifício utilizado para introduzir a sonda de modo a prevenir sangramento. (D) animal é suturado.

3. Grupos de animais

Neste estudo foram testados 9 condições de tratamento tanto nos camundongos C57BL6 como nos ApoE^{-/-} : (1) animais lesionados; (2) animais lesionados tratados com DS; (3) animais lesionados tratados com CSF; (4) animais lesionados tratados com MNC; (5) Animais lesionados tratados com MNC e DS; (6) Animais lesionados tratados com MNC e CSF; (7) animais lesionados tratados com CPE; (8) animais lesionados tratados com CPE e DS e (9) animais lesionados tratados com CPE e CSF.

Utilizamos em alguns experimentos artérias não lesionadas, as quais denominamos como grupo controle. Os experimentos foram feitos com amostra igual ou superior a 3 animais (n=3).

Todos os animais ApoE^{-/-} foram alimentados com dieta hiperlipídica durante 6 semanas (composição abaixo).

4. Dieta Hiperlipídica

A dieta hiperlipídica é composta por 18% de proteína, 22% de gordura total (44% do valor energético total fornecido por lipídios) e 45% carboidratos, num total de 448 Kcal/100g (PragSoluções, Jaú, São Paulo – Brasil).

Produto	Quantidade %
amido de milho	20,87
caseína	14
amido dextrinizado	10
sacarose	10
óleo de soja	4
celulose microcristalina	5
mix mineral AIN 93G	3,5
mix vitaminas AIN 93	1
L-cistina	0,18
cloreto de colina	0,25
banha	31,2

Tabela 1. Composição da dieta hiperlipídica fornecida aos camundongos ApoE^{-/-} durante 6 semanas.

Esta dieta leva à formação de placas de gordura nos vasos dos camundongos ApoE^{-/-}, que sem esta dieta desenvolvem pouca ou nenhuma aterosclerose. Esta situação mimetiza, parte dos fatores de risco que grande parte da população está exposta atualmente.

5. Isolamento de Células Mononucleares

A medula óssea foi extraída de camundongos C57BL/6 através da lavagem dos ossos fêmur, tíbia e úmero com meio DMEN contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina. Após a extração da medula total, as células mononucleares foram isoladas através de gradiente de ficoll (Ficoll Paque Plus) com centrifugação à 1500 rpm durante 40 minutos. As células foram lavadas e ressuspensas em 100 µl de PBS e injetadas através da veia da cauda dos animais [2x10⁶ células/injeção] 1 hora e 24 horas após a cirurgia.

6. Cultivo das células progenitoras endoteliais

As células mononucleares foram isoladas como no item anterior. Após as lavagens, as células foram plaqueadas em garrafas de 35cm² cobertas com gelatina 1%. As células foram cultivadas em meio EGM-2, acrescido de 10% de soro fetal bovino e fatores constituintes do próprio meio; o meio foi trocado todos os dias durante os 7 primeiros dias; após esse período, o meio foi trocado a cada 2 dias. As células foram utilizadas entre as passagens 5 e 15. Essas células foram analisadas por imunofluorescência para os seguintes marcadores: CD34, VEGFR2, AC133, CD31 e CD45, sendo consideradas como CPE as células CD45 - ou low, CD 34/CD31/VEGFR2.

7. Tratamentos

Os diferentes tratamentos foram administrados da seguinte maneira:

- DS: administração intravenosa [20mg/kg animal] 10 minutos, 12 horas, 24 horas e 48 horas após a lesão arterial (Vicente et al., 2007)
- CSF: administração intravenosa [1mg/kg animal] 10 minutos, 12 horas, 24 horas e 48 horas após a lesão arterial (Pacheco et al., 2000).
- MNC: administração intravenosa [2x10⁶ células/injeção] 1 hora e 24 horas após lesão arterial (Werner et al., 2003).
- CPE: administração intravenosa [2x10⁶ células/injeção] 1 hora e 24 horas após lesão arterial (Werner et al., 2003).

8. Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa)

O TTPa é o tempo medido entre a adição de cálcio, na presença de uma cefalina (fator de contato) e a coagulação do plasma. A presença de um fator de contato (cefalina) ativa as reações da via intrínseca da coagulação. O TTPa corresponde ao tempo gasto para ocorrer a coagulação do plasma recalcificado em presença de cefalina; a cefalina, que substitui o fosfolípido da membrana plaquetária.

O TTPa foi medido no plasma citratado com citrato de sódio 3,8% de camundongos selvagens divididos em 3 grupos: 1- Lesionados 12, 24 e 72 horas; 2- Lesionados tratados

com DS 12, 24 e 72 horas e 3- Lesionados tratados com CSF 3, 6, 24 e 72 horas. O teste é usado na avaliação da via intrínseca de coagulação e monitoramento de terapias com agentes anti-coagulantes. As amostras foram avaliadas em triplicata. O ensaio foi realizado da seguinte maneira: 50uL de amostras foram pré-aquecidas à 37°C durante 2 minutos em um bloco térmico; foram adicionados 50uL de reagente de TTPA clot ao tubo e incubou-se por 2 minutos à 37°C. Em seguida, adicionou-se 50uL de cloreto de cálcio (CaCl₂ pré-aquecido à 37°C) e iniciou-se a medição do tempo no coagulômetro CLOTimer (Clot, S.P, Brasil).

9. Tempo de Sangramento

O tempo de sangramento venoso foi determinado de acordo com Broze et al. (2001). Os camundongos foram anestesiados e colocados sobre uma placa de madeira. Uma incisão transversal foi feita com uma lâmina de bisturi na veia lateral da cauda numa posição onde o diâmetro da cauda era de 2,25 a 2,5 mm. A cauda foi imersa em solução salina à 37°C contido dentro de um tubo de ensaio. O tempo entre a incisão e a interrupção do sangramento foi medida como sendo o tempo de sangramento.

Esse tempo foi medido em 3 grupos de camundongos: 1- Lesionados 12, 24 e 72 horas; 2- Lesionados tratados com DS 12, 24 e 72 horas e 3- Lesionados tratados com CSF 3, 6, 24 e 72 horas.

10. Tempo de Trombina (TT)

O TT mede o tempo de coagulação após adição de trombina ao plasma. Avalia a última etapa da cascata da coagulação, que é a conversão do fibrinogênio em fibrina. A determinação do tempo de trombina é adequado para acompanhamento de terapias com drogas anti-trombóticas, no nosso caso, monitoramento das terapias com DS e CSF. O tempo de trombina foi dosado em plasma citratado (1 parte de citrato de sódio 3,8%: 9 partes de sangue venoso) de camundongos selvagens divididos em 3 grupos: 1- Lesionados 12, 24 e 72 horas; 2- Lesionados tratados com DS 12, 24 e 72 horas e 3- Lesionados tratados com CSF 12, 24 e 72 horas. A análise foi feita em utilizando-se o kit 'test thrombin reagent' (Siemens Healthcare Diagnostics – Marburg – Alemanha).

O ensaio foi realizado da seguinte maneira: pipetou-se em uma cubeta pré-aquecida à 37°C 50uL de plasma e incubou-se por 1 minuto à 37°C; adicionou-se 100uL de reagente para teste de trombina previamente preparado e também pré-aquecido à 37°C. Com a adição do reagente, iniciou-se a medição no coagulômetro (tempo medido em segundos). As amostras foram feitas em triplicata.

11. Migração de MNC ou CPE marcadas com PKH26-GL

Alguns animais receberam injeções de células marcadas com PKH-26 GL (Sigma, St. Louis, MO) que apresenta fluorescência amarelo-laranja com longas caudas alifáticas, as quais se ligam a regiões lipídicas da membrana plasmática. As células foram marcadas de acordo com instruções do fabricante. Os animais que receberam essas células se recuperaram durante 1 ou 3 dias após a cirurgia. Após esse período, eles foram sacrificados e as artérias removidas; as artérias foram incluídas em OCT e seccionadas; a análise da presença dessas células foi feita em microscópio Zeiss Observer Z.1 (Zeiss, Alemanha), equipado com lentes objetivas de 4x, 10x e 40x. As imagens foram analisadas no software Image J1.42. As células foram contadas em cortes transversais da artéria carótida, sendo analisadas 5 lâminas por animal num total de 3 animais para cada grupo.

12. Western Blotting

As artérias carótidas foram coletadas 1 e 3 dias após a lesão arterial, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas à -80°C até a extração proteica. As artérias foram pesadas e utilizou-se o volume de tampão de extração proporcional à quantidade de tecido obtido (utilizou-se 50 uL de tampão para cada 10 mg de tecido). O tampão utilizado foi RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay); adicionou-se ao tampão, coquetel anti-protease (Protease Inhibitor Cocktail – Sigma – Cat. No. P8340) (10 uL de coquetel para cada 1 mL de tampão). O tecido foi homogeneizado com o auxílio de um ultra-sônico; as amostras foram colocadas em gelo durante 2 horas para a extração das proteínas. As amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada durante 20 minutos à 13200 rpm; o sobrenadante foi coletado, aliquotado e quantificado de acordo com o método de Bradford (1976). Utilizou-se 50 ug de proteína em cada poço para cada grupo de animal analisado; antes da

aplicação em gel de poliacrilamida 7,5%, as amostras foram fervidas durante 5 minutos à 100°C em tampão de amostra com 5% de β -mercaptoetanol.

As amostras foram aplicadas e colocadas em corrida eletroforética para a separação das diferentes proteínas de acordo com o peso molecular. Posteriormente, seguiu-se a transferência elétrica onde utilizou-se membrana de nitrocelulose PVDF; analisou-se a eficiência da transferência através da coloração da membrana com Ponceau S. Em seguida, iniciou-se o imunoblotting: a membrana foi lavada com TBS-T (Tris-buffered saline and Tween 20) (3x de 10 minutos), bloqueada com 1% de leite em pó desnatado em TBS-T durante 1 hora, lavada novamente, incubada com anticorpo primário (eNOS [sc-654, Santa Cruz Biotechnology, CA], ICAM-1 [cat. No. 13-0541-81, eBioscience, San Diego, CA], P-selectina [AF737, RD Systems, Minneapolis, MN], SDF-1 [cat no. 14-7992-81, eBioscience, San Diego, CA], e GAPDH) na concentração 1:500 overnight à 4°C sob agitação. Lavou-se a membrana e incubou-a com anticorpo secundário biotilado (anti-rabbit IgG[BA1000], anti-rat IgG [BA4001] e pan-específico IgG [BA1300], todos da Vector Labs, Burlingame, CA) 1:1000 durante 2 horas à temperatura ambiente. A membrana foi exposta em solução contendo luminol durante 1 minuto e 30 segundos e revelada utilizando-se filme Kodak. O filme foi escaneado e analisado no software Image J 1.42q.

13. ELISA

A determinação dos níveis de TGF- β , SDF-1, IL-10 e TNF- α foram dosados no plasma citratado (1 parte de citrato de sódio 3,8%: 9 partes de sangue venoso) de camundongos C57BL6 e ApoE^{-/-} utilizando-se kit para TGF- β (cat no. CHC1683 – Invitrogen, EUA) , SDF-1 (DY460 – R&D Systems, EUA)), IL-10 (CMC0103 – Invitrogen, EUA)) e TNF- α (CMC3013 – Invitrogen, EUA). Todas as amostras foram feitas em triplicatas.

As amostras utilizadas para a quantificação de TGF- β foram feitas de 2 maneiras: 1) amostras sem ativação prévia para a detecção do TGF- β ativado presente na circulação e 2) amostras ativadas com a adição de 10 uL de HCl 1N para cada 40 uL de plasma e incubadas por 10 minutos para a detecção de TGF- β total circulante. Após esse período, as

amostras foram neutralizadas através da adição de 8 uL de NaOH 1,2N/HEPES 0,5 M. Antes do início do ensaio, as amostras ativadas foram diluídas no *calibrator diluent* (10 uL de amostra ativada para 590 uL de ‘calibrator diluente’ – fator de diluição final: 87).

As demais amostras para a análise das citocinas SDF-1, IL-10 e TNF- α foram diluídas 5 vezes. O ensaio foi realizado da seguinte maneira: todos os reagentes e amostras estavam à temperatura ambiente. Foram adicionados 50 uL de ‘assay diluent’ em cada poço e em seguida, adicionou-se 50uL de padrão, controle ou amostra ativada em cada poço. A placa foi agitada lentamente por um minuto e incubada por 2 horas à temperatura. Os poços foram lavados 4 vezes e em seguida, adicionou-se 100 uL de ‘conjugate’ em cada um; incubou-se 2 horas à temperatura ambiente. Lavou-se os poços 4 vezes e adicionou-se 100 uL de ‘substrate solution’ em cada um, incubando por 30 minutos protegido da luz; após esse período, foi adicionado 100 uL de ‘stop solution’ e a placa foi lida em leitor de Elisa (Synergy – Bio Tek) à 450nm.

A curva padrão foi feita utilizando-se a média da absorbância para cada ponto da curva no eixo Y e a concentração no eixo X. Foram analisados 5 animais por grupo.

14. RT-PCR quantitativo

As artérias carótidas foram coletadas 1 e 3 dias após a lesão arterial, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas à -80°C até a extração de RNA. O RNA foi extraído utilizando-se um kit específico para tecidos fibrosos (RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit, cat no. 74704, Qiagen, EUA) de acordo com instruções de uso. Amostras de tecido fibroso foram lisadas com tampão contendo guanidina-isotiocianato; após a homogeneização, as amostras foram tratadas com proteinase K. Tecidos não lisados foram removidos após a centrifugação. Etanol absoluto foi adicionado para limpar o lisado e o RNA foi ligado à membrana de sílica RNeasy. Possível presença de DNA que pode afetar a pureza da amostra foi removido através do tratamento da coluna com DNase. DNase ou qualquer outro contaminantes foram removidos e RNA total de alta qualidade foi obtido. As amostras foram analisadas em Nanodrop para a verificação da sua qualidade e pureza.

A técnica de PCR em tempo real foi utilizada para a investigação do padrão de expressão dos genes relacionados ao processo inflamatório e a homeostase vascular. As

reações foram realizadas em triplicata no equipamento Real-Time PCR System AB7300 Applied Biosystems, utilizando o kit Express One-Step SYBR® GreenER™ kit (Invitrogen, cat no.), seguindo instruções do fabricante.

A reação de PCR em tempo real consistiu na utilização de 30 ng de RNA total para cada amostra; o kit permite que a reação de síntese de cDNA e posterior reação de PCR em tempo real ocorra num mesmo momento. Utilizou-se 10 µL de SuperMix Universal, 0,4 µL de Rox reference Dye, 0,5 µL de Superscript Mix, 10 µM de cada primer e água em quantidade suficiente para um volume final de 20 µL. Na primeira parte do experimento, houve a síntese de cDNA (50°C durante 5 minutos); em seguida, as amostras foram submetidas a 40 ciclos nas seguintes condições: 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final, uma etapa adicional de dissociação foi realizada (40 ciclos com um decréscimo de 1°C a cada 15 segundos, iniciando em 95°C) para a geração de uma curva de “melting”. A análise desta curva permitiu verificar a especificidade da reação, ou seja, se havia a formação de produtos inespecíficos e/ou dímeros de primers.

A análise dos dados gerados foi realizada com o auxílio do software Real-Time System RQ Study software V1.3.1 9 (Applied Biosystems). Por meio deste software determinou-se o threshold, ou limiar de detecção, de cada amostra. O threshold corresponde a um ponto de referência, uma vez que neste ponto todas as amostras possuem mesma intensidade de fluorescência. Uma vez determinado o threshold, foi estabelecido o número de C_T (do inglês threshold cycle) de cada amostra. O número de C_T serve como base de comparação entre as amostras, pois se refere ao número de ciclo no qual a curva de amplificação de cada amostra atinge o threshold estabelecido.

A eficiência de amplificação de cada um dos pares de primers foi determinada por meio de uma curva padrão e que foi gerada a partir de reações em triplicata de PCR em tempo real.

Os pares de primers utilizados estão mostrados na tabela abaixo:

<i>tnf-α</i>	
Forward	TCG GGG TGA TCG GTC CCA ACA A
Reverse	GCT ACG GGC TTG TCA CTC GG TT
<i>sdf-1</i>	
Forward	CGG CTG AAG AAC AAC AAC AG
Reverse	GGG GGT CTA CTG GAA AGT CC
<i>p-selectina</i>	
Forward	TCC AGG AAG CTC TGA CGT ACT TG
Reverse	GCA GCG TTA GTG AAG ACT CCG TAT
<i>tgf-β</i>	
Forward	GGA TAC CAA CTA TTG CTT CAG CTC C
Reverse	AGG CTC CAA ATA TAG GGG CAG GGT C
<i>icam-1</i>	
Forward	AGC TCG GAG GAT CAC AAA CG
Reverse	CGA GGA CCA TAC AGC ACG TG
<i>36b4</i>	
Forward	CTC GCT TTC TGG AGG GTG TC
Reverse	CGC GCT TGT ACC ATT GAT G
<i>enos</i>	
Forward	CTT GAA GAG TGT GGG CCA GGA
Reverse	CAA ATA CCT GCA GCT TTC CCC A

Tabela 2. Lista de primers utilizado na técnica de PCR em tempo real.

15. Zimografia *in situ*

As artérias carótidas foram coletadas e embebidas em OCT (Tissue Tek Optimal Cutting temperature compound, Torrance – USA) e armazenadas no biofreezer a -80°C . Em seguida, foram feitos cortes transversais de 8 μm de espessura em criostato. Os cortes foram descongelados e incubados em uma solução de 1 mg/mL de DQ-gelatina (Invitrogen) em solução tampão para a reação de gelatinase (CaCl_2 10 mM, ZnCl_2 1 mM, Tris 50 mM em pH 7,6) durante 2 horas em câmara úmida escura a 37°C . Os cortes foram examinados em microscópio de fluorescência (Observer Z.1, Zeiss, Oberkochen, Germany) na magnitude de 200x (Axio Vision 4.8 Software). A atividade proteolítica foi detectada por fluorescência e quantificada da seguinte maneira: artérias carótidas sem DQ-gelatina de cada grupo foram analisadas para se detectar a autofluorescência emitida pela elastina, componente da lâmina elástica; as artérias carótidas com DQ-gelatina foram fotografadas e

a fluorescência foi quantificada no software Image J 1.42q. A partir do valor da fluorescência nos grupos com DQ-gelatina se subtraiu o valor da autofluorescência e obteve-se o valor relacionado à atividade proteolítica ‘in situ’.

16. Citometria de Fluxo

A expressão de marcadores de superfície nas células obtidas da medula óssea foi analisada por citometria de fluxo no FACScalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ/USA) usando anticorpo rat anti-mouse CD34-FITC (eBioscience, San Diego, CA-USA), rat anti-mouse Prominina-I-PE (CD133) (eBioscience, San Diego, CA- USA) e rat anti-VEGFR2, conjugado com Alexa Fluor®488 (Invitrogen, Carlsbad, CA/USA). Os resultados foram expressos por porcentagem de células positivas para 50.000 ou 100.000 eventos obtidos durante a leitura.

17. Análise Histológica

As artérias carótidas foram coletadas e embebidas em OCT (Tissue Tek Optimal Cutting temperature compound, Torrance – USA) e armazenadas no biofreezer a -80°C. Em seguida, foram feitos cortes transversais de 8 µm de espessura em criostato. Os cortes foram descongelados e corados com Hematoxilina e Eosina. As lâminas foram montadas com Cytoseal 60 (Richard Allan Scientific) e examinadas em microscópio Olympus BX60, equipado com lentes objetivas de 4x, 10x e 40x. As imagens foram adquiridas com a câmera Olympus Optical U-ULH e analisadas em computador. A área de trombo foi calculada pela subtração da área oclusa de lúmen da área total encoberta pela lâmina elástica interna. A área média foi calculada, em µm², pela subtração da área encoberta pela lâmina elástica interna da lâmina elástica externa. As medidas foram feitas sem o conhecimento do grupo do animal em análise.

18. Análise Estatística

A significância estatística foi determinada através do teste ‘One-way ANOVA’ com pós-teste Tukey. Valores de p menores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

VI. RESULTADOS

1. Caracterização das MNCs e CPE por imunofluorescência e citometria de fluxo.

As células extraídas da medula óssea de camundongos C57BL6 foram analisadas logo após o isolamento e também após o cultivo em meio EGM-2 suplementados com fatores de crescimento e soro fetal bovino.

As células mononucleares (MNCs) foram analisadas quanto à presença dos seguintes marcadores: CD34 e AC133. Observamos que a porcentagem de células expressando apenas a molécula CD34 é de aproximadamente 1% em 100.000 eventos analisados; a porcentagem de células expressando AC133 é de 0,26% em 100.000 eventos e as células duplo-marcadas (CD34⁺/AC133⁺) constituem apenas 0,03% num total de 100.000 eventos (Figura 10).

Após o cultivo das MNCs com meio EGM-2 observamos que após, ao menos, 5 passagens as células adquiriram um fenótipo endotelial. Observamos uma diminuição na expressão da molécula CD45 (Figura 10B), ao mesmo tempo uma maior quantidade de células expressa CD34 (32%) e CD31 (49%). As células duplo marcadas CD34/CD31 totalizam 52% num total de 100 mil eventos (Figura 1B). Todas as células marcadas são Sca-1 positivas (resultado não mostrado).

As MNCs também foram cultivadas em meio EGM-2. Após 7 dias de cultivo, as células foram analisadas por imunofluorescência para a presença dos marcadores CD34, AC133 e VEGFR2. Na Figura 11, observamos a marcação com CD34 conjugado com FITC (Figura 11A e 11E) e AC133 conjugado com PE (Figura 11B). O núcleo foi marcado com DAPI (Figura 11C, 11G e 11K) e a sobreposição das figuras nos mostra poucas células expressando os 2 marcadores (cabeça de seta na Figura 11D).

Observamos a presença de células VEGFR2⁺ conjugadas com PE (Figura 11F); a figura 2H mostra células expressando tanto CD34 como VEGFR2 (cabeça de seta).

A expressão de AC133-FITC e VEGFR2-PE isoladamente são mostradas nas figuras 11I e 11J; a sobreposição das imagens mostra que há células expressando ambos os marcadores (cabeça de seta – Figura 11L).

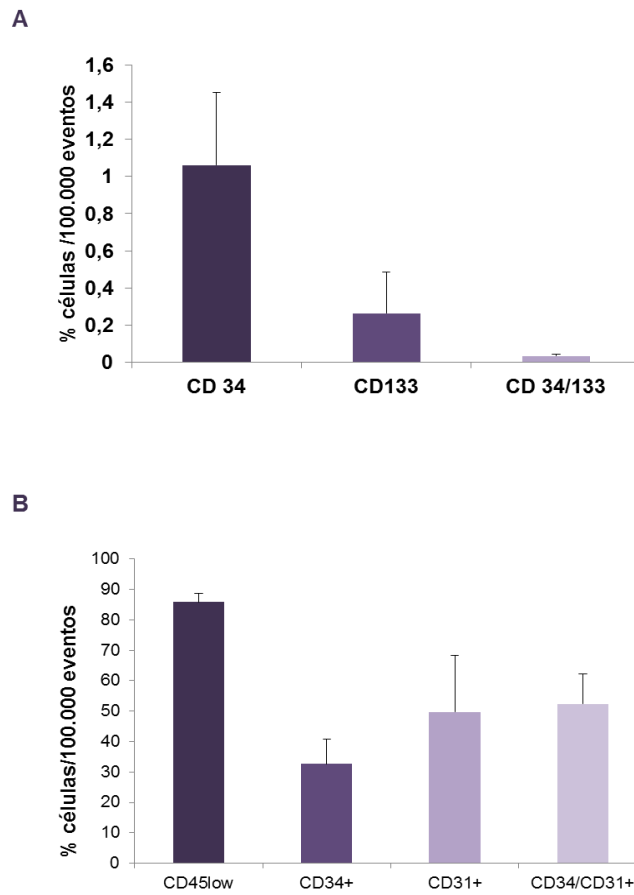


Figura 10. Citometria de fluxo em células da medula óssea. Análise da expressão de marcadores por células mononucleares isoladas da medula óssea de camundongos C57BL6. (A) MNC analisadas logo após a extração. (B) MNC após cultivo em meio EGM-2 por 5 passagens. Valores expressos em % de células positivas em relação a 100.000 eventos.

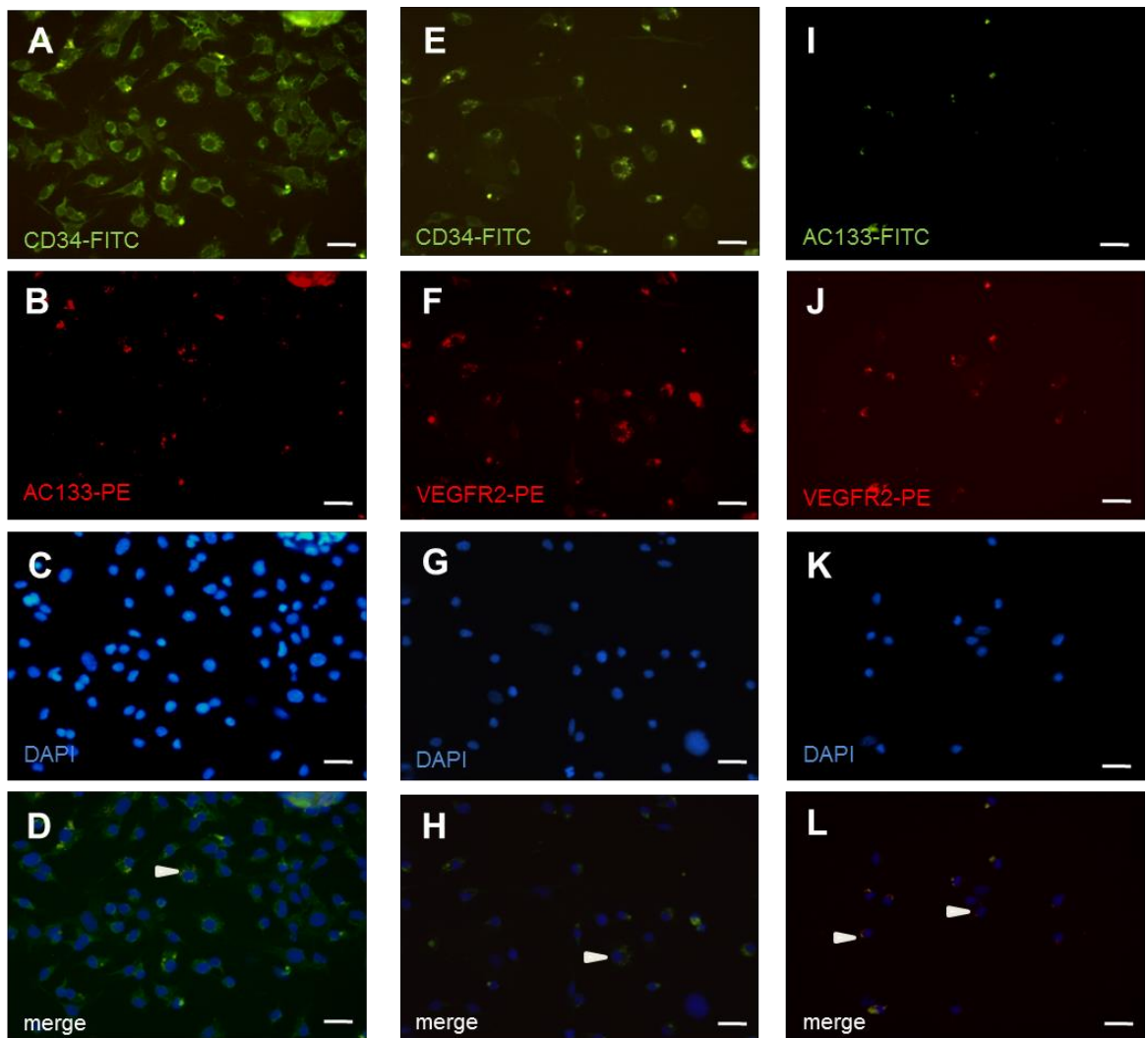


Figura 11. Imunofluorescência de células mononucleares da medula óssea de camundongos C57BL6 após 7 dias em cultura com meio EGM-2. O marcador hematopoiético (CD34) está expresso em células ainda não totalmente diferenciadas (Figura 2A e 2E); já o marcador AC133 está presente em células bastante imaturas da medula óssea (Figura 2B e 2I). O marcador VEGFR2 está expresso em células endoteliais maduras ou em células comprometidas com essa linhagem (Figura 2F e 2J). as células foram marcadas com DAPI, específico para núcleo (Figura 2C, 2G e 2K). A sobreposição de 2 marcadores nos fornece evidências de que a maior parte das células em cultura expressam o marcador CD34, das quais poucas expressam AC133 ou VEGFR2 (Figura 2D ou 2H – cabeça de seta). Barra = 50 μ m.

2. GAGs aumentam o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) nas primeiras 12 horas após a lesão, não alteram o tempo de trombina (TT) e prolongam o tempo de sangramento (TS) em todos os momentos analisados.

O TTPa, TT e TS foram analisados em 3 grupos de camundongos C57BL6 após 12, 24 e 72 horas do procedimento cirúrgico: 1 – lesionado; 2 – lesionado tratado com DS e 3 – lesionado tratado com CSF.

Observou-se um prolongamento do TTPa nos grupos 2 e 3 no período de 12 horas quando comparados com os animais do grupo 1 (52,9 ou 49,7 vs. 40,6 segundos, respectivamente, $p < 0,05$). Nos períodos de 24 e 72 horas, os dados de TTPa não diferiram entre os grupos, sugerindo que, apesar das terapias utilizadas, o TTPa se normaliza ao longo do tempo (Figura 12).

O TT não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados, confirmando dados da literatura de que a ação do DS não acontece pela inibição da atividade de trombina.

Os animais do grupo 3 também não diferiram dos dados pertencentes ao grupo 1 (Figura 13). Entretanto, dados da literatura mostraram que a ação do CSF apresenta uma inibição parcial no TT nas primeiras horas após a sua administração, sugerindo que a ação desse GAG em diminuir a atividade de trombina é eficiente nas primeiras horas após a injúria, provavelmente auxiliando na diminuição da magnitude do processo trombótico.

A administração de CSF prolongou o TS em todos os tempos analisados em relação ao grupo 1; no período de 12 horas houve um aumento de 39% (91,3 vs. 65,3 segundos, $p < 0,05$), no tempo de 24 horas o aumento foi de 23% (83 vs. 67,5 segundos, $p < 0,05$) e em 72 horas o TS se prolongou em 58% (94 vs. 59,3 segundos, $p < 0,05$). Já a terapia com DS, aumentou o TS em 45% após 24 horas (98,3 vs. 67,5 segundos, $p < 0,05$) e em 62% após 72 horas (96,3 vs. 59,3 segundos, $p < 0,05$) (Figura 14).

Esses resultados sugerem que independente da terapia utilizada, o TS aumentou ao longo do tempo, indicando que a administração consecutiva de doses do medicamento pode ocasionar esse evento. O aumento do TS também indica uma menor coagulação e, conseqüentemente, formação de trombo.

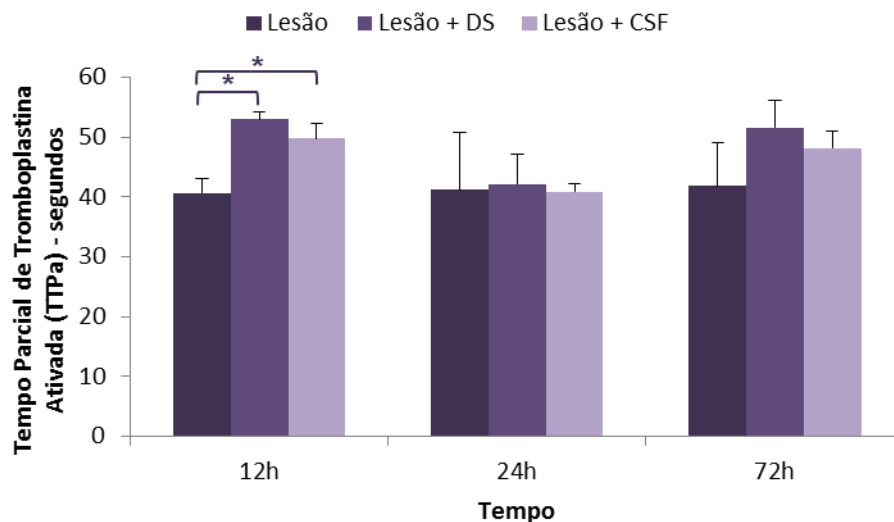


Figura 12. Tempo Parcial de Tromboplastina ativada (TTPa). O TTPa foi dosado em plasma de camundongos C57BL/6 12, 24 e 72 horas após lesão mecânica provocada pela introdução de uma sonda metálica na artéria carótida comum. Os grupos analisados foram: Lesão (sem tratamento), Lesão tratados com dermatan sulfato e Lesão tratados com condroitin sulfato fucosilado. (*) Representa significância estatística entre os grupos.

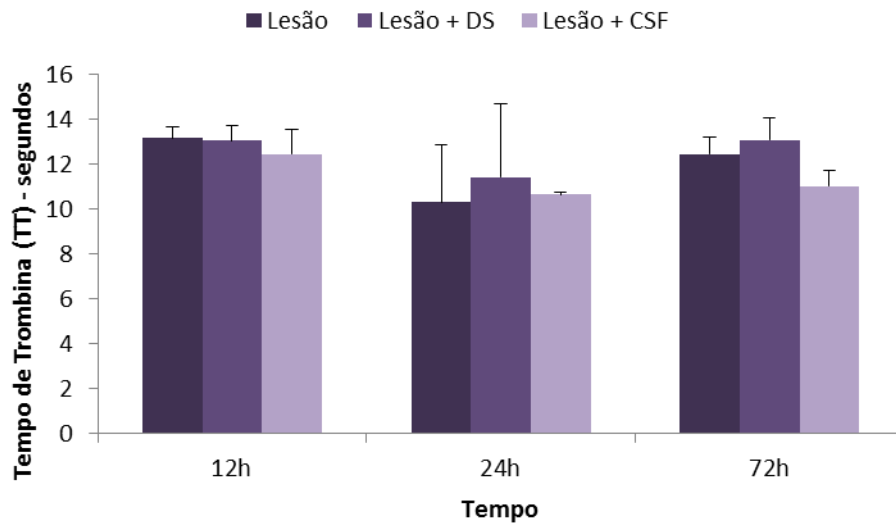


Figura 13. Tempo de Trombina (TT). O TT foi dosado no plasma de camundongos C57BL/6 divididos em 3 grupos: lesionado 12, 24 e 72 horas; lesionado tratados com DS 12, 24 e 72 horas e lesionado tratados com CSF 3, 6, 12, 24 e 72 horas.

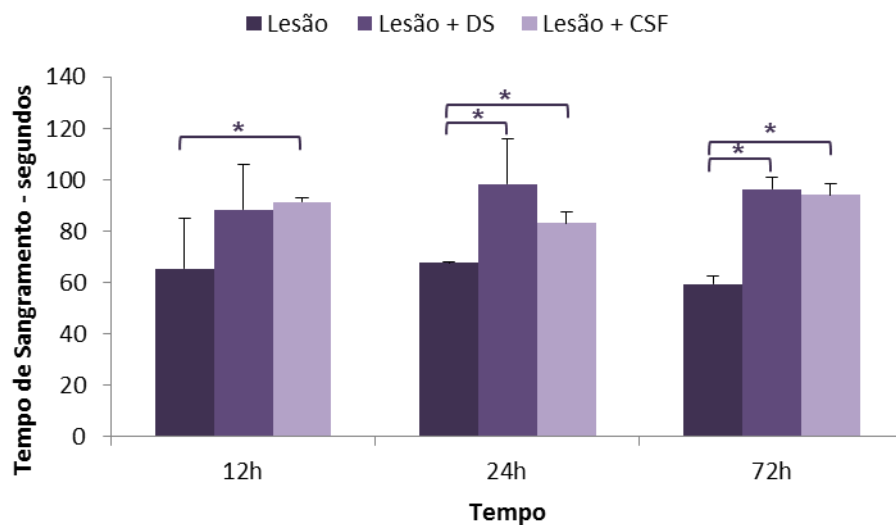


Figura 14. Tempo de Sangramento (TS). O tempo entre a incisão e a interrupção do sangramento foi cronometrado e considerado como o TS. O TS foi calculado em camundongos C57BL/6 12, 24 e 72 horas após lesão mecânica provocada pela introdução

de uma sonda metálica na artéria carótida comum. Os grupos analisados foram: Lesão (sem tratamento), Lesão tratados com dermatan sulfato e Lesão tratados com condroitin sulfato fucosilado. (*) Representa significância estatística entre os grupos.

3. Terapia com CPE concomitante com DS: prevenção na resposta inflamatória e trombose após lesão arterial em camundongos C57BL6.

a. Influência de tratamentos utilizando DS com ou sem terapia celular na formação de trombo.

A formação de trombo se inicia imediatamente após a exposição do fator tecidual ao sangue circulante. Analisamos a capacidade de cada tratamento em evitar essa reação trombótica. Analisamos também a camada média da artéria carótida para se determinar se algum tratamento é capaz de provocar um aumento nessa área.

No primeiro dia após a lesão arterial, observamos que o tratamento com DS foi capaz de diminuir a formação de trombo em aproximadamente 53% em relação ao grupo lesionado (6212 vs. 13043,5 μm^2 , $p<0,05$) (Figura 15A e B e Figura 16A). Diminuição no tamanho da área de trombo também foi observado nos animais tratados com MNC – 37% (8190,8 vs. 13043,5 μm^2 , $p<0,05$) (Figura 15D e Figura 16A), MNC DS – 53% (6068,5 vs. 13043,5 μm^2 , $p<0,05$) (Figura 15E e Figura 16A) e CPE DS – 99% (38,5 vs. 13043,5 μm^2 , $p<0,05$) (Figura 15H e Figura 16A).

No terceiro dia de análise após a cirurgia arterial, animais tratados com DS apresentaram uma diminuição na formação de trombo na magnitude de 81% em relação ao grupo lesionado (2682,66 vs. 14303,67 μm^2 , $p<0,05$) (Figura 15G e H e Figura 16A). Essa diminuição também foi observada nos grupos tratados com MNC – 82% (2445 vs. 14303,67 μm^2 , $p<0,05$) (Figura 15I e Figura 16A), MNC DS – 89% (1570 vs. 14303,67 μm^2 , $p<0,05$) (Figura 15J e Figura 16A), CPE – 68% (4491,5 vs. 14303,67 μm^2 , $p<0,05$) (Figura 15K e Figura 16A) e CPE DS – 98% (211 vs. 14303,67 μm^2 , $p<0,05$) (Figura 15L e Figura 16A).

A área da camada média das artérias carótidas apresentou uma diminuição em camundongos tratados com MNC (3261,8 vs. 7191 μm^2 , 3 dias após a lesão arterial em

relação ao grupo sem tratamento, $p < 0.05$), MNC DS (3849,5 vs. 5892,66 μm^2 1 dia após a lesão arterial; 3487 vs. 7191 μm^2 3 dias após a lesão arterial quando comparados com camundongos sem tratamento, $p < 0.05$) ou CPE DS (4222 vs. 5892,66 μm^2 , 1 dia após a lesão arterial, $p < 0.05$) (Figura 16B).

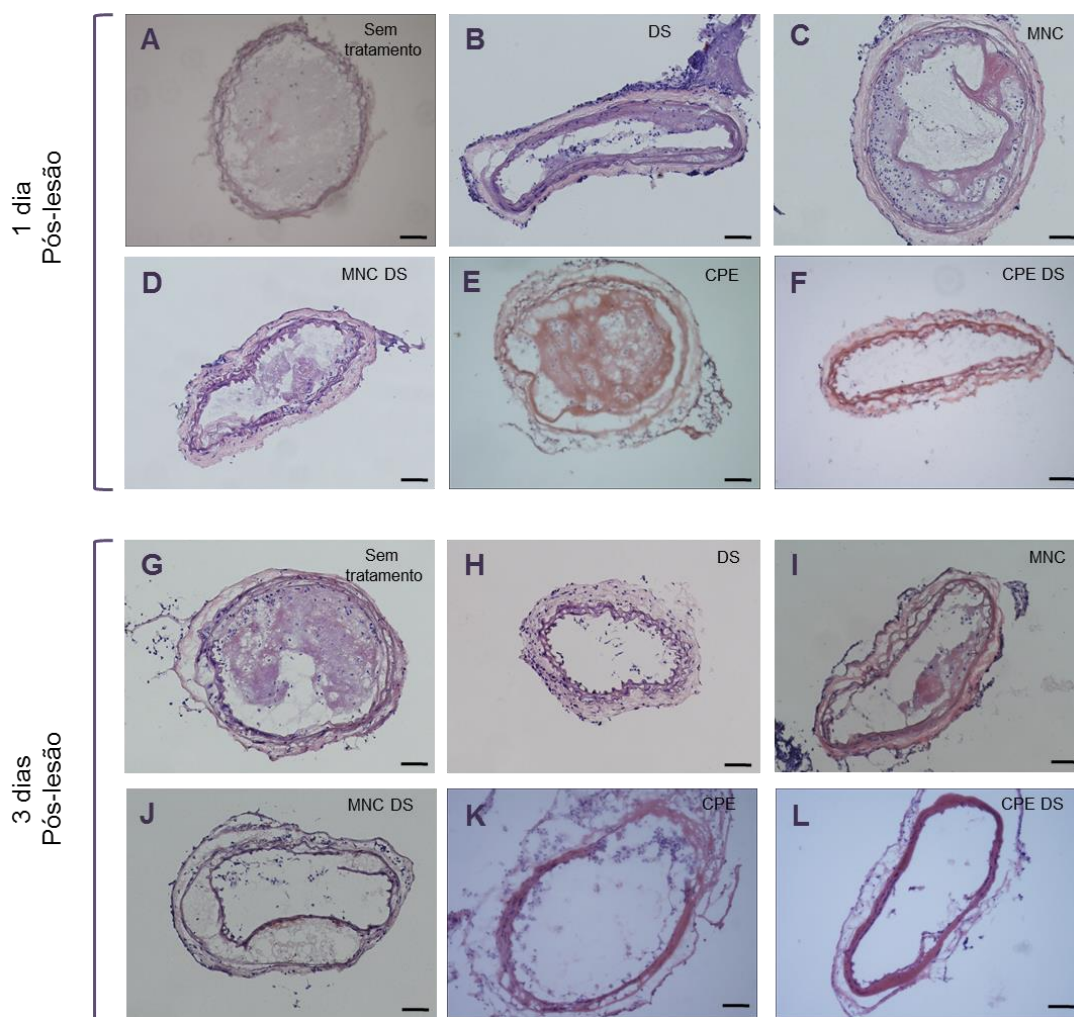


Figura 15. Artérias carótidas comuns de camundongos C57BL6 1 e 3 dias após injúria arterial. Cortes corados com Hematoxilina-Eosina. Vinte cortes de cada artéria foram analisados e o corte com maior formação de trombo foi selecionado. (A – F) Artérias de camundongos 1 dia após a lesão arterial. Artérias de camundongos 3 dias após a lesão arterial. (A e G) artéria do grupo lesionado – sem tratamento; (B e H) artéria do grupo tratado com DS; (C e I) artéria do grupo tratado com MNC (D e J) artéria do grupo tratado com MNC DS; (E e K) artéria do grupo tratado com CPE; (F e L) artéria do grupo tratado com CPE DS. Barra = 50 μ m.

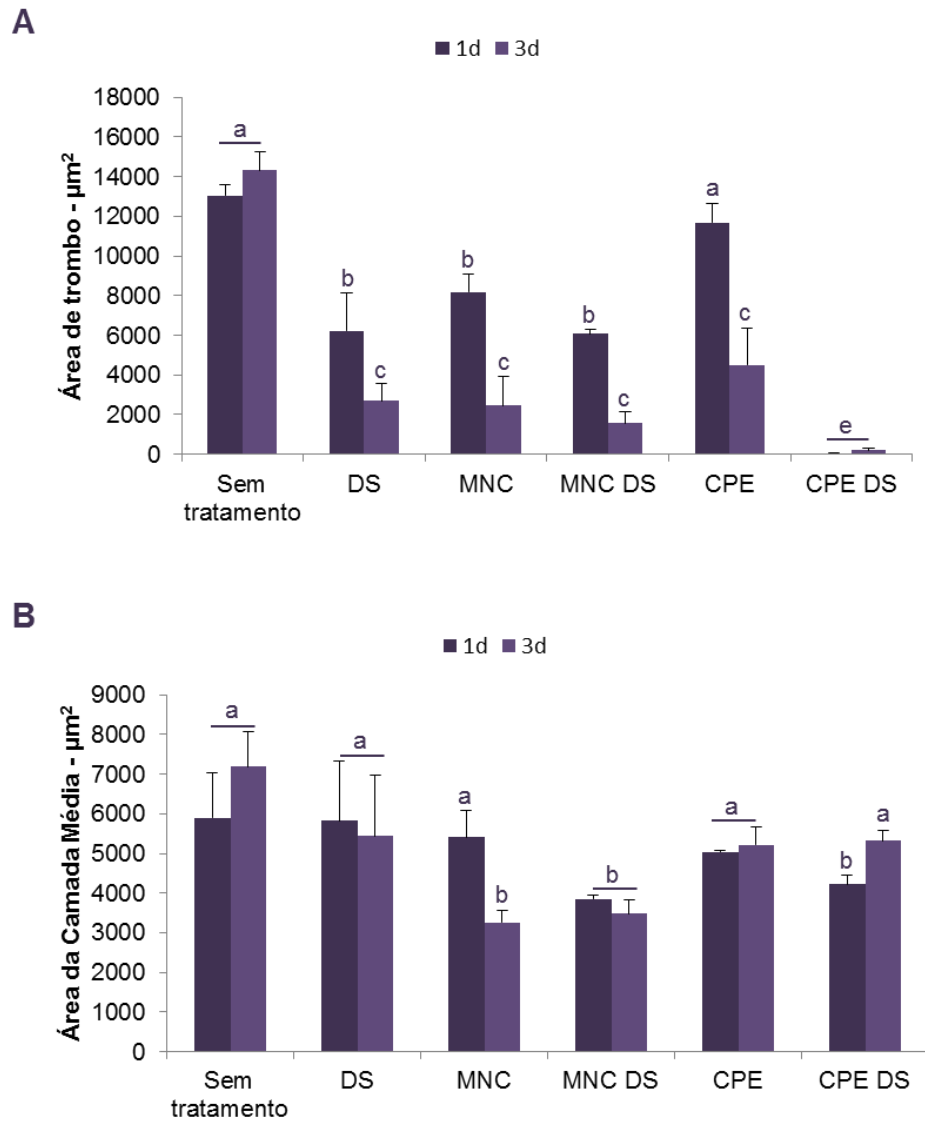


Figura 16. Área de trombo e camada média. (A) A área de trombo (μm^2) foi quantificada como descrito em Materiais e Métodos. (B) Área da média (μm^2) quantificada como descrito em Materiais e Métodos. As colunas representam os valores médios para cada grupo + desvio padrão; $n=3$ para cada grupo. Letras diferentes demonstram significância estatística.

b. A atividade gelatinolítica diminui na presença de DS.

Analizamos a atividade de gelatinases ‘in situ’ através do uso da DQ gelatina, a qual é um substrato fluorogênico usado para a detecção de atividade de proteases com alta sensibilidade. Esse substrato é composto por gelatina conjugada com fluoresceína (FITC); se houver a digestão proteolítica, há a emissão de uma fluorescência verde, a qual pode ser usada para medir a atividade enzimática.

Como as artérias carótidas são compostas por 3 camadas de lâmina elástica, as quais apresentam uma auto-fluorescência característica, subtraímos a fluorescência natural da lâmina elástica do valor encontrado nas artérias incubadas com DQ gelatina. A figura 8M representam artéria não incubadas com o substrato.

A administração de DS ocasionou uma diminuição na atividade gelatinolítica nas artérias carótidas desses animais; tal atividade foi 48% menor quando comparado com o grupo sem tratamento no dia 1 (76,05 vs. 147,17, $p < 0,05$) (Figura 17A e B e Figura 18) e aproximadamente 44% menor no dia 3 (100,01 vs. 180,05, $p < 0,05$) (Figura 17G e H e Figura 18). O tratamento com CPE DS também foi capaz de diminuir essa atividade mas apenas no dia 3, onde ocasionou uma diminuição de 57% (76,05 vs. 180,05, $p < 0,05$) (Figura 17L e Figura 18).

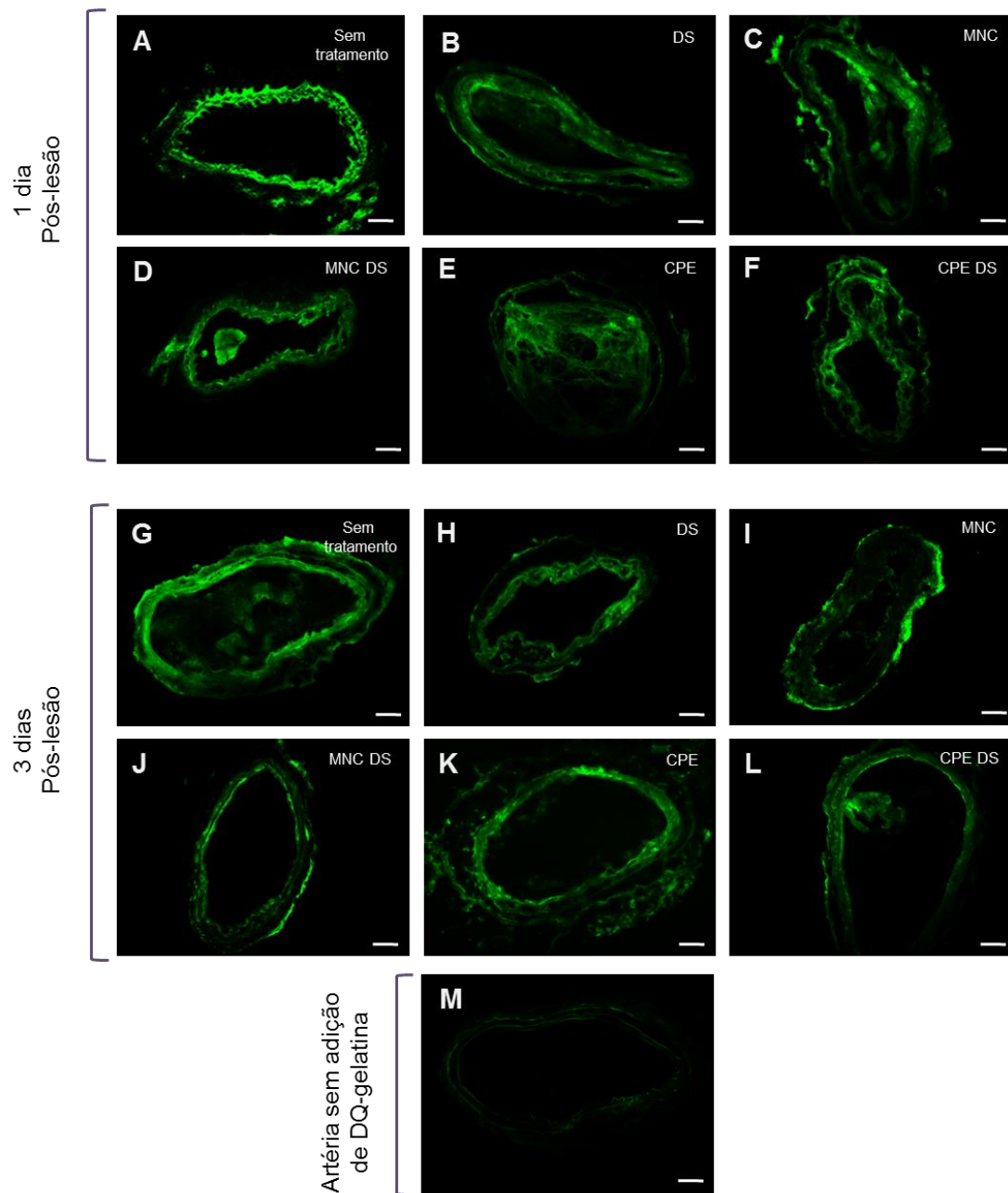


Figura 17. Zimografia *in situ* das artérias carótidas de camundongos C57BL6 1 dia após a lesão arterial. A zimografia foi realizada com o uso de DQ-gelatin conjugada com fluoresceína (FITC) (Invitrogen); a expressão foi analisada subtraindo-se a autofluorescência do tecido da fluorescência presente nas lâminas submetidas à técnica. (A – F) Artérias de camundongos 1 dia após a lesão. Artérias de camundongos 3 dias após a lesão. (A, G) artéria do grupo sem tratamento; (B, H) artéria do grupo tratado com DS; (C, I)

artéria do grupo tratado com MNC; (D, J) artéria do grupo tratado com MNC DS; (E, K) artéria do grupo tratado com CPE; (F, L) artéria do grupo tratado com CPE DS; (M) Artéria carótida lesionada – autofluorescência do tecido. Barra = 50 μ m.

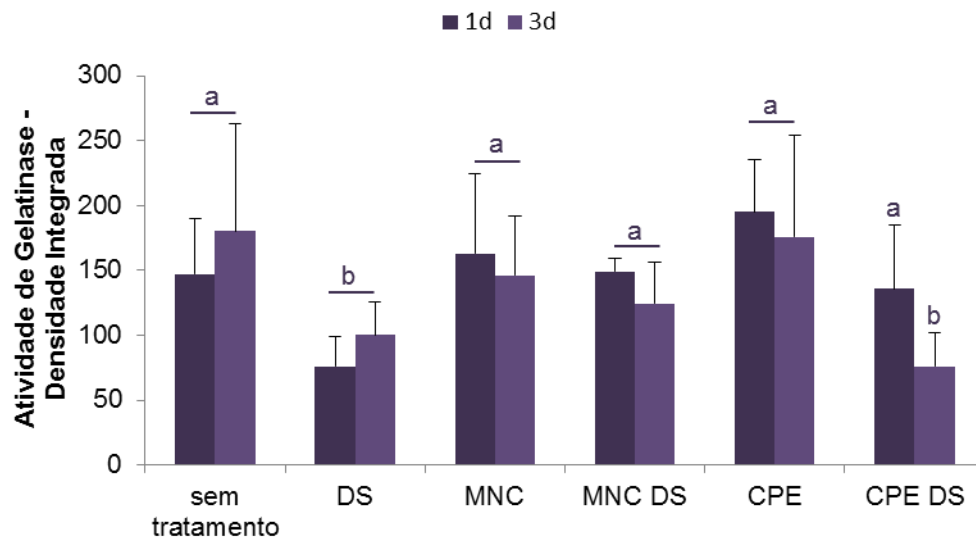


Figura 18. Técnica de Zimografia ‘in situ’ para a detecção de atividade de gelatinases – análise de densidade integrada no software ImageJ. Camundongos C57BL submetidos à injúria arterial foram sacrificados e a artéria carótida esquerda removida. Letras diferenças demonstram significância estatística.

c. O uso de DS promoveu uma maior migração de CPE para o local da lesão: possível papel de quimioatração.

De acordo com um estudo prévio do nosso laboratório (Godoy et al., 2011), observamos que camundongos que receberam tanto MNC como DS foram capazes de mobilizar um maior número de células marcadas com PKH26-GL para o local da lesão arterial; o número dessas células é maior em relação ao animais que receberam apenas as

MNCs. Baseado nesse resultado, analisamos a migração das CPE marcadas com PKH26-GL em 2 diferentes situações: 1) apenas CPE e 2) CPE junto com DS.

Os animais que receberam apenas CPE marcadas com PKH26-GL apresentaram uma maior quantidade dessas células no local da lesão no dia 3 quando comparado com o dia 1 (35,5 vs. 12,85 células, $p < 0,05$) (Figura 19A – 19F e Figura 20).

Quando administramos DS em conjunto com as CPE, houve uma maior migração dessas células para o local de injúria no dia 3 quando comparado com o grupo que recebeu apenas CPE (59 vs. 35,5 células/campo, $p < 0,05$) (Figura 19G – 19L e Figura 20).

Esse resultado demonstra que o DS pode estar atuando no local da lesão de modo a estabelecer um microambiente favorável à migração e adesão das CPE.

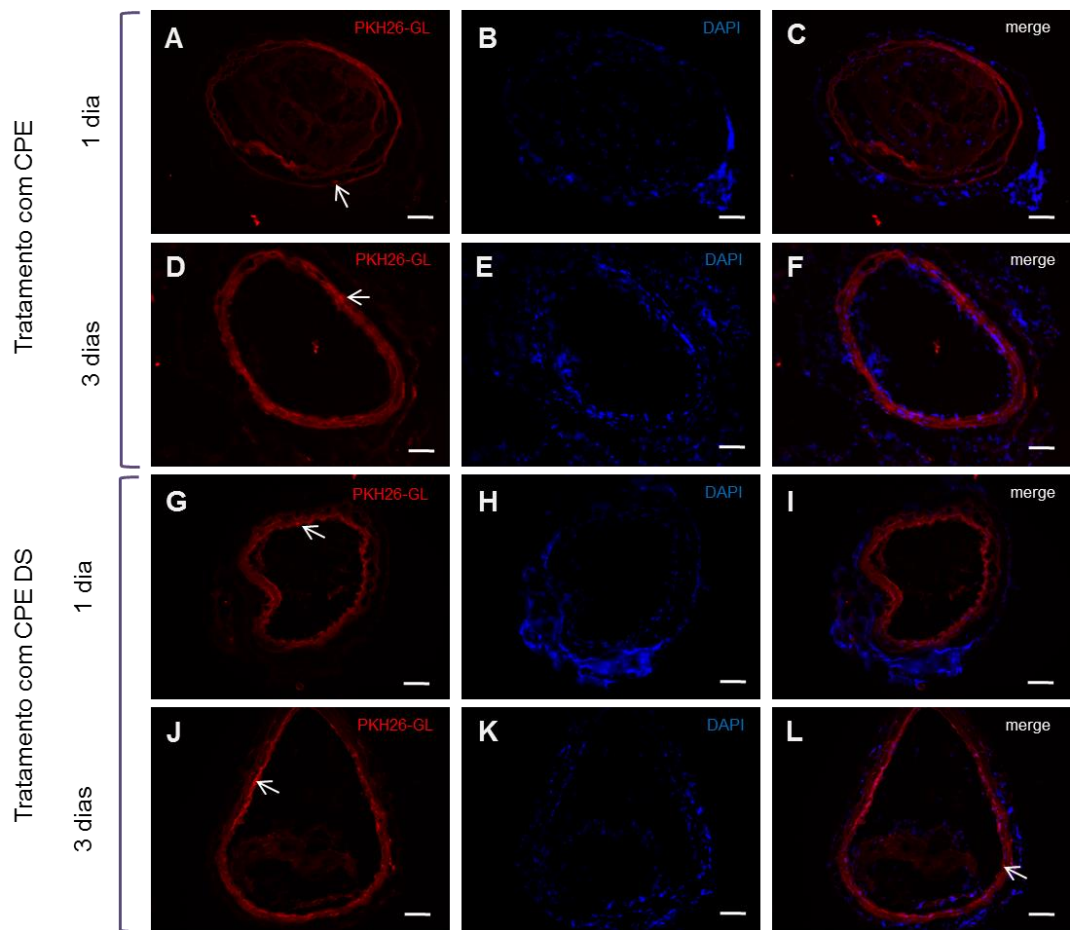


Figura 19. Migração de CPE na presença ou ausência de GAGs. As CPE foram marcadas com PKH26-GL (vermelho) e injetadas com ou sem DS ou CSF. (A) artéria carótida de camundongos 1 dia após a lesão injetados com CPE; (B) DAPI; (C) sobreposição das Figuras A e B; (D) artéria carótida de camundongos 3 dias após a lesão injetados com CPE; (E) DAPI; (F) sobreposição das Figuras D e E; (G) artéria carótida de camundongos 1 dia após a lesão injetados com CPE e DS; (H) DAPI; (I) sobreposição das Figuras G e H; (J) artéria carótida de camundongos 3 dias após a lesão injetados com CPE e DS; (K) DAPI; (L) sobreposição das Figuras J e K. Setas brancas indicam células na parede vascular. Barra = 50 μ m.

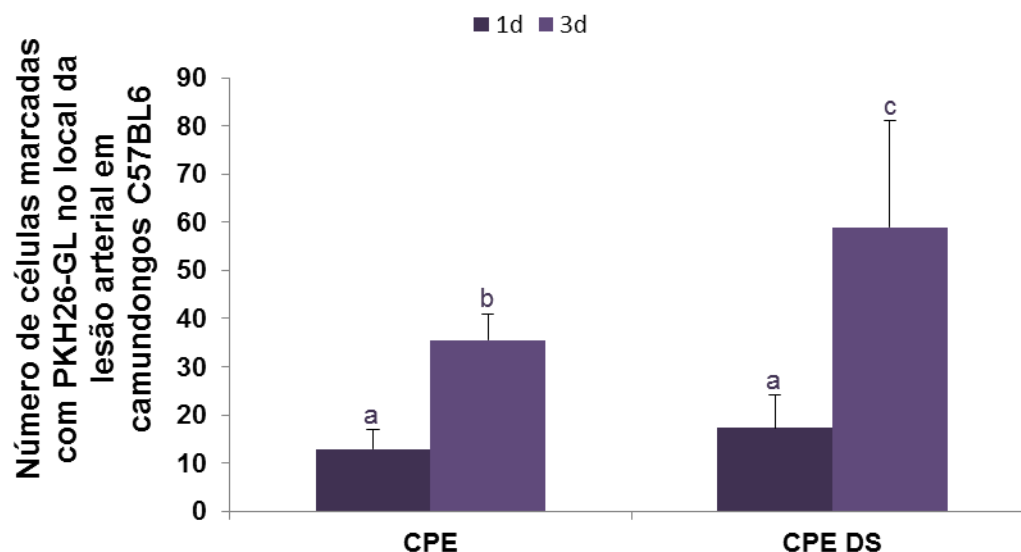


Figura 20. Migração das CPE na presença ou ausência de GAGs. As CPE marcadas com PKH26-GL e injetadas na presença ou ausência de DS 1 e 3 dias após a lesão arterial, foram quantificadas utilizando o software ImageJ. Letras iguais demonstram semelhança estatística e letras diferentes demonstram significância estatística.

d. Fator de crescimento transformante beta (TGF β).

O TGF- β é uma molécula cujo aumento de atividade pode estar relacionado com o aparecimento do chamado estado pró-fibrótico, onde células musculares lisas e fibroblastos são estimulados a sintetizar colágeno, as MMPs tem atividade diminuída, bem como as TIMPs terem a atividade aumentada (Ruiz-Ortega et al., 2007).

Em nosso trabalho, o TGF- β foi analisado de 2 maneiras: o TGF- β ativo e o TGF- β total. O TGF- β total é a soma do TGF- β ativo e o TGF- β latente.

O TGF- β ativo não apresentou diferença entre os diferentes grupos analisados tanto no dia 1 como no dia 3 (Figura 21A). Houve uma variação nos níveis dessa molécula ao longo do tempo, sendo diminuídos em todos os grupos no dia 3 (Figura 21A).

Quando analisamos o TGF- β total, observamos que animais tratados com MNC DS apresentaram um aumento de aproximadamente 146% no dia 1 (11167,18 vs. 4529,81

pg/mL, $p < 0,05$) (Figura 21B). Os demais grupos não apresentaram diferenças entre si (Figura 21B).

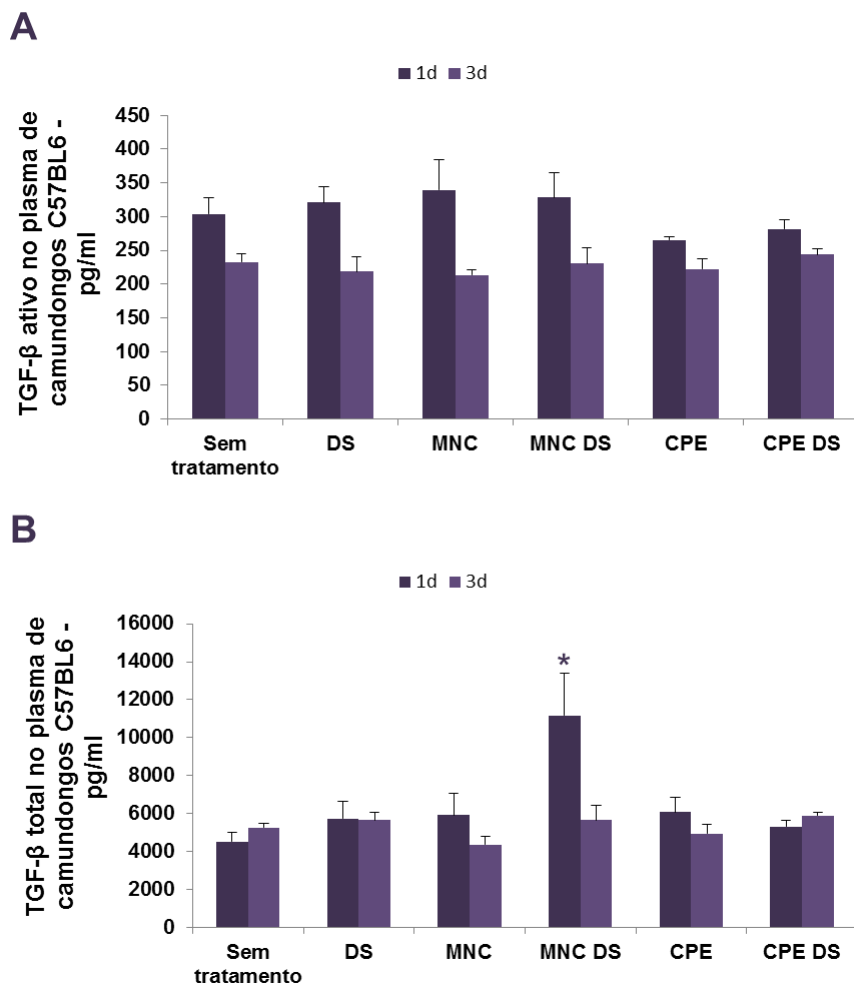


Figura 21. Quantificação do Fator de Transformação do Crescimento β (TGF β) no plasma de camundongos C57BL6. O TGF β foi dosado no plasma de camundongos C57BL/6. (*) Representa significância estatística entre os grupos indicados.

e. Citocinas pró-inflamatória (TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10).

O TNF- α influencia na migração e proliferação das células musculares lisas presentes na parede vascular; essa citocina pode também regular a expressão de MMPs, em

especial a MMP-2. A IL-10 é uma citocina produzida por alguns tipos celulares e tem como função a inibição da resposta imune. Essa molécula foi quantificada no plasma de camundongos C57BL6 para se verificar se algum tratamento apresentavam um caráter de inibição inflamatória.

Alguns tratamentos foram capazes de aumentar a quantidade de TNF- α 1 dia após a lesão arterial; a administração de CPE aumentou em 124% a quantidade dessa citocina (1160,98 vs. 517,64 pg/mL, $p < 0,05$) (Figura 22A) e o tratamento com CPE DS aumentou a quantidade de TNF- α em aproximadamente 215% comparados com o grupo sem tratamento (1631,55 ou 1710,29 vs. 517,64 pg/mL, $p < 0,05$) (Figura 22A).

No dia 3, todos os tratamentos aumentaram a quantidade desta citocina em relação ao dia 1. Mas o tratamento com CPE DS apresentou um aumento significativo em relação ao grupo sem tratamento; esse aumento corresponde a 72% (9270,56 vs. 5361,43 pg/mL, $p < 0,05$) (Figura 22A).

Os tratamentos analisados no nosso modelo de lesão arterial não foram capazes de promover mudança nos níveis de IL-10 quando comparamos com os animais que não receberam tratamento (Figura 22B).

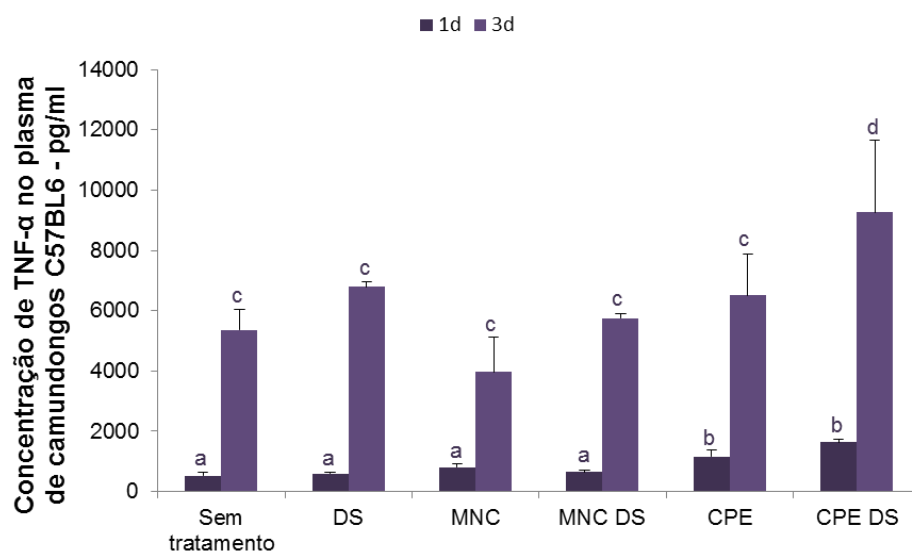
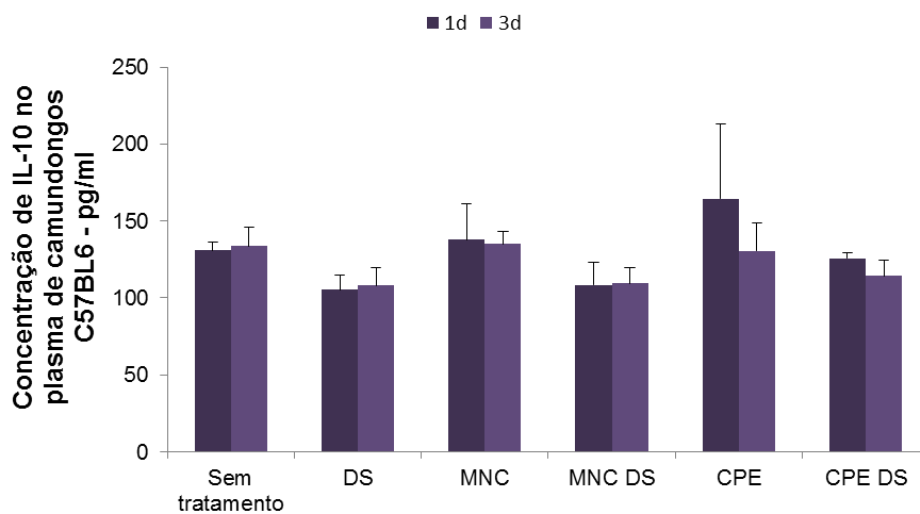
A**B**

Figura 22. Quantificação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10) no plasma de camundongos C57BL6. A determinação dos níveis de TNF- α e IL-10 foram dosados no plasma de camundongos C57BL6. (A) Níveis de TNF- α no plasma (pg/mL). (B) Níveis de IL-10 no plasma (pg/mL). Letras diferentes representam significância estatística.

f. Fator derivado de estroma 1

Um estudo prévio do nosso laboratório mostrou que a administração de DS juntamente com MNC provocou uma maior migração dessas células para o local da lesão em camundongos C57BL6 (Godoy et al., 2011). Nosso grupo acredita-se que glicosaminoglicanos como DS podem atuar como quimioatratores para essas células. Entre os fatores principais que ajudam na mobilização dessas células está o SDF-1.

No presente estudo, observamos que a terapia com DS foi capaz de provocar uma maior liberação de SDF-1 tanto no sangue circulante como no local da lesão no primeiro dia após a intervenção cirúrgica; esse GAG aumentou em 96% a presença de SDF-1 no plasma quando comparado com o grupo lesionado (745,54 vs. 379,63 pg/mL, $p < 0,05$) (Figura 23D) e provoca um aumento em torno de 4,76 vezes no local da lesão em relação ao grupo sem tratamento (Figura 23A, B e C). No plasma, os demais tratamentos não provocaram mudanças em relação ao grupo lesionado tanto no dia 1 como no dia 3 (Figura 23D).

Entretanto, no local da lesão, tratamentos com MNC e CPE DS aumentaram a expressão desse fator no dia 1 após a cirurgia. O uso de MNC ocasionou um aumento de cerca de 9,64 vezes e CPE DS 8,31 vezes em relação ao grupo sem tratamento (Figura 23 A, B e C). No terceiro dia após a lesão, apenas os tratamentos com CPE ou CPE DS foram capazes de aumentar a expressão dessa molécula (2,02 ou 2,22 vezes, respectivamente) (Figura 23A, B e C).

Um estudo mostrou que a alta expressão de SDF-1 se relaciona com alta expressão de CXCR4, o qual é o receptor de SDF-1 existente em células da linhagem hematopoiética (Shiba et al., 2007). Isso explica o fato de tratamentos com MNC ou CPE provocarem uma maior expressão de SDF-1 no local da lesão; provavelmente essas células apresentam a expressão de CXCR4.

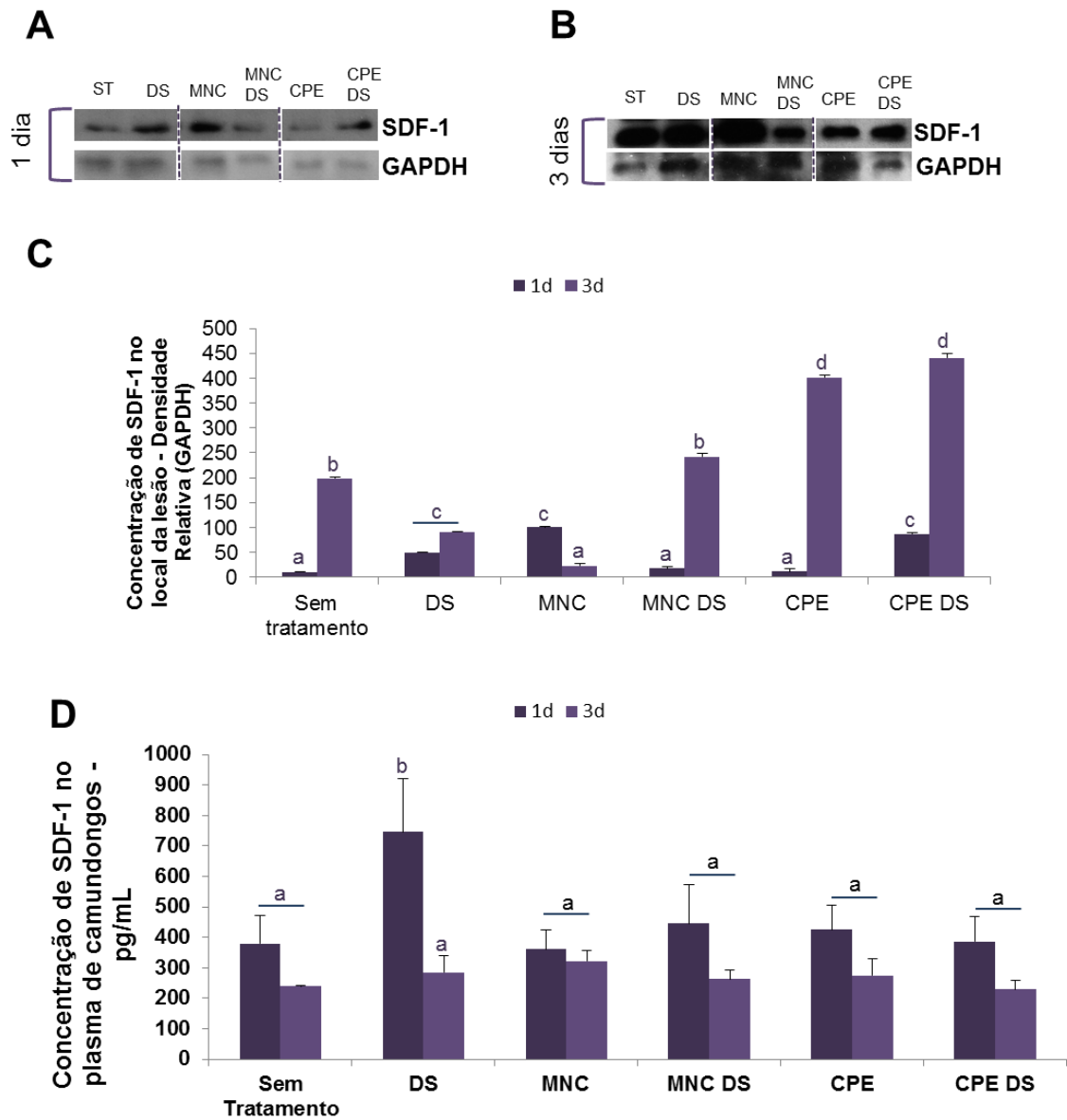


Figura 23. Quantificação do fator derivado de estroma 1 (SDF-1) em camundongos C57BL6. (A) expressão de SDF-1 no local da lesão 1 dia após a cirurgia. (B) expressão de SDF-1 no local da lesão 3 dias após a cirurgia. (C) Quantificação das bandas analisadas no software ImageJ e normalizadas com o controle interno (GAPDH). (D) Níveis de SDF-1 no plasma de camundongos C57BL6. Letras diferentes representam significância estatística.

g. Moléculas de adesão

As moléculas de adesão são responsáveis pela adesão de leucócitos à parede vascular (P-selectina) e, através de uma forte ligação, promovem a chamada ‘transmigração’ (ICAM-1), onde essas células migram para o espaço subendotelial.

A expressão de P-selectina 1 dia após a lesão arterial está aumentada nos grupos tratados com MNC DS (89%), CPE (398%) e CPE DS (258%) (Figura 24A e C). Essas terapias tem em comum o uso de células derivadas da medula óssea (MNC ou CPE), as quais podem estar aderindo à parede do vaso também através da molécula de P-selectina.

Como essa molécula é expressa nos momentos iniciais da lesão arterial, no dia 3 após a cirurgia, essa expressão diminui nos grupos tratados com MNC (40%), MNC DS (67%) ou CPE DS (53%) (Figura 24B e C); entretanto os grupos que receberam CPE (36%) continuaram a apresentar um aumento dessas moléculas (Figura 24B e C).

O tratamento com DS diminuiu a expressão de ICAM-1 no dia 3 (57%) (Figura 24E e F). O uso de MNC apresentou uma diminuição no dia 1 (69%) mas essa expressão é duplicada no dia 3 (100%); o uso do DS juntamente com MNC aumenta essa expressão no dia 1 (36%) mas foi capaz de ocasionar uma queda no terceiro dia (82%). (Figura 24D, E e F).

Tratamentos usando CPE mostraram um aumento na expressão de ICAM-1 tanto no dia 1 como no dia 3. Tal fato pode estar relacionado com uma maior adesão dessas células ao local da lesão como mostrado na Figura 19. O uso de CPE causou um aumento de 286% no dia 1 e 184% no dia 3 (Figura 24D, E e F); o DS juntamente com essas células também ocasionou um aumento nos dois momentos analisados (48% ou 398%, respectivamente, dia 1 ou 3) (Figura 24D, E e F).

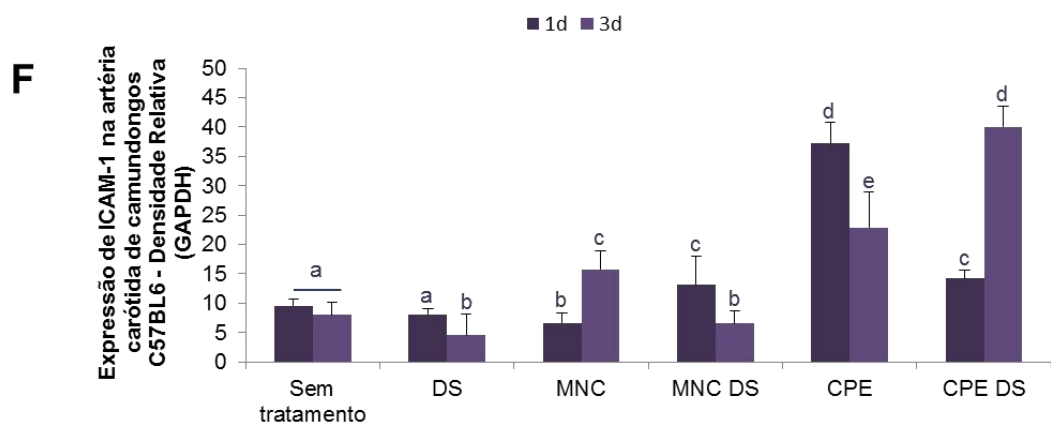
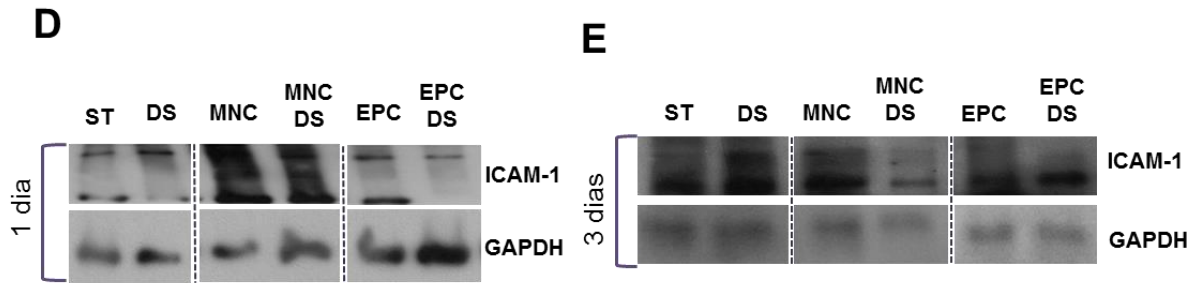
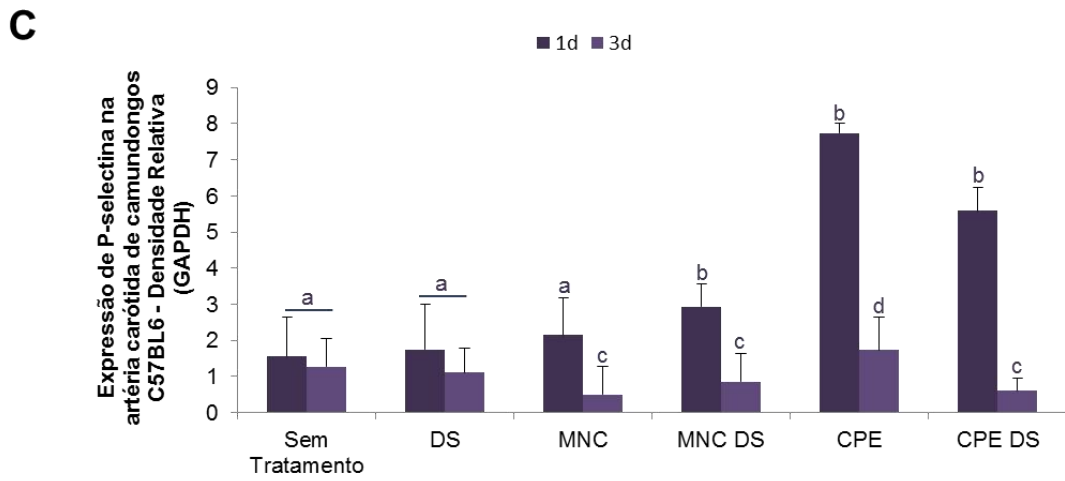
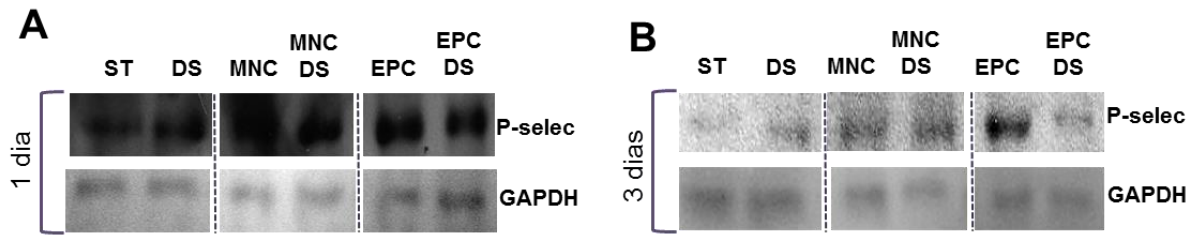


Figura 24. Quantificação das moléculas de adesão, P-selectina e ICAM-1, em camundongos C57BL6. A determinação da expressão de P-selectina no local da lesão foi realizada por western blotting, as bandas analisadas no software ImageJ e normalizadas com o controle interno (GAPDH) (A) expressão de P-selectina 1 dia após a lesão; (B) expressão de P-selectina 3 dias após a lesão; (C) Quantificação das bandas por ImageJ; (D) expressão de ICAM-1 1 dia após a cirurgia; (E) expressão de ICAM-1 3 dias após a lesão; (F) Quantificação da intensidade das bandas por ImageJ. Colunas no gráfico representam média da diferença relativa em relação ao grupo sem tratamento. Letras diferentes demonstram significância estatística.

h. eNOS

A expressão de eNOS está relacionada com a produção local de NO, o qual é um potente inibidor de adesão e agregação plaquetária que também está envolvido no mecanismo de tônus vascular. A lesão vascular causa uma diminuição na expressão dessa molécula e tratamentos que revertam esse efeito são de grande interesse no campo cardiovascular.

A lesão arterial utilizada no nosso modelo causou a diminuição da expressão de eNOS tanto no dia 1 (53%) como no dia 3 (64%) em relação a artéria sem lesão (Figura 25A, B e C); no dia 1 apenas os tratamentos com MNC ou CPE DS foram capazes de resgatar essa expressão, mostrando similaridade com os dados obtidos das artérias sem lesão (5% e 2%, respectivamente, MNC ou CPE DS) (Figura 25A e C). Os demais tratamentos não foram eficientes em reverter esse efeito (Figura 25A e C).

No terceiro dia após a lesão, os tratamentos utilizando MNC ou MNC DS ou CPE DS foram capazes de aumentar a expressão de eNOS (25% ou 3% ou 11%, respectivamente) em relação ao grupo não lesionado. Os outros tratamentos não resgataram a expressão dessa molécula (Figura 25B e C).

Esses resultados mostram que as terapias capazes de reverter a perda de expressão de eNOS são de grande interesse e, entre eles, estão os tratamentos utilizando células derivadas da medula óssea (MNC ou CPE); isso demonstra que essas células podem estar contribuindo para a melhora do tônus vascular.

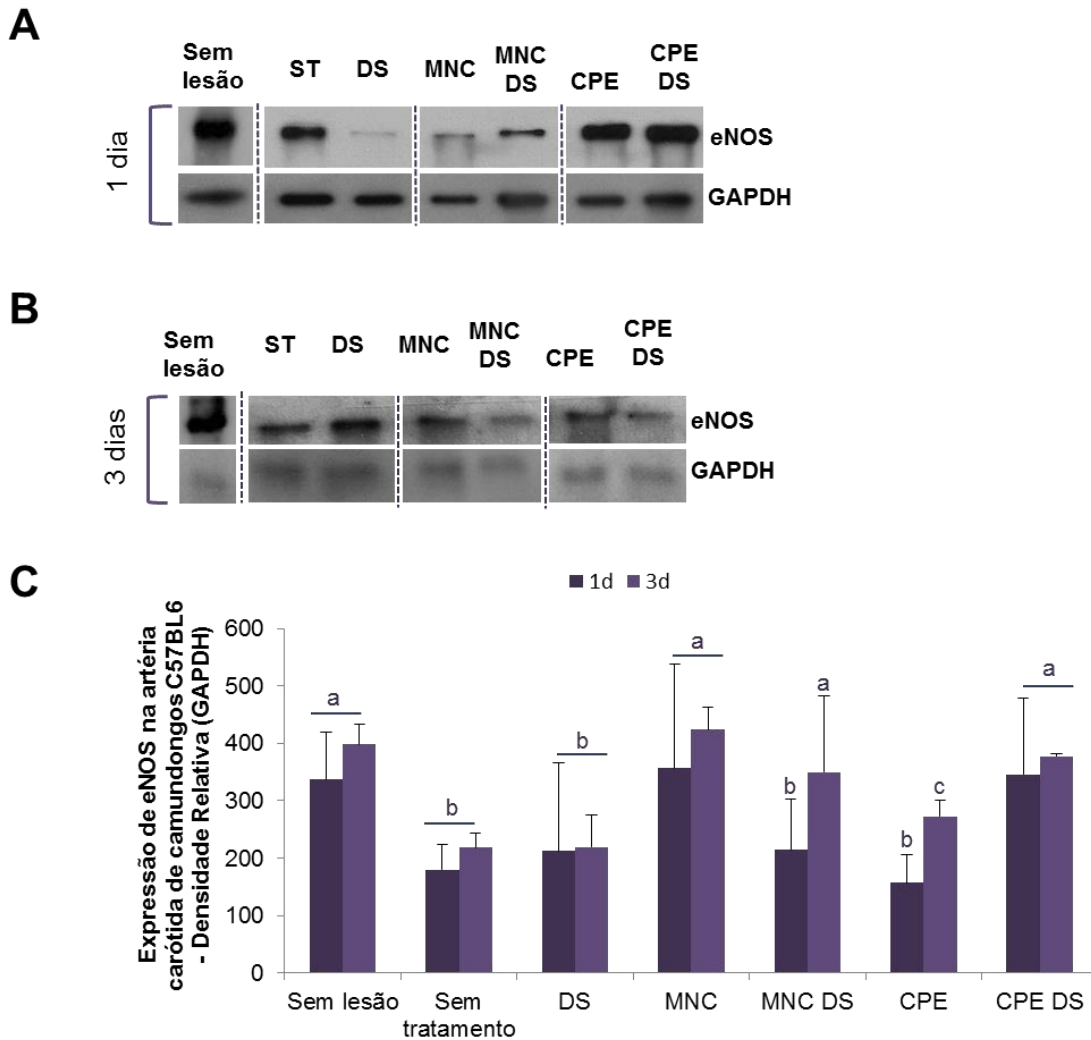


Figura 25. Quantificação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em camundongos C57BL6. A determinação da expressão de eNOS no local da lesão foi realizada por western blotting, as bandas analisadas no software ImageJ e normalizadas com o controle interno (GAPDH). (A) Expressão de eNOS 1 dia após a lesão. (B) expressão de eNOS 3 dias após a lesão. (C) Quantificação da intensidade das bandas. Colunas no gráfico representam média da diferença relativa em relação ao grupo sem tratamento. Letras diferentes demonstram significância estatística.

4. A ação do chondroitin sulfato fucosilado na resposta inflamatória em camundongos C57BL6 que sofreram lesão arterial.

a. Influência do CSF na formação de trombo na presença ou ausência de terapia celular.

No primeiro dia após a lesão arterial, observamos que o tratamento com MNC e MNC CSF foram eficientes em reduzir o trombo quando comparados ao grupo sem tratamento [37% (8190,8 vs. 13043,5 μm^2) e 70% (3906,5 vs. 13043,5 μm^2), respectivamente, $p < 0,05$] (Figura 26A, C e D e Figura 27A). O tratamento com CPE CSF provocou um aumento de aproximadamente 148% em relação ao grupo sem tratamento (32451,5 vs. 13043,5 μm^2 , $p < 0,05$) (Figura 26F e 27A).

A área da camada média aumentou nos grupos tratados com CSF 1 dia após a lesão arterial, na presença ou ausência de MNC ou CPE. Isso demonstra que possivelmente o CSF pode estar causando uma proliferação exacerbada de células da camada média, visto que o maior aumento se deve ao tratamento isolado com esse GAG. A área aumentou em cerca de 184% quando tratado com CSF (16736,33 vs. 5892,667 μm^2 , $p < 0,05$) (Figura 26B e 27B); o tratamento com MNC CSF aumentou essa área em aproximadamente 61% (9506,33 vs. 5892,667 μm^2 , $p < 0,05$) (Figura 26D e 27B) e a administração de CPE CSF causou um aumento de 43% (8466,667 vs. 5892,667 μm^2 , $p < 0,05$) (Figura 26F e 27B). Os demais grupos não diferiram no tamanho da área da camada média.

No terceiro dia de análise após a cirurgia arterial, animais tratados com MNC e CPE apresentaram diminuição na formação de trombo [82% (2445 vs. 14303,67 μm^2) e 68% (4491,5 vs. 14303,67 μm^2), respectivamente, $p < 0,05$] (Figura 26C e E e Figura 27A).

A área da camada média das artérias carótidas não diferiu entre os grupos analisados no terceiro dia (Figura 27B).

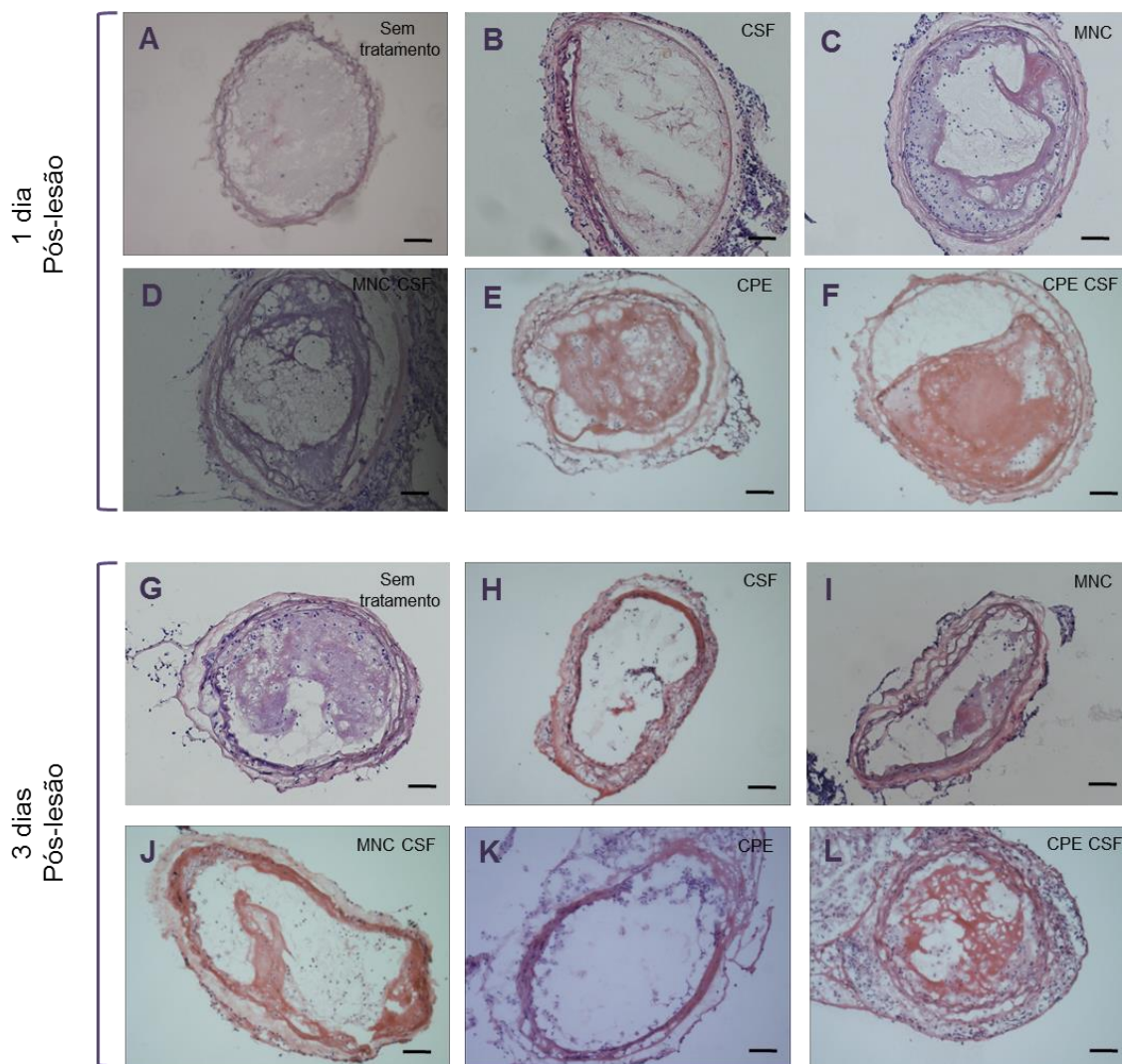


Figura 26. Artérias carótidas comuns de camundongos C57BL/6 1 e 3 dias após injúria arterial. Cortes corados com Hematoxilina-Eosina. (A – F) Artérias de camundongos 1 dia após a lesão arterial. Artérias de camundongos 3 dias após a lesão arterial. (A e G) artéria do grupo lesionado – sem tratamento; (B e H) artéria do grupo tratado com CSF; (C e I) artéria do grupo tratado com MNC (D e J) artéria do grupo tratado com MNC CSF; (E e K) artéria do grupo tratado com CPE; (F e L) artéria do grupo tratado com CPE CSF. Barra = 50 μ m.

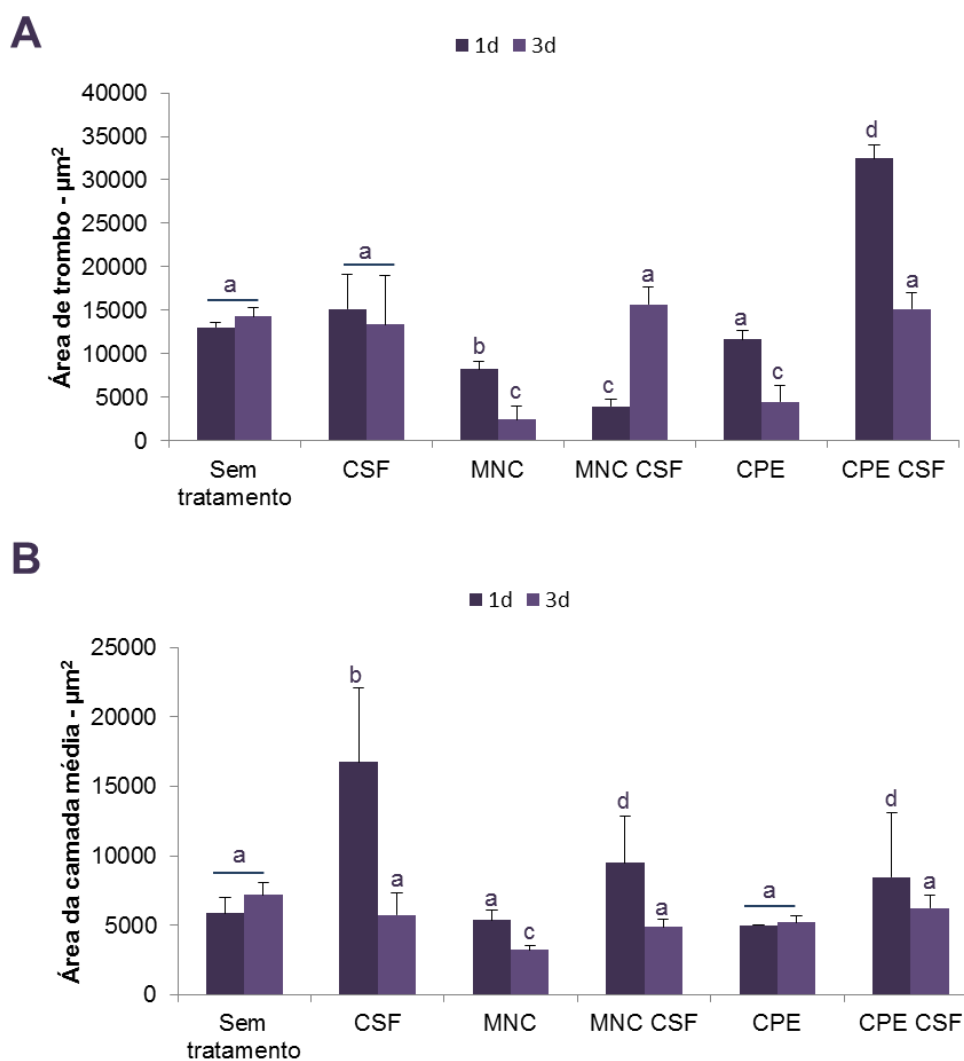


Figura 27. Área de trombo e camada média. (A) A área de trombo (μm^2) foi quantificada como descrito em Materiais e Métodos. (B) Área da média (μm^2) quantificada como descrito em Materiais e Métodos. As colunas representam os valores médios para cada grupo + desvio padrão; n=3 para cada grupo. Letras diferentes demonstram significância estatística.

b. Atividade gelatinolítica *in situ*.

O tratamento com CSF foi capaz de aumentar a atividade de gelatinase 'in situ'; tal aumento foi 145% quando comparado com o grupo sem tratamento no dia 1 ($p < 0,05$) (Figura 28A e B e Figura 29) e aproximadamente 123% no dia 3 ($p < 0,05$) (Figura 28G e H e Figura 29).

O tratamento com CPE CSF também ocasionou o aumento da atividade dessas enzimas no primeiro dia após a lesão, onde houve um aumento de cerca de 87% (276,29 vs. 147,17, $p < 0,05$) (Figura 28A e F e Figura 29).

Tais resultados demonstram que o GAG CSF pode estar envolvido tanto no aumento da atividade dessas enzimas como na diminuição da atividade dos inibidores dessas enzimas.

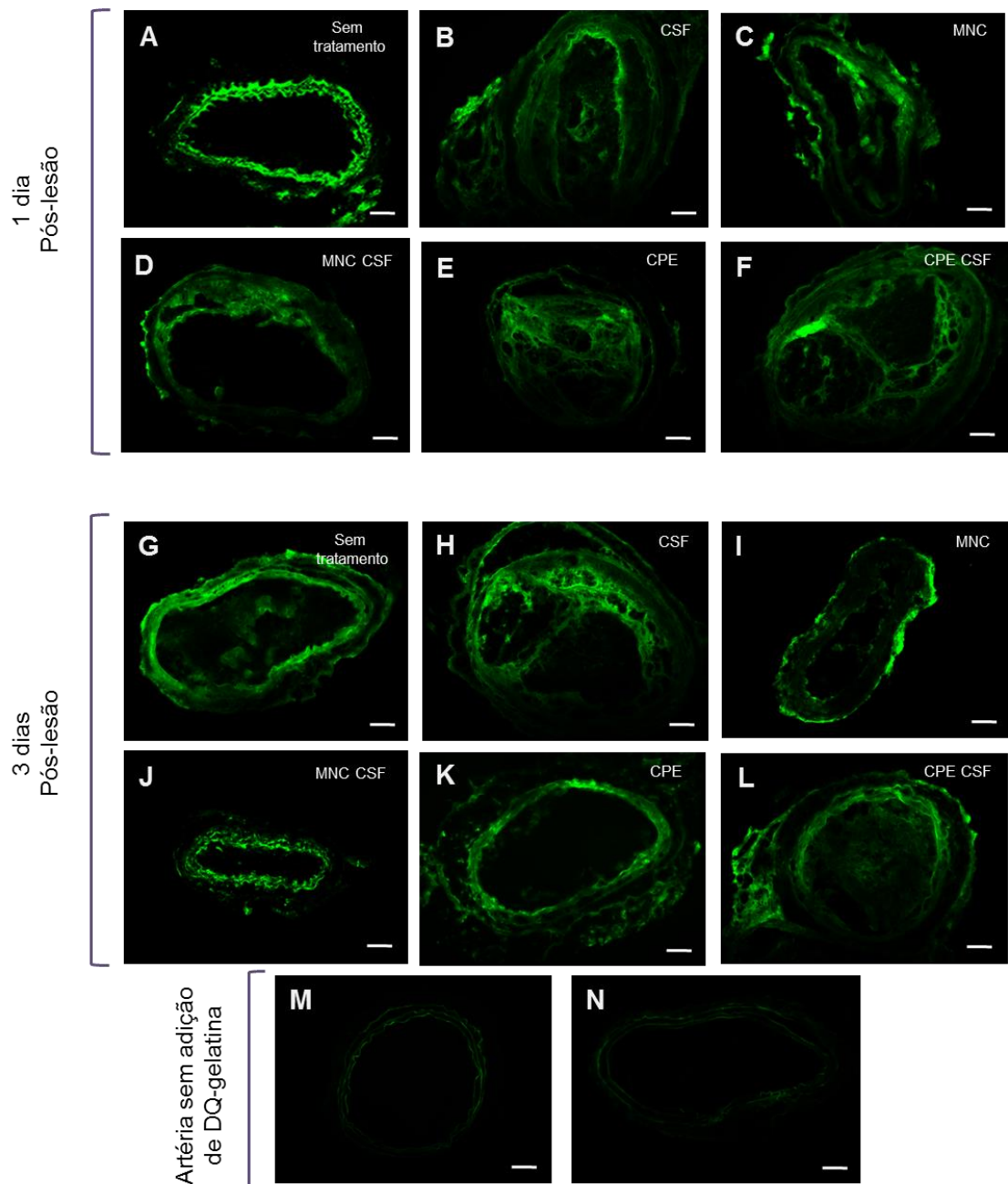


Figura 28. Zimografia *in situ* das artérias carótidas de camundongos C57BL/6 1 dia após a lesão arterial. A zimografia foi realizada com o uso de DQ-gelatin conjugada com fluoresceína (FITC) (Invitrogen); a expressão foi analisada subtraindo-se a autofluorescência do tecido da fluorescência presente nas lâminas submetidas à técnica. (A – F) Artérias de camundongos 1 dia após a lesão. Artérias de camundongos 3 dias após a lesão.

(A e G) artéria do grupo sem tratamento; (B e H) artéria do grupo tratado com CSF; (C e I) artéria do grupo tratado com MNC; (D e J) artéria do grupo tratado com MNC CSF; (E e K) artéria do grupo tratado com CPE; (F e L) artéria do grupo tratado com CPE CSF; (M e N) Artéria carótida lesionada – autofluorescência do tecido. Barra = 50 μ m.

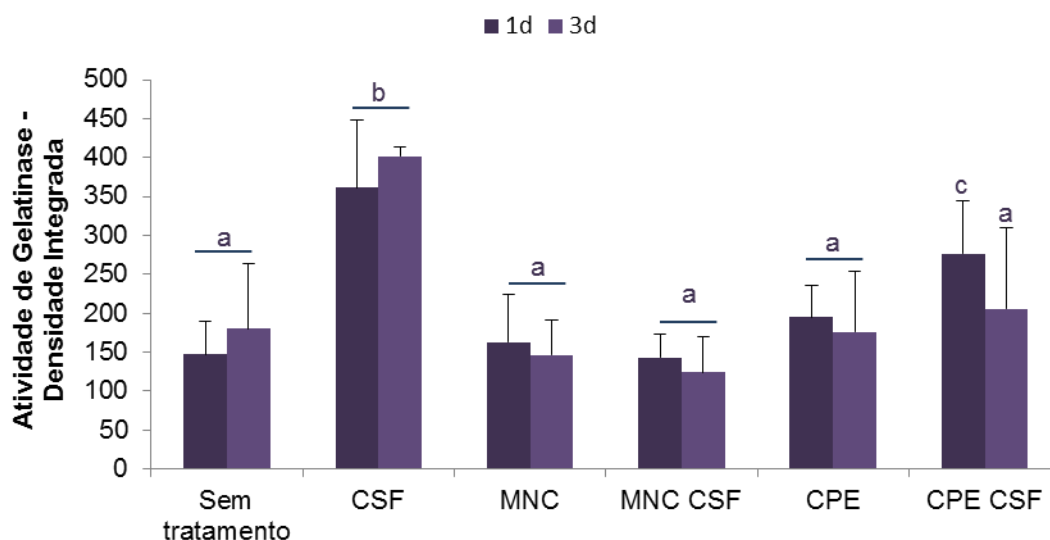


Figura 29. Técnica de Zimografia *in situ* para a detecção de atividade de gelatinases – análise de densidade integrada no software ImageJ. Camundongos C57BL submetidos à injúria arterial foram sacrificados e a artéria carótida esquerda removida. Letras diferenças demonstram diferença estatística.

c. Ação do CSF na migração de CPE para o local da lesão

Observamos que a administração de CSF foi capaz de mobilizar uma maior quantidade de células para o local da lesão no dia 1 após a intervenção cirúrgica quando comparado com o grupo que recebeu apenas as CPE (77,5 vs. 12,85 células/campo, $p < 0,05$) (Figura 30A-C e 21G-I e Figura 31). No dia 3 após a lesão, o CSF continuou a promover uma maior migração de células para o local da lesão (92,5 vs. 35,5 células/campo, $p < 0,05$) (Figura 30D-F e 21J-L e Figura 31). Diferentemente do DS, o CSF foi eficiente em promover a migração de células no primeiro momento de análise das artérias carótidas,

sugerindo que este GAG pode estar atuando de maneira mais eficaz na mobilização de células para o reparo endotelial.

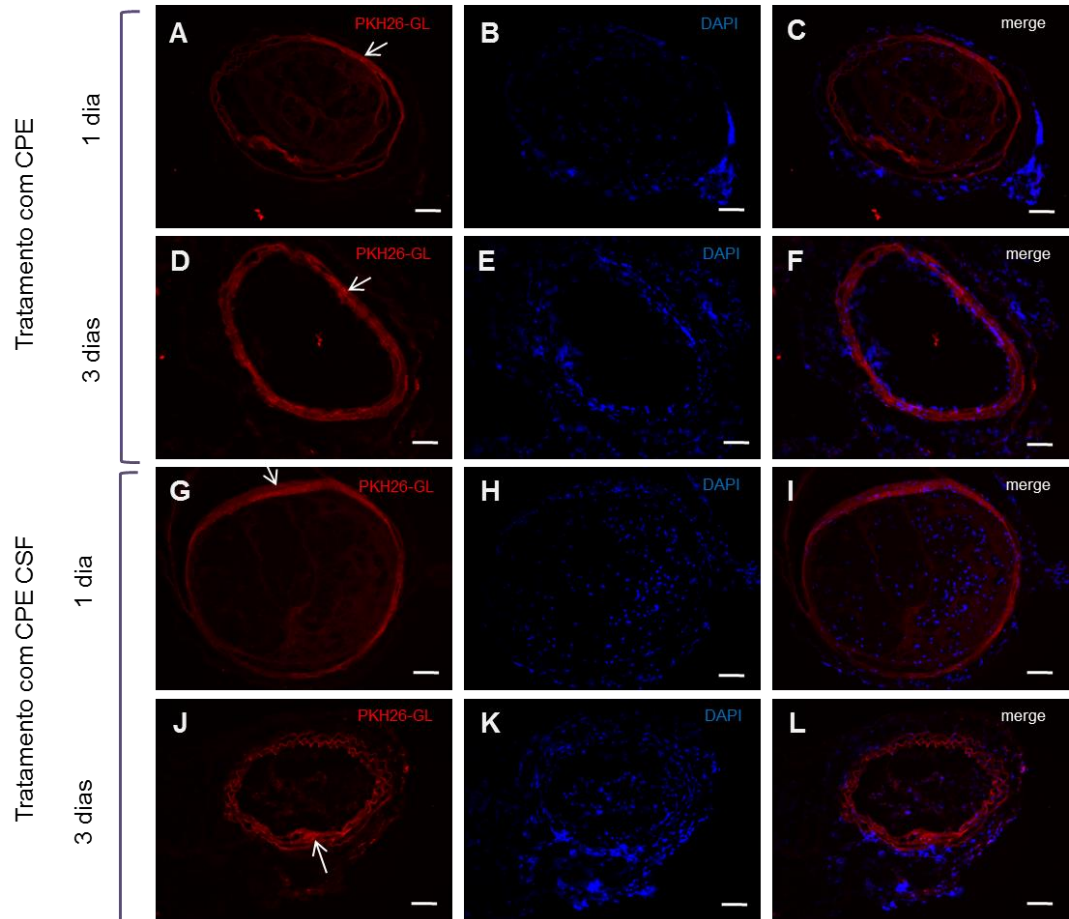


Figura 30. Migração de CPE na presença ou ausência de CSF. As CPE foram marcadas com PKH26-GL e injetadas com ou sem CSF. (A) artéria carótida de camundongos 1 dia após a lesão injetados com CPE; (B) DAPI; (C) sobreposição das Figuras A e B; (D) artéria carótida de camundongos 3 dias após a lesão injetados com CPE; (E) DAPI; (F) sobreposição das Figuras D e E; (G) artéria carótida de camundongos 1 dia após a lesão injetados com CPE e CSF; (H) DAPI; (I) sobreposição das Figuras G e H; (J) artéria carótida de camundongos 3 dias após a lesão injetados com CPE e CSF; (K) DAPI; (L) sobreposição das Figuras J e K. Setas brancas indicam células. Barra = 50 μ m.

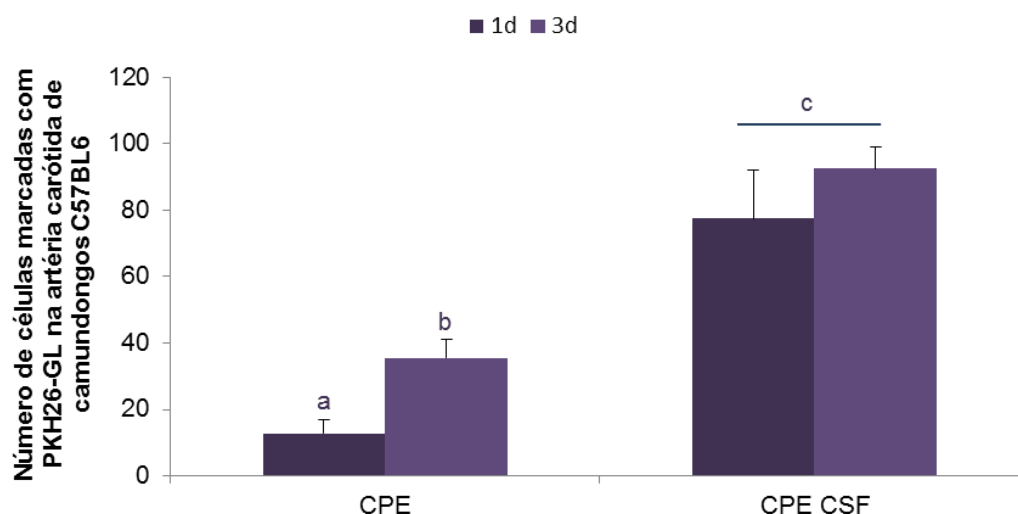


Figura 31. Migração das CPE na presença ou ausência de GAGs. As CPE marcadas com PKH26-GL e injetadas na presença ou ausência de CSF 1 e 3 dias após a lesão arterial, foram quantificadas utilizando o software ImageJ. Letras diferentes demonstram significância estatística.

d. Fator de crescimento transformante beta (TGFβ)

O TGF-β ativo não apresentou diferença entre os diferentes grupos analisados tanto no dia 1 como no dia 3 (Figura 32A). Houve uma maior quantidade de TGF-β no dia 1 mas essas quantidades diminuem em todos os grupos no dia 3.

Já o TGF-β total apresentou um aumento na sua concentração plasmática nos camundongos tratados com CSF; o aumento foi de aproximadamente 181% no dia 1 quando comparado com o grupo sem tratamento (12459,76 vs. 4529,81 pg/mL, $p < 0,05$) (Figura 32B).

Provavelmente, esse GAG por não inibir totalmente a formação de trombo, ocasiona uma maior quantidade de plaquetas o que explica a quantidade de TGF-β total maior no plasma dessas animais; ao mesmo tempo, o TGF-β estimula a produção de colágeno mas esse tratamento aumenta também a atividade de MMPs, falhando na inibição das TIMPs.

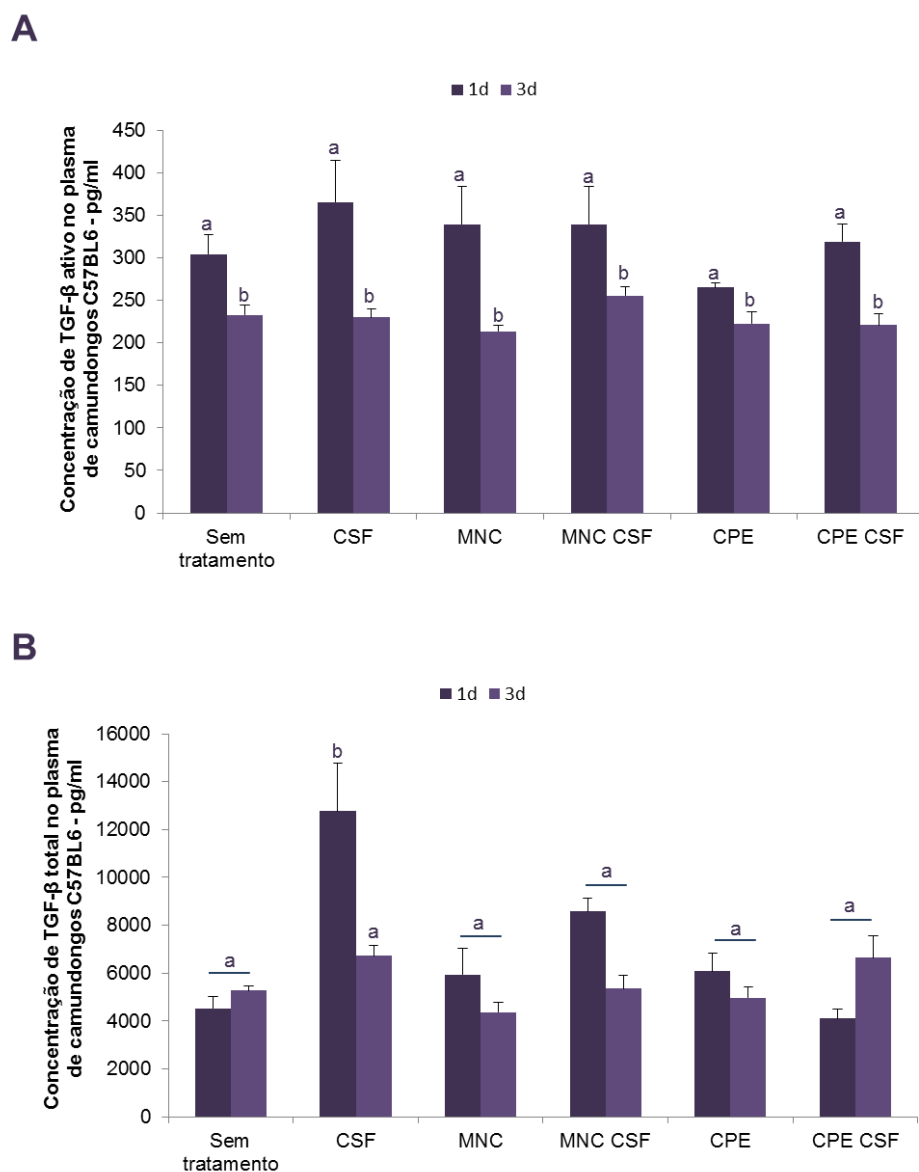


Figura 32. Quantificação do Fator de Transformação do Crescimento β (TGF β) no plasma de camundongos C57BL6. A determinação dos níveis de TGF β foram dosados no plasma de camundongos C57BL/6. Letras diferentes demonstram significância estatística.

e. Citocinas pró-inflamatória (TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10).

A administração de CSF aumentou a quantidade de TNF- α em 96% (1018,78 vs. 517,64 pg/mL, $p < 0,05$) (Figura 33A) no primeiro dia após a lesão arterial; o uso de CPE aumentou em 124% a quantidade dessa citocina (1160,98 vs. 517,64 pg/mL, $p < 0,05$)

(Figura 33A) e a administração de CPE CSF aumentou a quantidade de TNF- α em aproximadamente 230%, comparado com o grupo sem tratamento (1631,55 ou 1710,29 vs. 517,64 pg/mL, $p < 0,05$) (Figura 33A).

No dia 3, todos os tratamentos aumentaram a quantidade dessa citocina em relação ao dia 1. Alguns tratamentos foram capazes de diminuir a expressão dessa molécula 3 dias após a intervenção cirúrgica; a administração de CSF, MNC ou MNC CSF diminuíram a quantidade de TNF- α em aproximadamente 36%, 26% e 35%, respectivamente (3434,66 ou 3971,93 ou 3515,71 vs. 5361,43 pg/mL, $p < 0,05$) (Figura 33A).

Os tratamentos utilizados no nosso modelo de lesão arterial não foram capazes de aumentar a quantidade de IL-10 quando comparamos com os animais que não receberam tratamento; não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 33B).

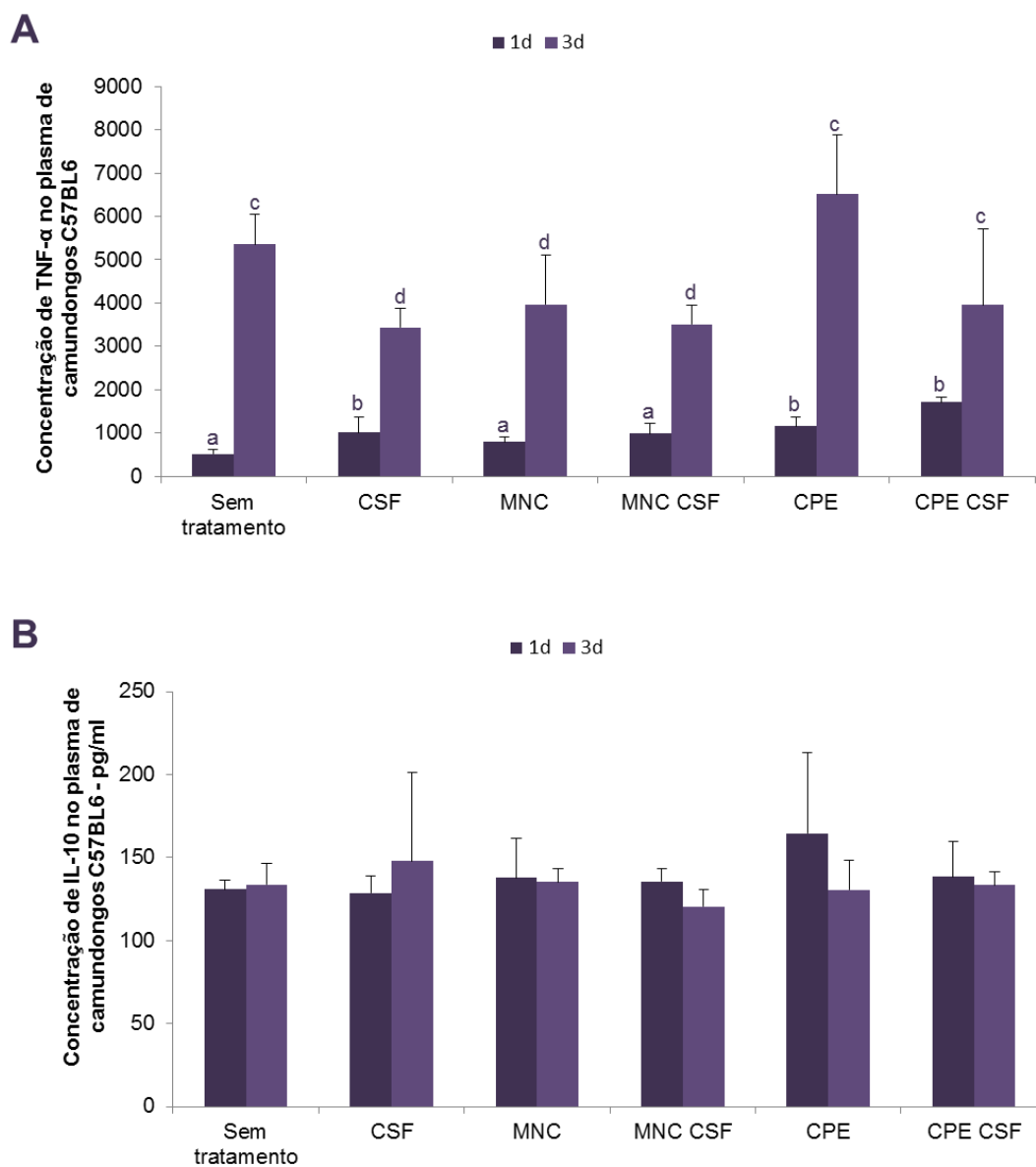


Figura 33. Quantificação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10) no plasma de camundongos C57BL/6. A determinação dos níveis de TNF- α e IL-10 foram dosados no plasma de camundongos C57BL/6. (A) Níveis de TNF- α no plasma (pg/mL). (B) Níveis de IL-10 no plasma (pg/mL). Letras diferentes demonstram significância estatística.

f. Fator derivado de estroma 1 (SDF-1)

O SDF-1 é um dos principais fatores envolvidos na mobilização de células a partir da medula óssea em direção ao sangue circulante.

O CSF provocou um aumento no nível de SDF-1 no dia 1 após a lesão arterial tanto no plasma (47% - 561,63 vs, 379,63 pg/mL, $p < 0,05$) (Figura 34D) como no local (4,76 vezes em relação ao grupo lesionado) (Figura 34A e 34C).

No nível plasmático, os demais tratamentos não provocaram mudanças em relação ao grupo sem tratamento tanto no dia 1 como no dia 3 (Figura 34D).

Entretanto, localmente o tratamento com MNC aumentou a expressão desse fator em cerca de 9,64 vezes no dia 1 após a cirurgia (Figura 25A e 25C). No terceiro dia após a lesão, apenas o tratamento com CPE foi capaz de aumentar a expressão dessa molécula (2,02 vezes) (Figura 34B e 34C). O uso de CSF, MNC ou CPE CSF provocaram diminuição na expressão de SDF-1 no dia 3 (90%, 89% ou 72%, respectivamente) (Figura 34B e 34C).

Um estudo mostrou que a alta expressão de SDF-1 se relaciona com alta expressão de CXCR4, o qual é o receptor de SDF-1 existente em células da linhagem hematopoiética (Shiba et al., 2007). Isso explica o fato de tratamentos com MNC ou CPE provocarem uma maior expressão de SDF-1 no local da lesão; provavelmente essas células apresentam a expressão de CXCR4.

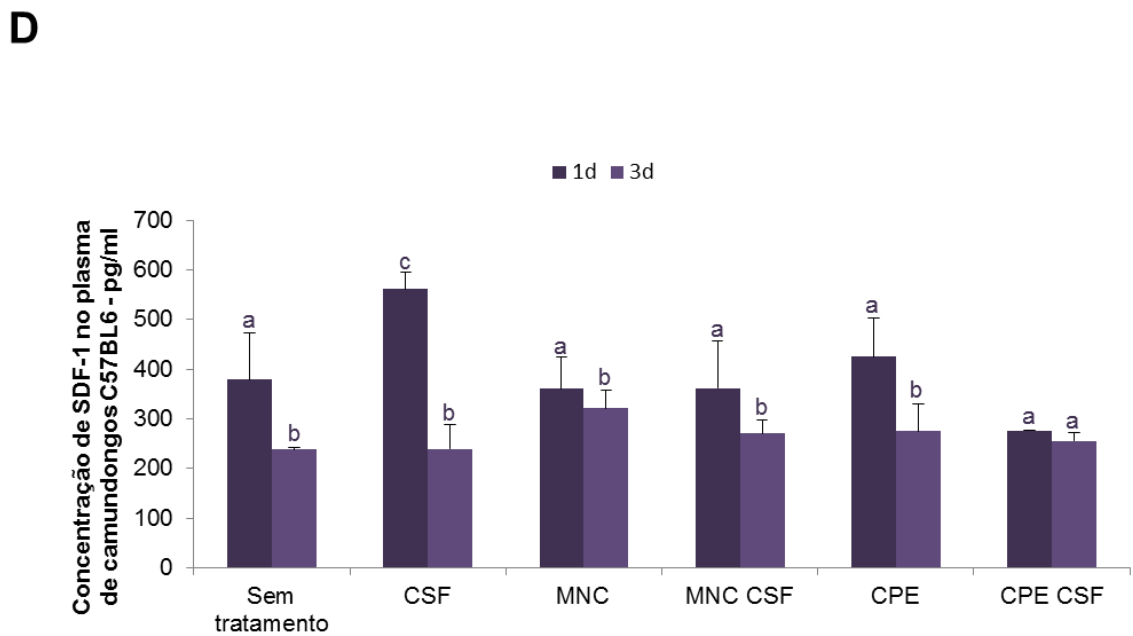
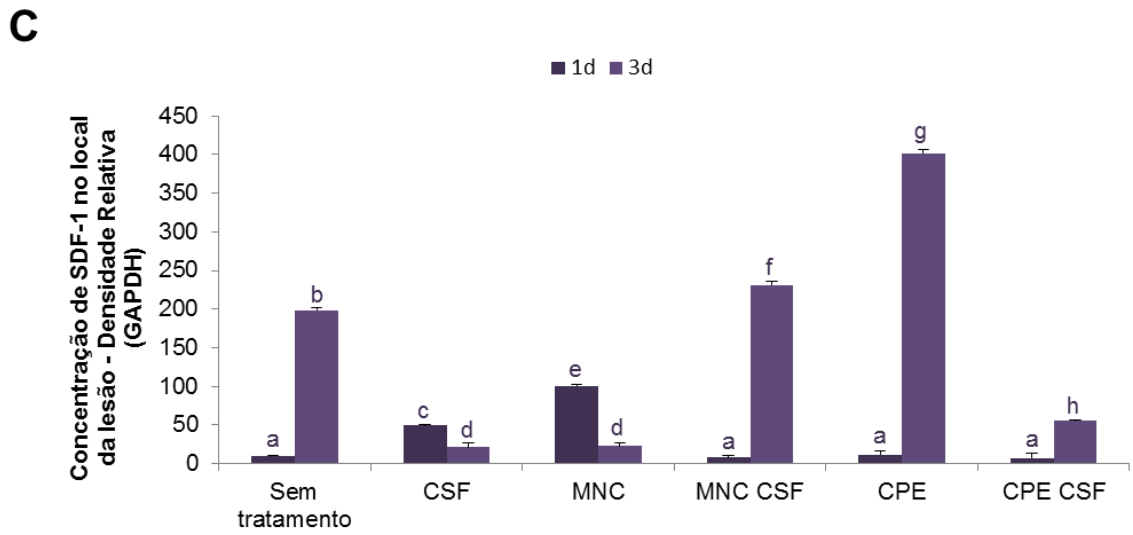
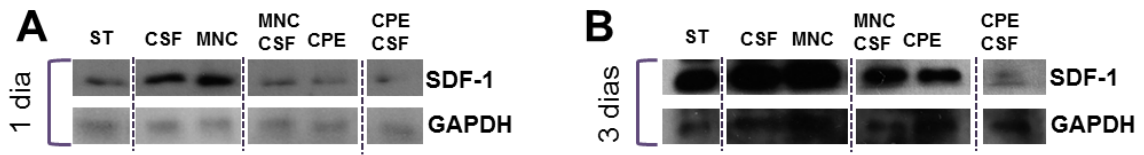


Figura 34. Quantificação do fator derivado de estroma 1 (SDF-1) em camundongos C57BL6. (A) expressão de SDF-1 no local da lesão 1 dia após a cirurgia. (B) expressão de SDF-1 no local da lesão 3 dias após a cirurgia. (C) Quantificação da intensidade das bandas no software ImageJ e normalizadas com o controle interno (GAPDH). (D) Níveis de SDF-1 no plasma de camundongos C57BL6. (B). Letras diferentes demonstram significância estatística.

g. Moléculas de adesão

A expressão de P-selectina 1 dia após a lesão arterial apresentou queda na expressão dessa molécula quando os animais foram tratados com CSF (30%) quando comparados com o grupo não tratado (Figura 35A e 35C). Os demais tratamentos apresentaram aumento da expressão (37% ou 114% ou 396% ou 73%, respectivamente, MNC ou MNC CSF ou CPE ou CPE CSF) (Figura 35A e 35C). Todas essas terapias tem em comum o uso de células derivadas da medula óssea (MNC ou CPE), as quais podem estar aderindo à parede do vaso também através da molécula de P-selectina.

Como essa molécula é expressa nos momentos iniciais da lesão arterial, no dia 3 após a cirurgia, essa expressão diminui em quase todos os tratamentos (40% ou 60% ou 70%, respectivamente, CSF ou MNC ou MNC CSF) exceto nos grupos que receberam CPE ou CPE CSF, onde houve um aumento de 36 e 87%, respectivamente (Figura 35B e 35C).

O tratamento com CSF não apresentou diferença com relação ao grupo sem tratamento quanto à expressão de ICAM-1 (Figura 35D, 35D e 35F). O uso de MNC apresentou uma diminuição no dia 1 (30%) mas essa expressão é duplicada no dia 3 (96%). O uso de CSF com MNC provocou uma queda nos dois momentos analisados (58% e 25%, respectivamente, 1 e 3 dias) (Figura 35D, 35E e 35F).

Tratamentos usando CPE mostraram um aumento da expressão de ICAM-1 tanto no dia 1 como no dia 3; tal fato pode estar relacionado com uma maior adesão dessas células ao local da lesão. O uso de CPE causou um aumento de 286% no dia 1 e 184% no dia 3 (Figura 35E e 35F). O tratamento de CPE CSF causou um aumento no primeiro dia (53%) mas essa aumento não se manteve ao longo do tempo, provocando uma diminuição de 57% (Figura 35D, 35E e 35F).

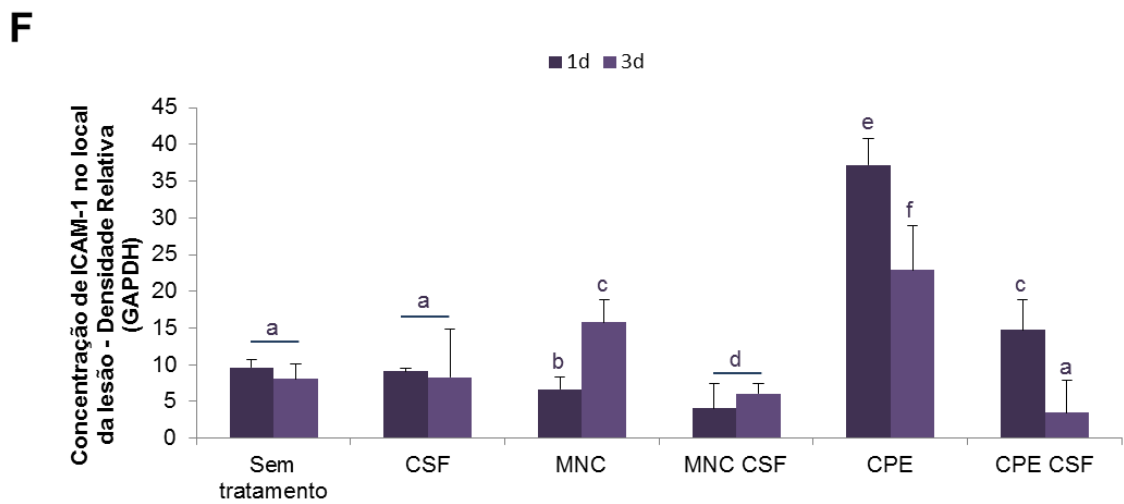
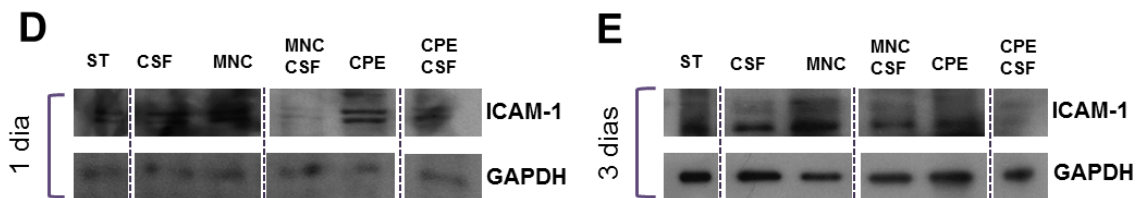
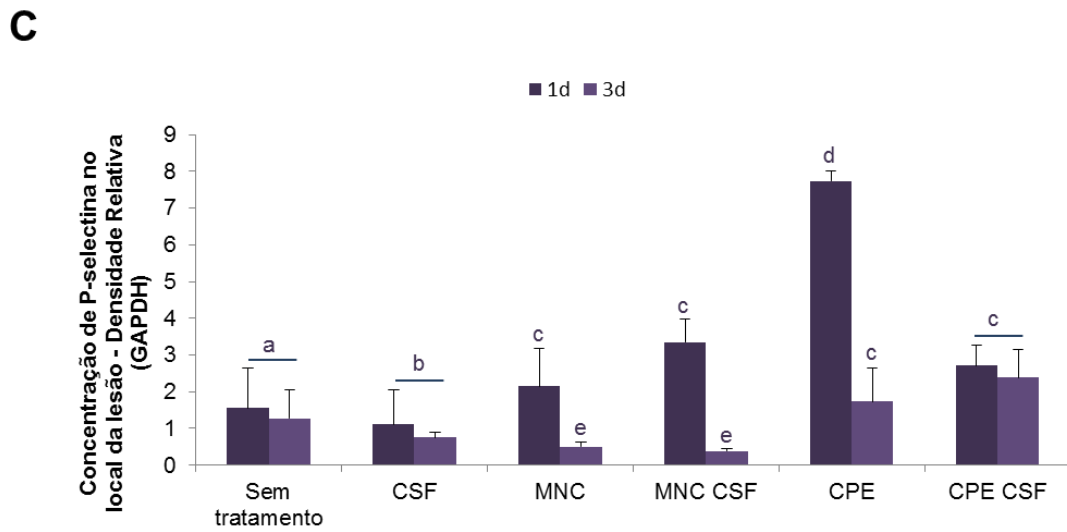
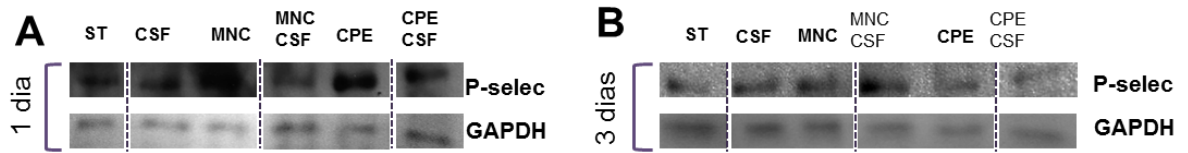


Figura 35. Quantificação das moléculas de adesão, P-selectina e ICAM-1, em camundongos C57BL6. A determinação da expressão de P-selectina no local da lesão foi realizada por western blotting, as bandas analisadas no software ImageJ e normalizadas com o controle interno (GAPDH) (A) expressão de P-selectina 1 dia após a lesão; (B) expressão de P-selectina 3 dias após a lesão; (C) Quantificação das bandas por ImageJ; (D) expressão de ICAM-1 1 dia após a cirurgia; (E) expressão de ICAM-1 3 dias após a lesão; (F) Quantificação da intensidade das bandas por ImageJ. Colunas no gráfico representam média da diferença relativa em relação ao grupo sem tratamento. Letras diferentes demonstram significância estatística.

h. eNOS

A lesão arterial utilizada no nosso modelo causou a diminuição da expressão de eNOS tanto no dia 1 (53%) como no dia 3 (64%) em relação a artéria sem lesão (Figura 36A e 36C); no dia 1 apenas os tratamentos com MNC foi capaz de resgatar essa expressão, mostrando similaridade com os dados obtidos das artérias sem lesão (357,00 vs. 337,22 densidade relativa) (Figura 36A e 36C). Os demais tratamentos não foram eficientes em reverter esse efeito (Figura 36A e 36C).

No terceiro dia após a lesão, o tratamento com MNC se manteve como o único que aumentou a expressão de eNOS (25%) em relação ao grupo não lesionado. Os outros tratamentos não resgataram a expressão dessa molécula (Figura 36B e 36C).

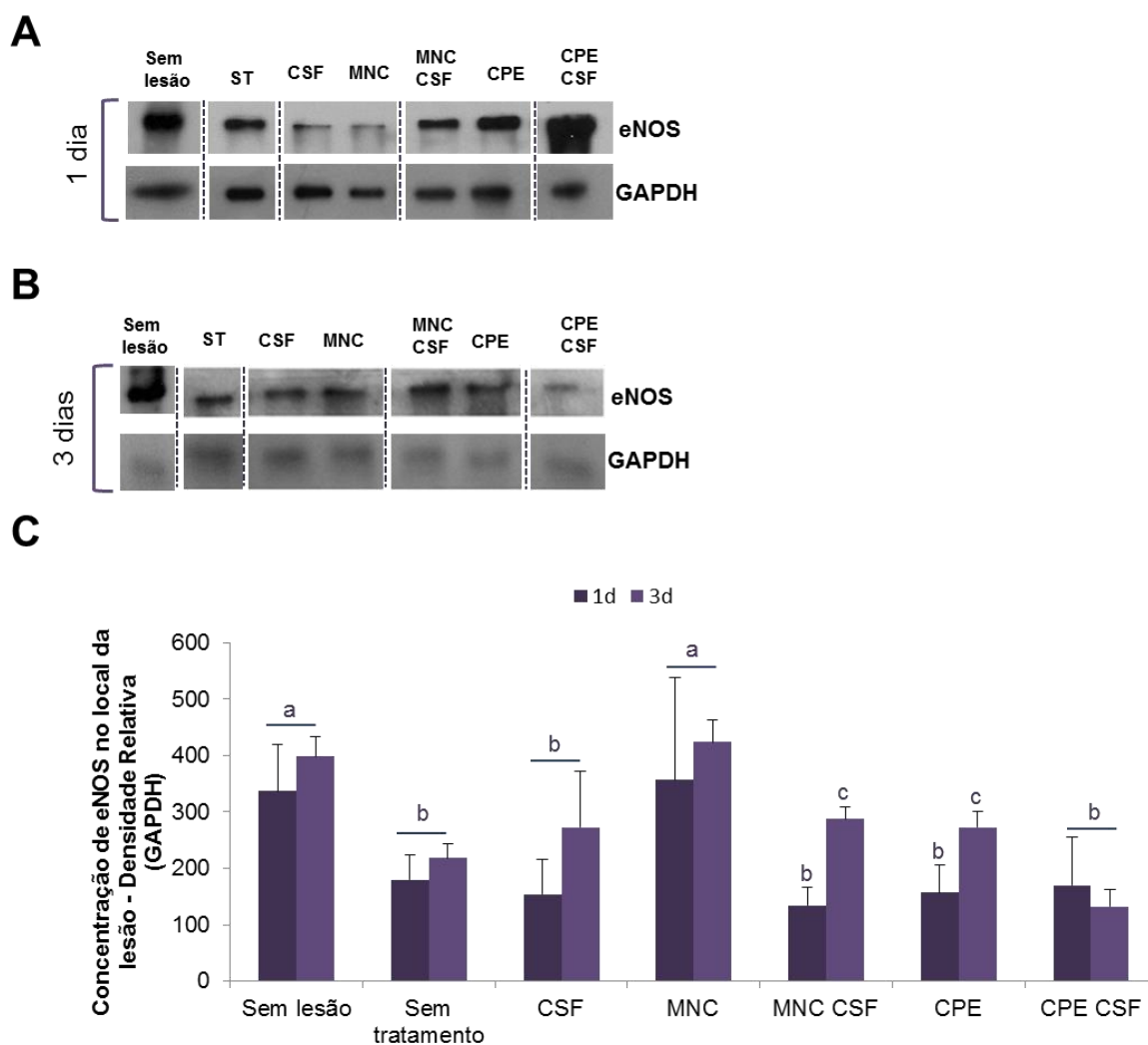


Figura 36. Quantificação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em camundongos C57BL6. A determinação da expressão de eNOS no local da lesão foi realizada por western blotting, as bandas analisadas no software ImageJ e normalizadas com o controle interno (GAPDH). (A) Expressão de eNOS 1 dia após a lesão. (B) expressão de eNOS 3 dias após a lesão. (C) Quantificação da intensidade das bandas. Colunas no gráfico representam média da diferença relativa em relação ao grupo sem tratamento. Letras diferentes demonstram significância estatística.

5. Perfil lipídico e glicose do plasma de camundongos ApoE^{-/-}.

Os níveis de colesterol total e triglicerídeos foram analisados no plasma de camundongos ApoE^{-/-} após 6 semanas de alimentação rica em gordura; a taxa de glicose foi dosada em 4 momentos no sangue desses animais: no início da alimentação, 2, 4 e 6 semanas após o início da dieta.

O nível de colesterol total nos animais ApoE^{-/-} foi 183% maior que nos animais C57BL6 (356,55 vs. 125,96 mg/dl plasma, $p < 0,05$) (Figura 37A). O nível de triglicerídeo aumentou 82% quando comparado com camundongos C57BL6 (97,58 vs. 53,36 mg/dl plasma, $p < 0,05$) (Figura 37B).

A taxa de glicose no sangue foi analisada ao longo do tempo, onde observamos um aumento nesse valor após 2 semanas de alimentação (178,8 mg/dl sangue), sendo que os tempos de 4 e 6 semanas de alimentação não diferiram em relação ao início da alimentação (Figura 37C).

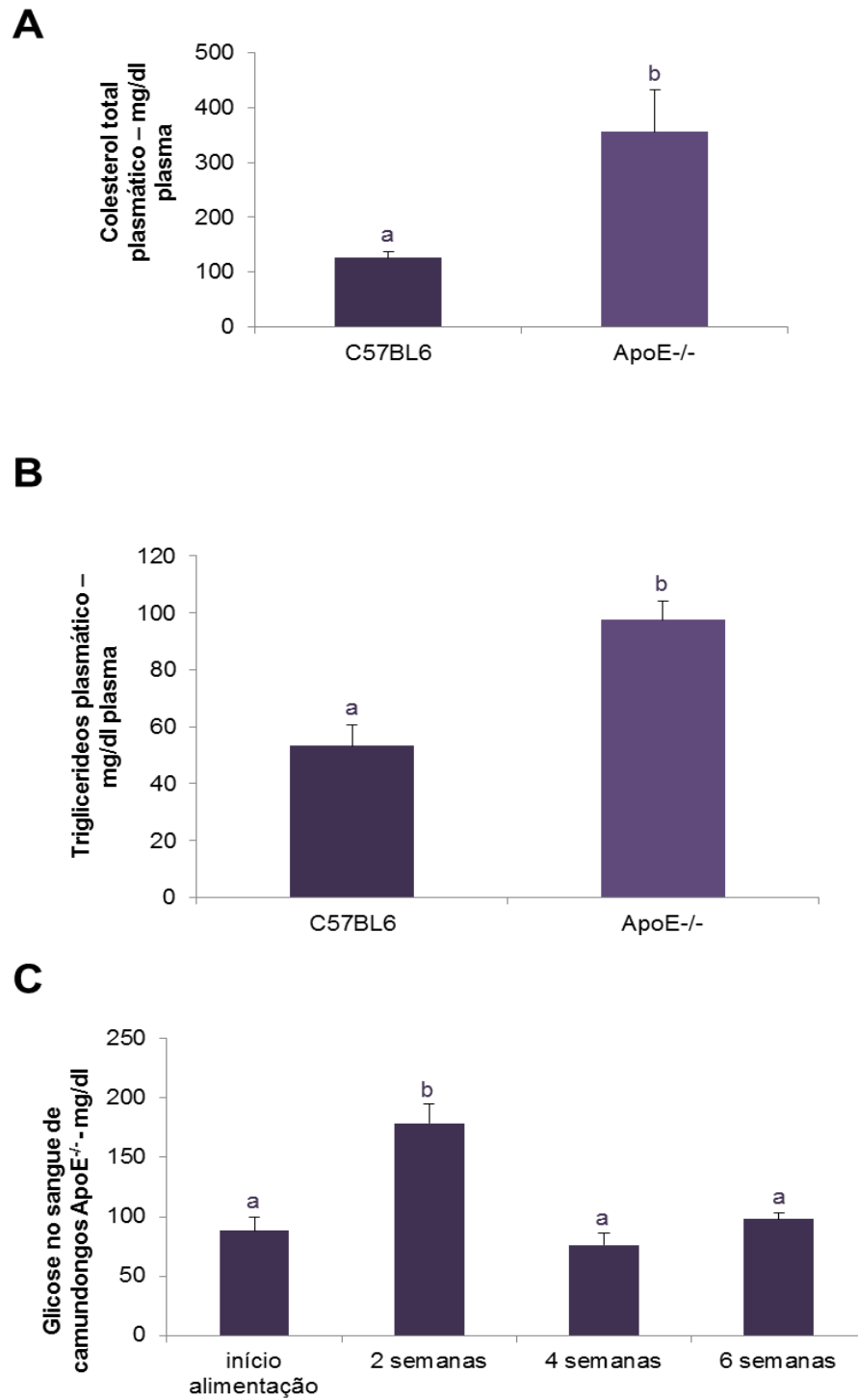


Figura 37. Perfil lipídico e taxa de glicose em camundongos C57BL6 e ApoE^{-/-}. Os níveis de colesterol e triglicerídeos foram quantificados no plasma de camundongos C57BL6 e ApoE^{-/-}. A taxa de glicose foi dosada no sangue de camundongos ApoE^{-/-} ao

longo de 6 semanas de alimentação rica em gordura. (A) Níveis de colesterol total. (B) níveis de triglicerídeos. (C) Taxa de glicose.

6. Aterosclerose inibe a migração de células para o local da lesão e diminui a eficácia do tratamento com DS em camundongos ApoE^{-/-}.

a. Formação de trombo utilizando terapia celular na presença ou ausência de DS.

No primeiro dia após a lesão arterial, observamos que o tratamento com DS foi capaz de diminuir a formação de trombo em aproximadamente 81% em relação ao grupo sem tratamento (933,66 vs. 4932,33 μm^2 , $p < 0,05$) (Figura 38A e B e Figura 39A). Essa diminuição no tamanho da área de trombo também foi observado nos animais tratados com MNC DS; tal diminuição foi de 52% (2329 vs. 4932,33 μm^2 , $p < 0,05$) (Figura 38A e D e Figura 39A).

No terceiro dia após a cirurgia arterial, animais tratados com DS apresentaram uma diminuição na formação de trombo na magnitude de 82% em relação ao grupo sem tratamento (2084 vs. 12179,5 μm^2 , $p < 0,05$) (Figura 38G e H Figura 39A). Essa diminuição também foi observada nos grupos tratados com MNC – 66% (4044,33 vs. 12179,5 μm^2 , $p < 0,05$) (Figura 38G e I e Figura 39A) e MNC DS – 28% (8723,73 vs. 12179,5 μm^2 , $p < 0,05$) (Figura 38G e J e Figura 39A).

A área da camada média está diminuída no primeiro dia após a lesão arterial em animais que receberam MNC DS – 23% (4617 vs. 6015,33 μm^2 , $p < 0,05$), CPE – 35% (3915,66 vs. 6015,33 μm^2 , $p < 0,05$) e CPE DS – 36% (3848,33 vs. 6015,33 μm^2 , $p < 0,05$) (Figura 39B). No terceiro dia após a cirurgia, tratamentos utilizando DS, MNC ou MNC DS apresentaram diminuição nessa área em aproximadamente, 38%, 37% e 42%, respectivamente (4935,66 ou 4967,66 ou 4627,33 vs. 6015,33 μm^2 , $p < 0,05$) (Figura 39B).

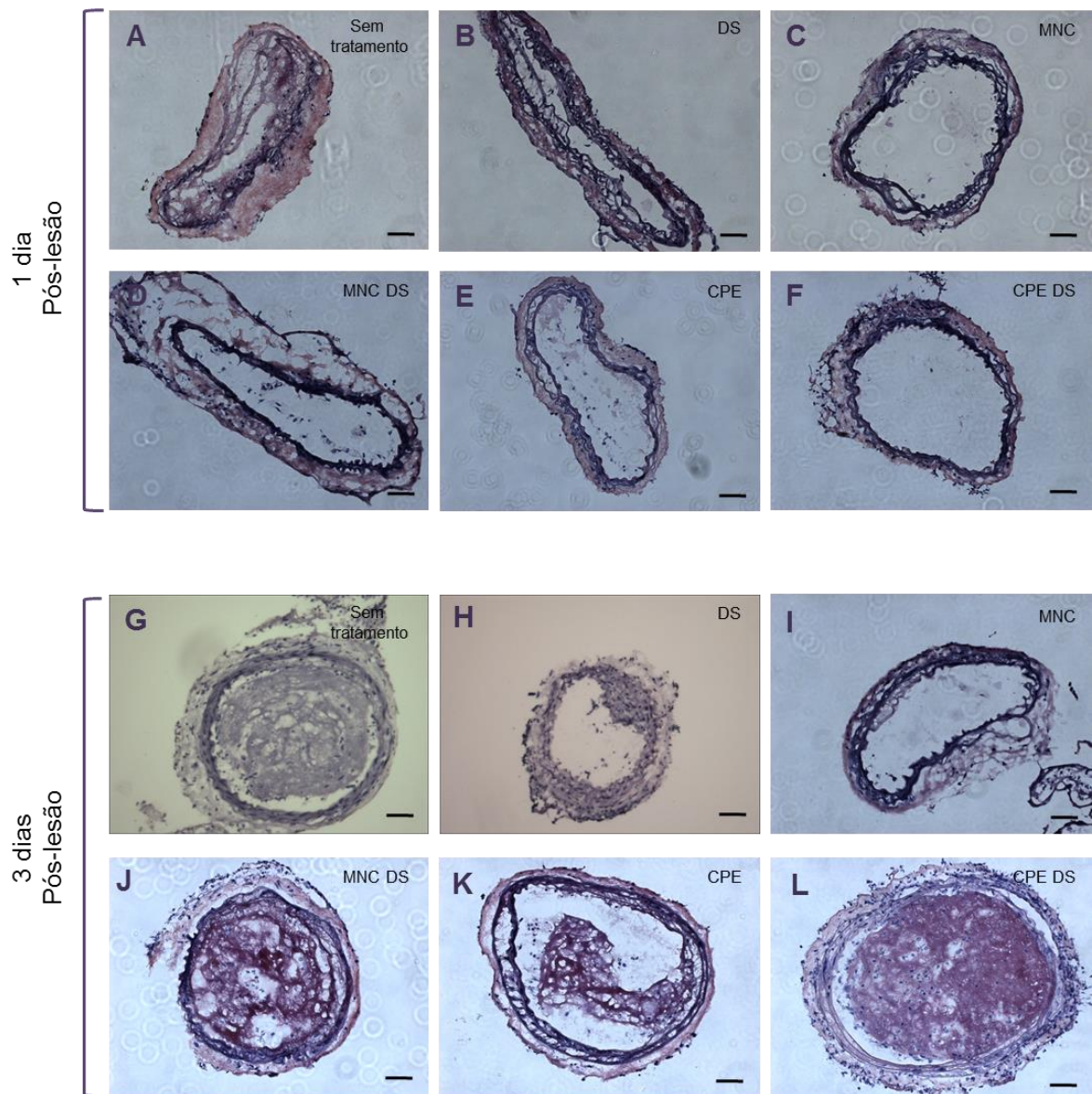


Figura 38. Artérias carótidas comuns de camundongos ApoE^{-/-} 1 e 3 dias após injúria arterial. Cortes corados com Hematoxilina-Eosina. Vinte cortes de cada artéria foram analisados e o corte com maior formação de trombo foi selecionado. (A – F) Artérias de camundongos 1 dia após a lesão arterial. Artérias de camundongos 3 dias após a lesão arterial. (A e G) artéria do grupo lesionado – sem tratamento; (B e H) artéria do grupo tratado com DS; (C e I) artéria do grupo tratado com MNC (D e J) artéria do grupo tratado

com MNC DS; (E e K) artéria do grupo tratado com CPE; (F e L) artéria do grupo tratado com CPE DS. Barra = 50 μm .

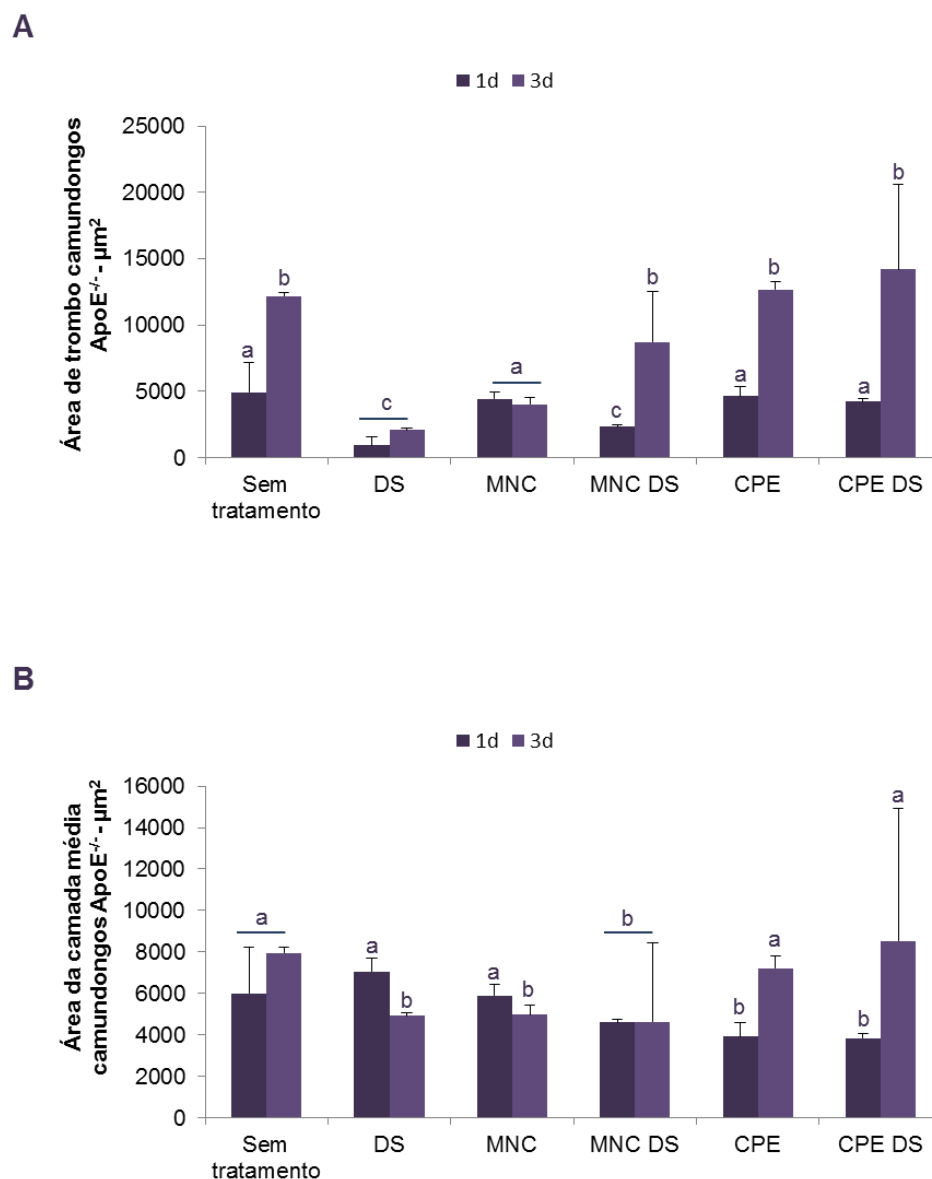


Figura 39. Área de trombo e camada média. (A) A área de trombo (μm^2) foi quantificada como descrito em Materiais e Métodos. (B) Área da média (μm^2) quantificada como descrito em Materiais e Métodos. As colunas representam os valores médios para cada grupo + desvio padrão; n=3 para cada grupo. Letras diferentes demonstram significância estatística.

b. Atividade de Gelatinases nas artérias carótidas através da técnica de zimografia ‘in situ’.

A atividade de gelatinase ‘in situ’ através do uso da DQ gelatina, a emite uma fluorescência verde quando é degradada por enzimas existentes no tecido. Como a lâmina elástica apresenta uma autofluorescência característica, subtraímos a fluorescência relativa a lâmina elástica do valor encontrado nas artérias incubadas com DQ gelatina. As Figuras 40M e 40N representam artérias não incubadas com o substrato.

Todos os tratamentos diminuíram a atividade de gelatinase ‘in situ’ tanto no dia 1 (exceto o tratamento com CPE DS) como no dia 3 após a lesão arterial. A terapia com DS diminuiu a atividade enzimática em 39% e 74%, respectivamente, 1 e 3 dias após a lesão (234,2 vs. 387,27 ou 425,95 vs. 1679,61 densidade integrada, $p<0,05$) (Figura 40A e B e 40G e H e Figura 41). O uso de MNC apresentou uma diminuição de 54% no primeiro dia (177,23 vs. 387,27 densidade integrada, $p<0,05$) e 91% no terceiro (143,66 vs. 1679,61 densidade integrada, $p<0,05$) (Figura 40C e 40I e Figura 41).

Houve uma diminuição de 67% (125,77 vs. 387,27 densidade integrada, $p<0,05$) e 34% (1104,77 vs. 1679,61 densidade integrada, $p<0,05$), respectivamente, nos dias 1 e 3 após a lesão arterial em animais que receberam MNC DS (Figura 40D e 40J e Figura 41). A terapia com CPE apresentou uma diminuição de 93% (26,51 vs. 387,37 densidade integrada, $p<0,05$) no primeiro dia e de 71% (474,18 vs. 1679,61 densidade integrada, $p<0,05$) no terceiro dia após a intervenção cirúrgica (Figura 40E e 40K e Figura 41).

O uso de CPE DS provocou um aumento de 20% na atividade de gelatinase no primeiro dia (466,53 vs. 387,37 densidade integrada, $p<0,05$) mas no terceiro dia esse tratamento apresentou uma queda de 71% na atividade enzimática (483,94 vs. 1679,61 densidade integrada, $p<0,05$) (Figura 40F e 40L e Figura 41).

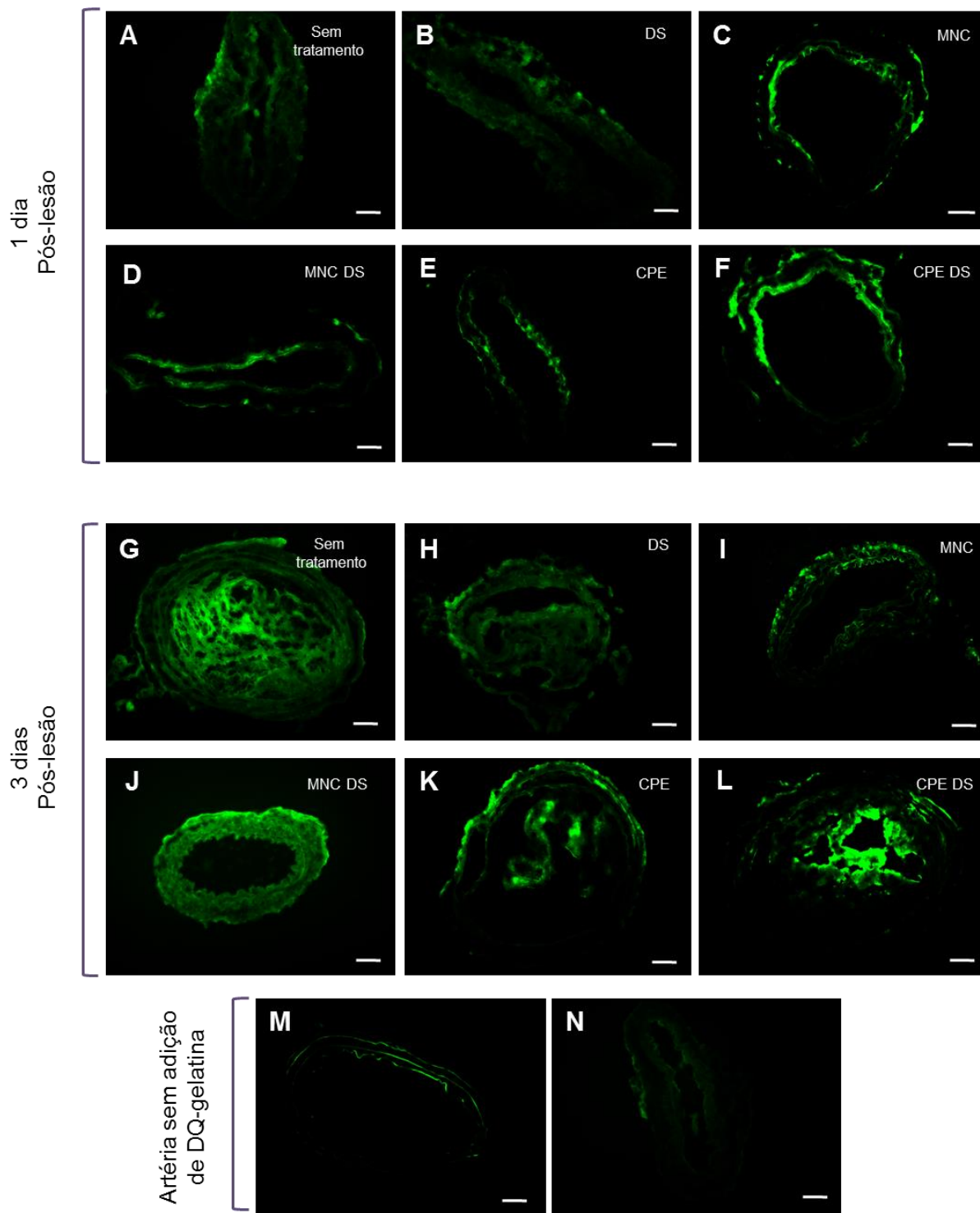


Figura 40. Zimografia *in situ* das artérias carótidas de camundongos ApoE^{-/-} 1 dia após a lesão arterial. A zimografia foi realizada com o uso de DQ-gelatin conjugada com fluoresceína (FITC) (Invitrogen); a expressão foi analisada subtraindo-se a auto-

fluorescência do tecido da fluorescência presente nas lâminas submetidas à técnica. (A – F) Artérias de camundongos 1 dia após a lesão. Artérias de camundongos 3 dias após a lesão. (A e G) artéria do grupo sem tratamento; (B e H) artéria do grupo tratado com DS; (C e I) artéria do grupo tratado com MNC; (D e J) artéria do grupo tratado com MNC DS; (E e K) artéria do grupo tratado com CPE; (F e L) artéria do grupo tratado com CPE DS; (M e N) Artéria carótida lesionada – autofluorescência do tecido. Barra = 50 μ m.

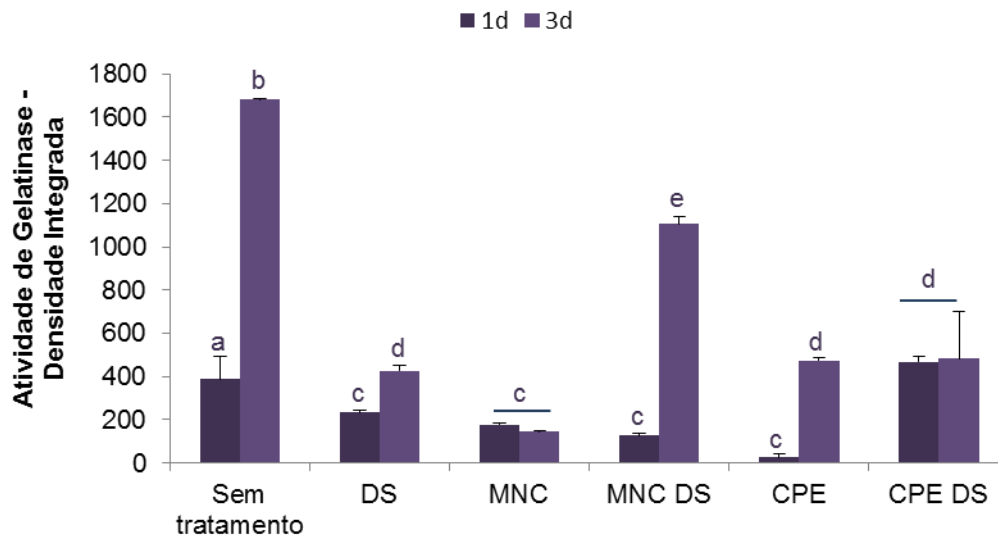


Figura 41. Técnica de Zimografia *in situ* para a detecção de atividade de gelatinases – análise de densidade integrada no software ImageJ. Camundongos ApoE^{-/-} submetidos à injúria arterial foram sacrificados e a artéria carótida esquerda removida. Letras diferenças demonstram diferença estatística.

c. Ação do DS na migração de MNC ou CPE para o local da lesão em camundongos ApoE^{-/-}.

Os camundongos ApoE^{-/-} após dieta rica em gordura apresentam taxas mais elevadas de colesterol e triglicerídeos bem como uma provável resistência à insulina; isso pode estar diretamente relacionado à uma menor taxa de migração de células para o local da lesão.

Houve uma maior migração de células, tanto as MNC (22 células) como as CPE (40 células), para o local da lesão no terceiro dia após a lesão sem a presença de DS (Figura 42D-F e Figura 43D-F e Figura 44).

O DS por reter lipoproteínas nas artérias, pode estar envolvido numa adesão deficiente ao local de lesão. Além disso, inúmeras partículas no interior do lúmen vascular (Figura 43D-F) são possivelmente microvesículas, as quais se originam das próprias células.

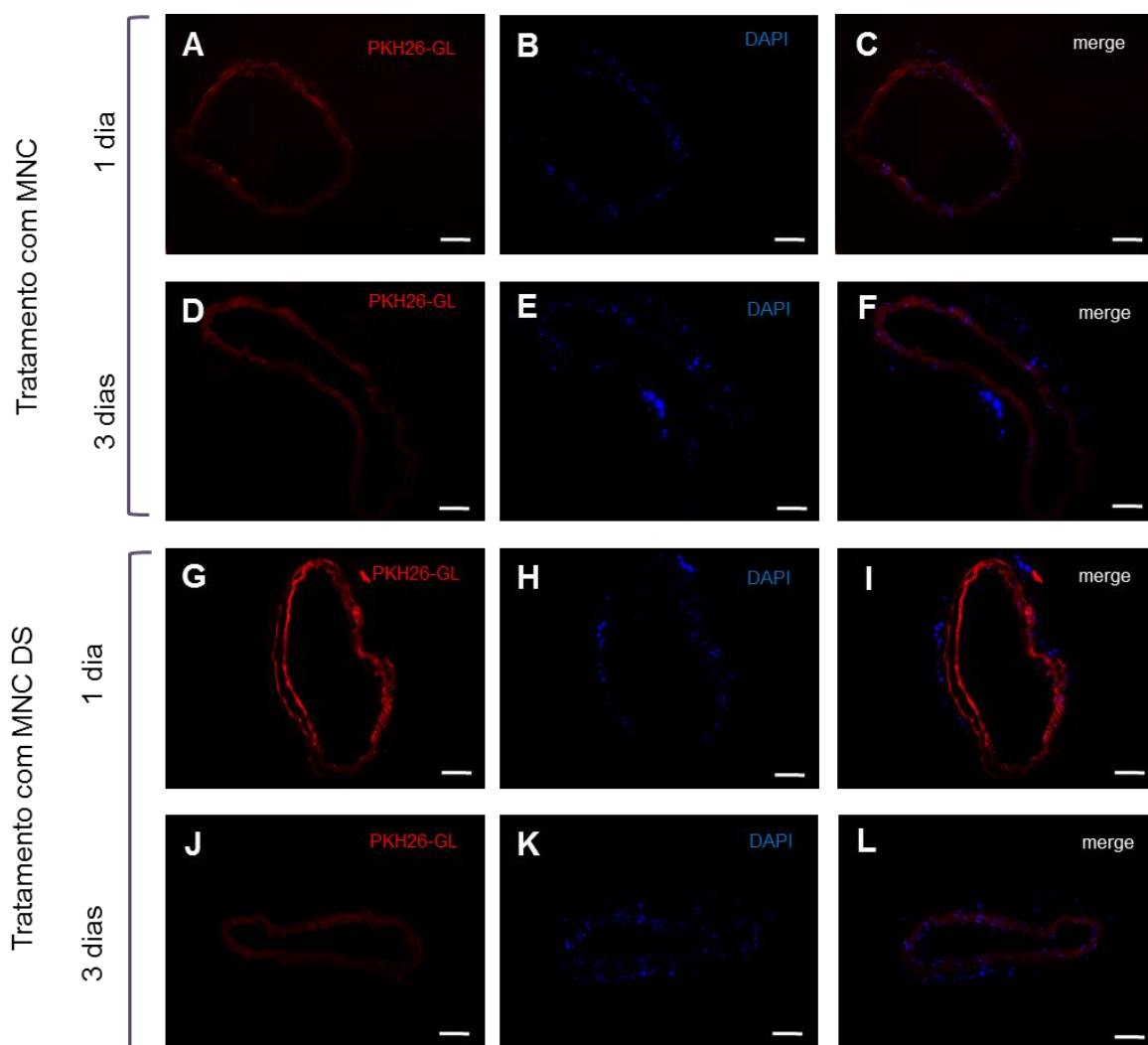


Figura 42. Migração de MNC na presença ou ausência de DS. As MNC foram marcadas com PKH26-GL e injetadas com ou sem DS. (A) artéria carótida de camundongos 1 dia

após a lesão injetados com MNC; (B) DAPI; (C) sobreposição das Figuras A e B; (D) artéria carótida de camundongos 3 dias após a lesão injetados com MNC; (E) DAPI; (F) sobreposição das Figuras D e E; (G) artéria carótida de camundongos 1 dia após a lesão injetados com MNC e DS; (H) DAPI; (I) sobreposição das Figuras G e H; (J) artéria carótida de camundongos 3 dias após a lesão injetados com MNC e DS; (K) DAPI; (L) sobreposição das Figuras J e K. Barra = 50 μ m.

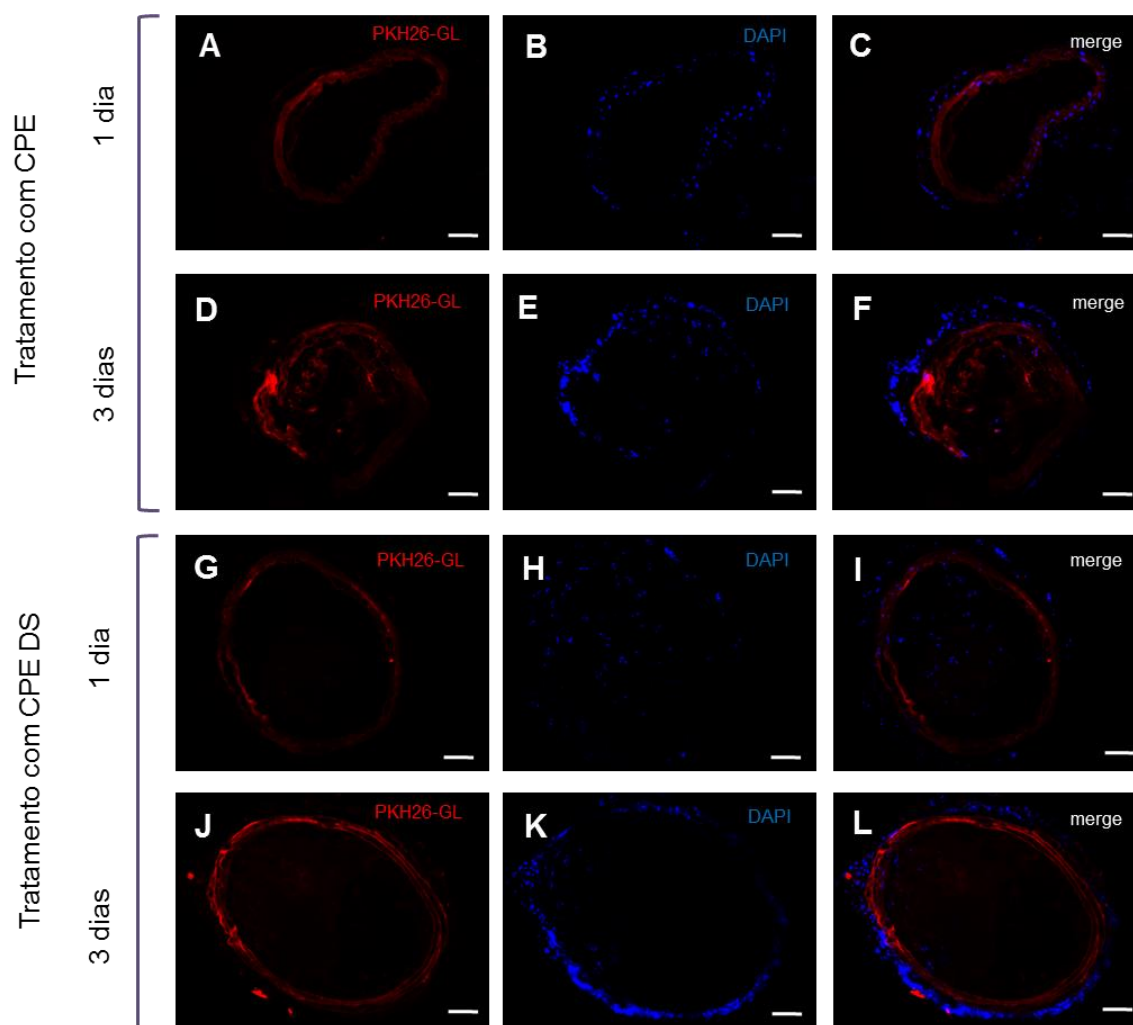


Figura 43. Migração de CPE na presença ou ausência de DS. As CPE foram marcadas com PKH26-GL e injetadas com ou sem DS. (A) artéria carótida de camundongos 1 dia após a lesão injetados com CPE; (B) DAPI; (C) sobreposição das Figuras A e B; (D) artéria carótida de camundongos 3 dias após a lesão injetados com CPE; (E) DAPI; (F)

sobreposição das Figuras D e E; (G) artéria carótida de camundongos 1 dia após a lesão injetados com CPE e DS; (H) DAPI; (I) sobreposição das Figuras G e H; (J) artéria carótida de camundongos 3 dias após a lesão injetados com CPE e DS; (K) DAPI; (L) sobreposição das Figuras J e K. Barra = 50 μ m.

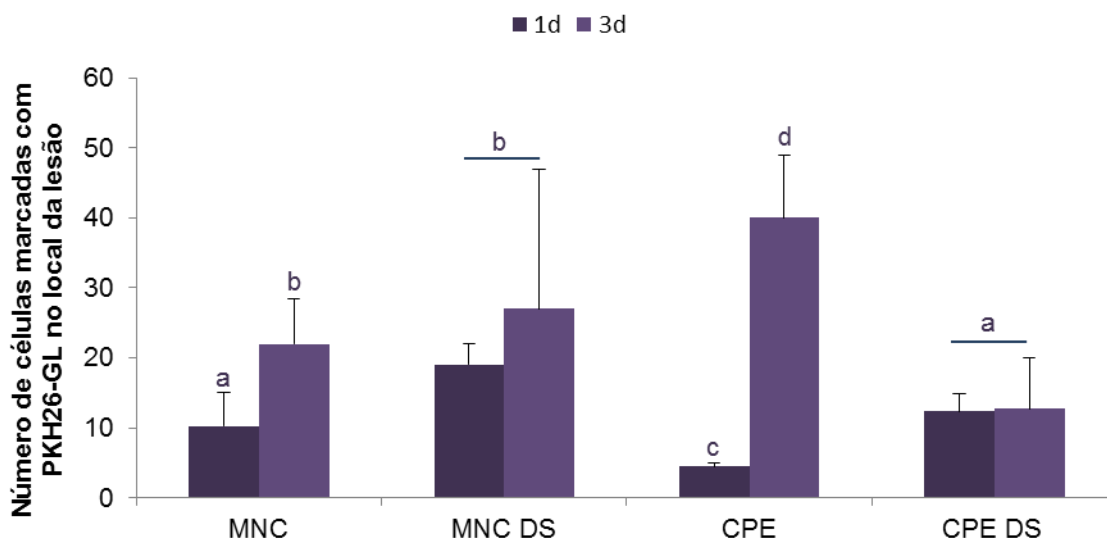


Figura 44. Migração das MNC ou CPE na presença ou ausência de GAGs. As CPE marcadas com PKH26-GL e injetadas na presença ou ausência de DS 1 e 3 dias após a lesão arterial, foram quantificadas utilizando o software ImageJ. Letras diferentes demonstram significância estatística.

d. Fator transformante de crescimento beta (TGF- β).

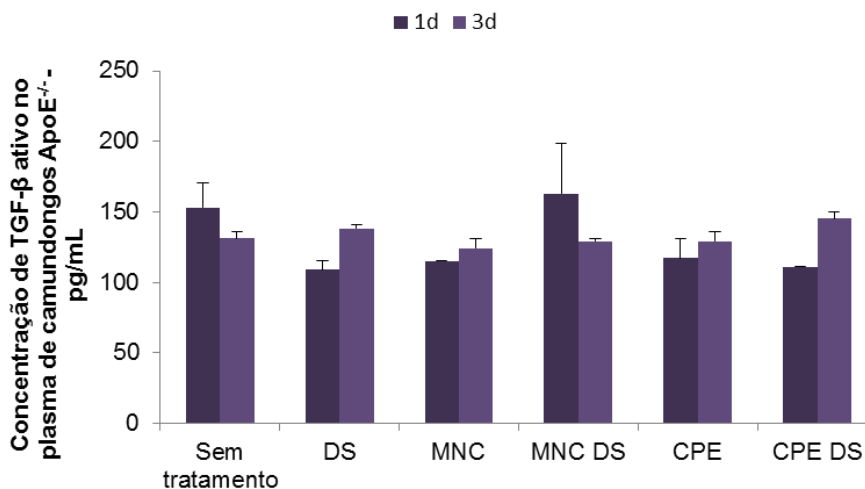
O TGF- β ativo e total foram quantificados no plasma de camundongos ApoE^{-/-}. Os tratamentos analisados foram os mesmos utilizados para os camundongos C57BL6.

O TGF- β ativo não diferiu entre os grupos analisados tanto no dia 1 como no dia 2 (Figura 45A).

No primeiro dia após a lesão arterial, tratamentos utilizando DS ou MNC DS foram capazes em aumentar a quantidade de TGF- β total; tal aumento foi de aproximadamente 72% quando utilizado DS (2685,241 vs. 1557,122 pg/mL, p<0,05) (Figura 45B) e cerca de

55% quando tratados com MNC DS (2415,128 241 vs. 1557,122 pg/mL, $p < 0,05$) (Figura 45B).

A



B

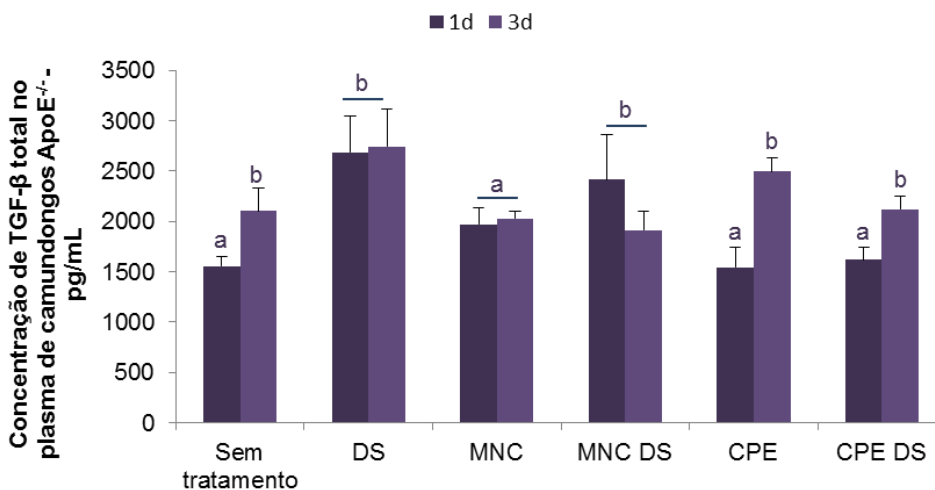


Figura 45. Quantificação do Fator de Transformação do Crescimento β (TGFβ) no plasma de camundongos ApoE^{-/-}. A determinação dos níveis de TGFβ foram dosados no plasma de camundongos ApoE^{-/-}. Letras diferentes demonstram significância estatística.

e. Citocinas pró-inflamatória (TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10).

O tratamento utilizando DS apresentou um aumento nos níveis de TNF- α tanto no dia 1 – 99% (127,98 vs. 64,18 pg/mL, $p < 0,05$) como no dia 3 – 253% (195,68 vs. 55,38 pg/mL, $p < 0,05$) após a lesão arterial (Figura 46A). A administração de CPE DS também ocasionou o aumento de aproximadamente 91% na quantidade dessa molécula no plasma desses animais (122,58 vs. 64,18 pg/mL, $p < 0,05$) 1 dia após a intervenção cirúrgica. Os demais tratamentos não apresentaram diferença estatística significativa entre si (Figura 46A).

Nos camundongos ApoE^{-/-} que receberam injeções de CPE houve uma maior liberação de IL-10 no plasma 1 dia após a intervenção cirúrgica quando comparados com os animais que não receberam tratamento; tal aumento foi em torno 53% (1494,40 vs. 975,89 pg/mL, $p < 0,05$) (Figura 46B). Os demais grupos não diferiram entre si nos tempos analisados.

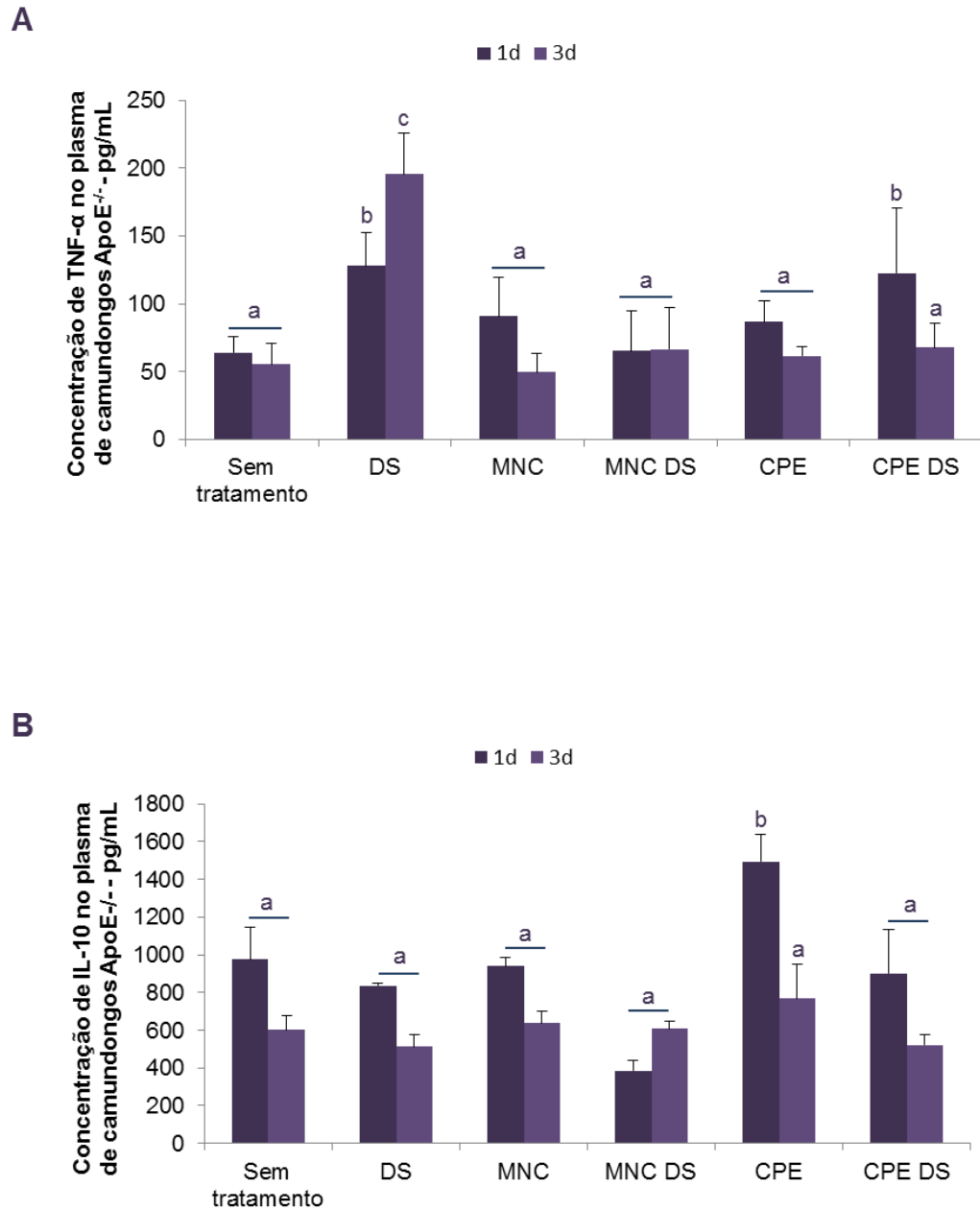


Figura 46. Quantificação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10) no plasma de camundongos ApoE^{-/-}. A determinação dos níveis de TNF- α e IL-10 foram dosados no plasma de camundongos ApoE^{-/-}. (A) Níveis de TNF- α no plasma (pg/mL). (B) Níveis de IL-10 no plasma (pg/mL). Letras diferentes representam significância estatística.

f. Fator derivado de estroma 1 (SDF-1)

A administração de DS aos animais ApoE^{-/-} provocou a liberação de uma maior quantidade de SDF-1 no plasma no primeiro dia após a lesão quando comparado com o grupo sem tratamento (1039,44 vs. 407,87 pg/mL, $p < 0,05$) (Figura 47D). Entretanto, tal liberação sistêmica não ocasionou uma maior quantidade dessa molécula no local da lesão, onde o DS diminuiu sua expressão em 23% ou 53% vezes, respectivamente, nos dias 1 e 3 após a lesão (Figura 47A, B e C). Os demais tratamentos não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo lesionado tanto no dia 1 como no dia 3 após a lesão arterial nos níveis de SDF-1 circulante.

Alguns tratamentos causaram um aumento de SDF-1 no local da lesão; a terapia com MNC DS, CPE ou CPE DS ocasionou um aumento dessa molécula em relação ao grupo sem tratamento (39% ou 116% ou 145%, respectivamente) no primeiro dia após a lesão arterial (Figura 47A e 47C). No terceiro dia após a intervenção cirúrgica, quase todos os tratamentos (exceto MNC) apresentaram expressão menor de SDF-1 em relação ao grupo lesionado (53% ou 54% ou 54% ou 43%, respectivamente DS, MNC DS, CPE ou CPE DS) (Figura 47B e 47C).

O fato da expressão de SDF-1 diminuir ao longo do tempo pode demonstrar uma capacidade diminuída em mobilizar e aderir as células-tronco provenientes da medula óssea; tal efeito pode estar relacionado a dieta rica em gorduras administrada a esses animais. Além disso, o SDF-1 é rapidamente degradado por proteases, tendo uma meia vida curta em circulação (Zaruba, 2009). Os níveis de SDF-1 aumentam após o infarto do miocárdio e diminuem significativamente em até 5 dias este evento (Ziegler, et al 2012).

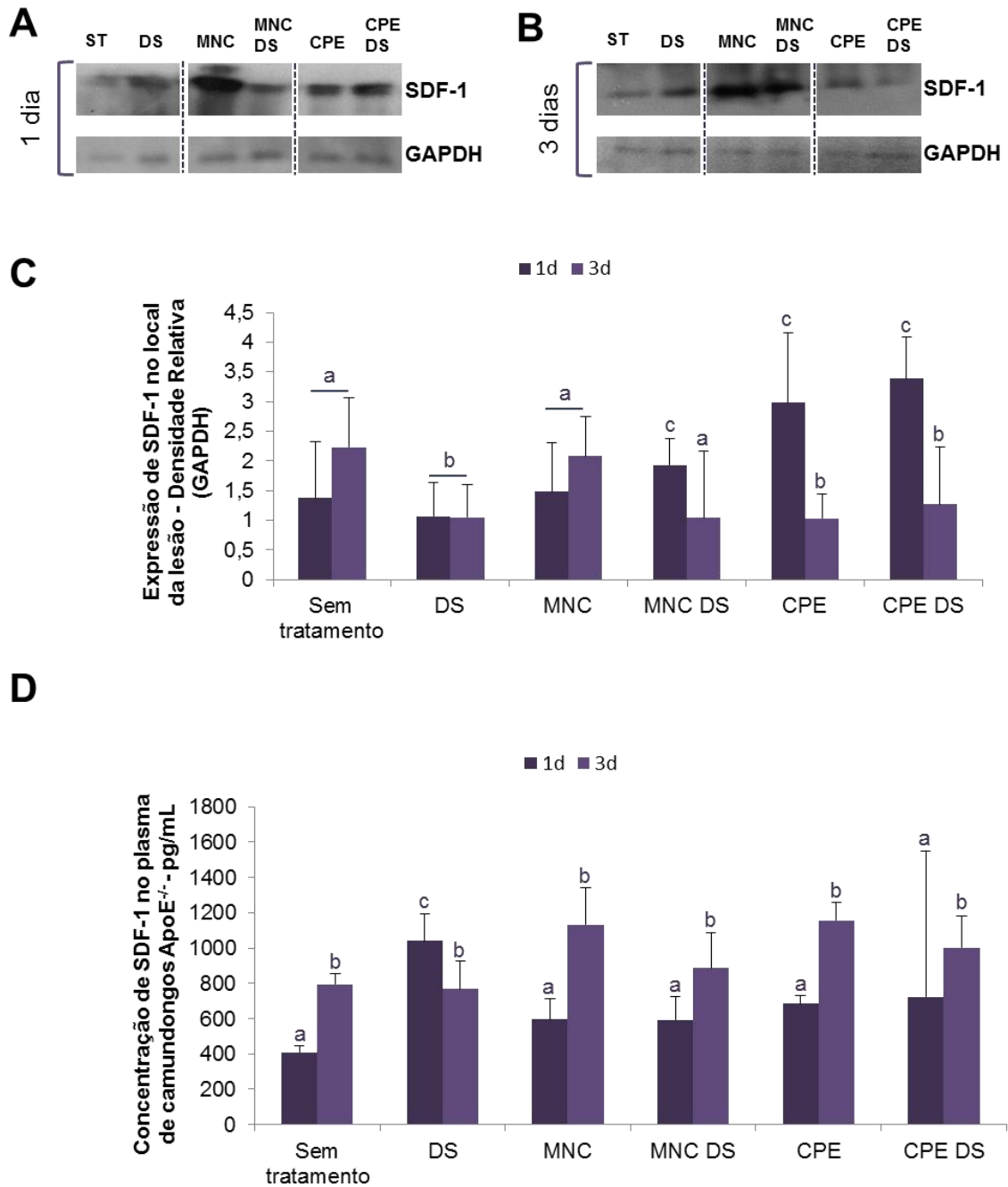


Figura 47. Quantificação do fator derivado de estroma 1 (SDF-1) em camundongos *ApoE*^{-/-}. (A) expressão de SDF-1 no local da lesão 1 dia após a cirurgia. (B) expressão de SDF-1 no local da lesão 3 dias após a cirurgia. (C) Quantificação da intensidade das bandas analisadas no software ImageJ e normalizadas com o controle interno (GAPDH). (D)

Níveis de SDF-1 no plasma de camundongos ApoE^{-/-}. Letras diferentes demonstram significância estatística.

g. Moléculas de adesão

No primeiro dia após a lesão arterial, os camundongos ApoE^{-/-} tratados com MNC apresentaram um aumento na expressão de P-selectina (22%) em relação ao grupo sem tratamento (Figura 48A e 48C). Os demais grupos tiveram a expressão dessa molécula diminuída no dia 1 (52% ou 49% ou 52% ou 57%, respectivamente, DS ou MNC DS ou CPE ou CPE DS) (Figura 48A e 48C). No entanto, 3 dias após a cirurgia, todos os grupos aumentaram a expressão dessa molécula em relação ao grupo sem tratamento (246% ou 1878% ou 422% ou 617% ou 738%, respectivamente, DS ou MNC ou MNC DS ou CPE ou CPE DS) (Figura 48B e 48C). O aumento bastante elevado na expressão de P-selectina quando do uso principalmente de MNC pode estar relacionado com o caráter inflamatório dessas células, as quais quando em um ambiente inflamatório, devido ao aumento dos níveis de colesterol e triglicerídeos advindos da dieta rica em gorduras, podem influenciar no aumento da inflamação.

A molécula de adesão, ICAM-1, responsável por uma adesão mais firme à parede vascular se apresenta aumentada em quase todos os grupos analisados em relação ao grupo sem tratamento (296% ou 10% ou 82%, respectivamente, MNC ou MNC DS ou CPE) no dia primeiro dia após a lesão arterial (Figura 48D e 48F). No terceiro dia, tratamentos com DS (23%) ou MNC (150%) ou MNC DS (80%) aumentaram a expressão de ICAM-1 (Figura 48E e 48F); os tratamentos que utilizaram MNC apresentaram os maiores aumentos e provavelmente se relaciona ao caráter inflamatório dessas células. As terapias com CPE (76%) ou CPE DS (35%) diminuíram a expressão dessa molécula em relação ao grupo sem tratamento (Figura 48E e 48F).

O uso de CPE mostrou um aumento de P-selectina nos dois momentos analisados, já a molécula de ICAM-1 teve sua expressão diminuída ao longo do tempo; tal efeito pode ser causado por um caráter adesivo das CPE (P-selectina) mas a transmigração (ICAM-1) dessas células para o espaço subendotelial se mostra pouco eficiente.

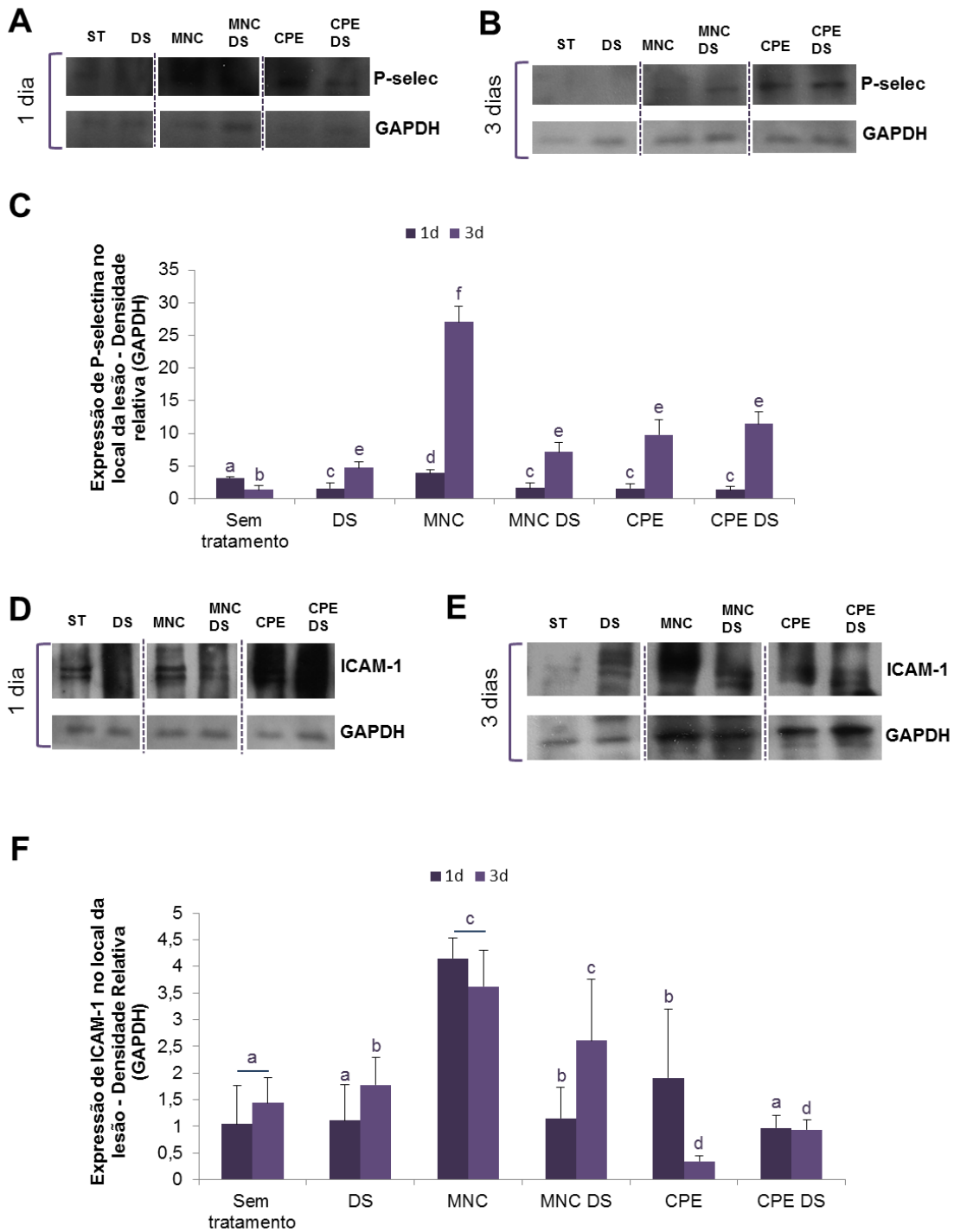


Figura 48. Quantificação das moléculas de adesão, P-selectina e ICAM-1, em camundongos ApoE^{-/-}. A determinação da expressão de P-selectina no local da lesão foi realizada por western blotting, as bandas analisadas no software ImageJ e normalizadas

com o controle interno (GAPDH) (A) expressão de P-selectina 1 dia após a lesão; (B) expressão de P-selectina 3 dias após a lesão; (C) Quantificação da intensidade das bandas por ImageJ; (D) expressão de ICAM-1 1 dia após a cirurgia; (E) expressão de ICAM-1 3 dias após a lesão; (F) Quantificação da intensidade das bandas por ImageJ. Colunas no gráfico representam média da diferença relativa em relação ao grupo sem tratamento. Letras diferentes demonstram significância estatística.

h. eNOS

A lesão arterial provocou uma diminuição da expressão de eNOS tanto no dia 1 (30%) como no dia 3 (63%) (Figura 49A, B e C). Tratamentos que resgatem a expressão perdida durante o procedimento cirúrgico são de grande interesse no campo das doenças cardiovasculares. Entre esses tratamentos, no nosso modelo de lesão arterial, se destacam a administração de DS (76% - dia 3), o uso de MNC (39% - dia 1), a terapia com MNC DS aumentou essa expressão nos dois momentos analisados (17% e 31%, respectivamente, dia 1 e 3) e o uso conjunto de CPE DS (27% - dia 3) (Figura 49A, B e C).

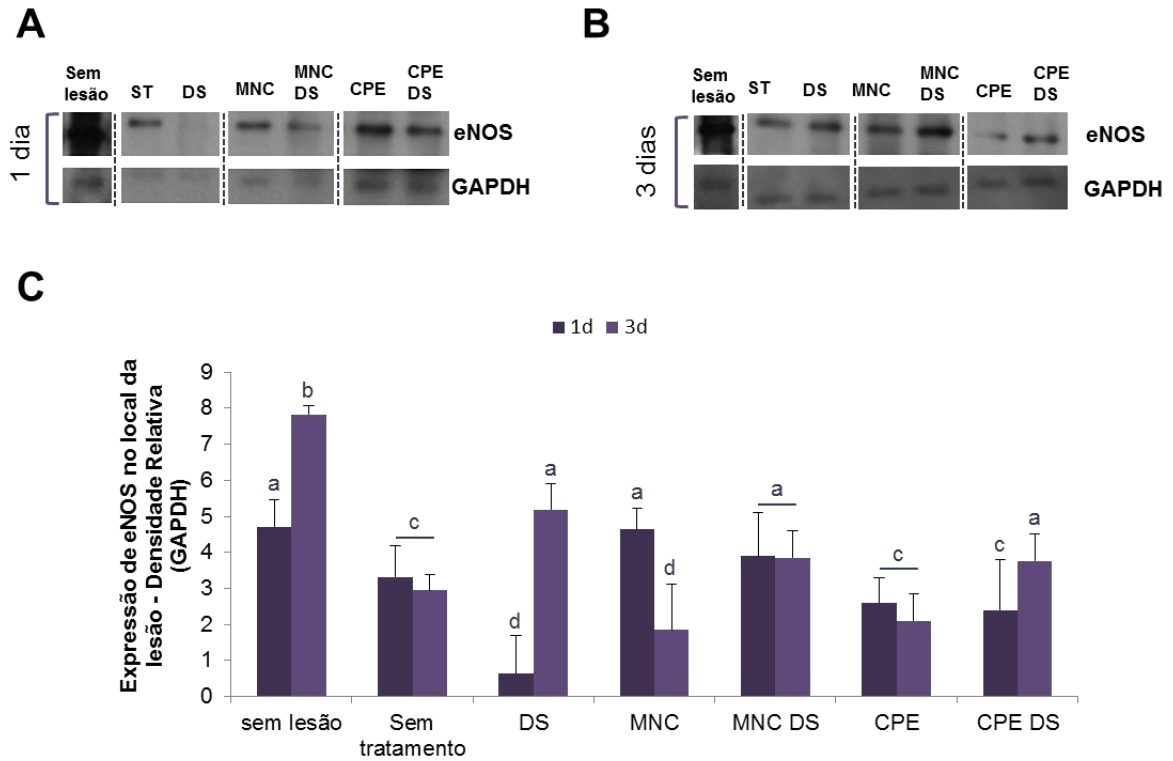


Figura 49. Quantificação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em camundongos ApoE^{-/-}. A determinação da expressão de eNOS no local da lesão foi realizada por western blotting, as bandas analisadas no software ImageJ e normalizadas com o controle interno (GAPDH). (A) Expressão de eNOS 1 dia após a lesão. (B) expressão de eNOS 3 dias após a lesão. (C) Quantificação da intensidade das bandas. Colunas no gráfico representam média da diferença relativa em relação ao grupo sem tratamento. Letras diferentes demonstram significância estatística.

7. Influência do CSF na migração de células para o local da lesão e sua ação na formação de trombo após lesão arterial em camundongos ApoE^{-/-}.

a. Ação de CSF na formação de trombo.

No primeiro dia após a lesão arterial, observamos que o tratamento com CSF provocou aumento na formação de trombo em aproximadamente 47% em relação ao grupo sem tratamento (7266 vs. 4932,33 μm^2 , $p < 0,05$) (Figura 50A e B e Figura 51A). Esse

aumento é revertido no terceiro dia após a cirurgia, onde observa-se uma diminuição de 25% na formação de trombo (9214,33 vs. 12179,5 μm^2 , $p<0,05$) (Figura 50G e H e Figura 51A).

A terapia com MNC ocasionou uma diminuição de 67% na área de trombo no terceiro dia após a intervenção cirúrgica (Figura 50I e 51A). O uso de MNC CSF ocasionou uma diminuição no dia 1 (57%) (Figura 50D e 51A) mas houve um aumento no dia 3 (41%) (Figura 50J e 51A).

No primeiro dia após a cirurgia, tratamentos utilizando MNC CSF, CPE ou CPE DS apresentaram diminuição na área da camada média em aproximadamente, 32%, 35% e 35%, respectivamente (4064,66 ou 3915,66 ou 3914,33 vs. 6015,33 μm^2 , $p<0,05$) (Figura 51B). A área da camada média está diminuída no terceiro dia após a lesão arterial em animais que receberam CSF – 21% (6357,66 vs. 7959,66 μm^2 , $p<0,05$) e MNC – 38% (4967,66 vs. 7959,66 μm^2 , $p<0,05$) (Figura 51B). Alterações no tamanho da camada média podem estar relacionadas com hiperplasia ou hipertrofia das células musculares presentes nesta camada. Estas modificações podem indicar um aumento da produção de matriz extracelular e também um aumento do número, o que poderia estar relacionado com a restenose observada após a lesão arterial.

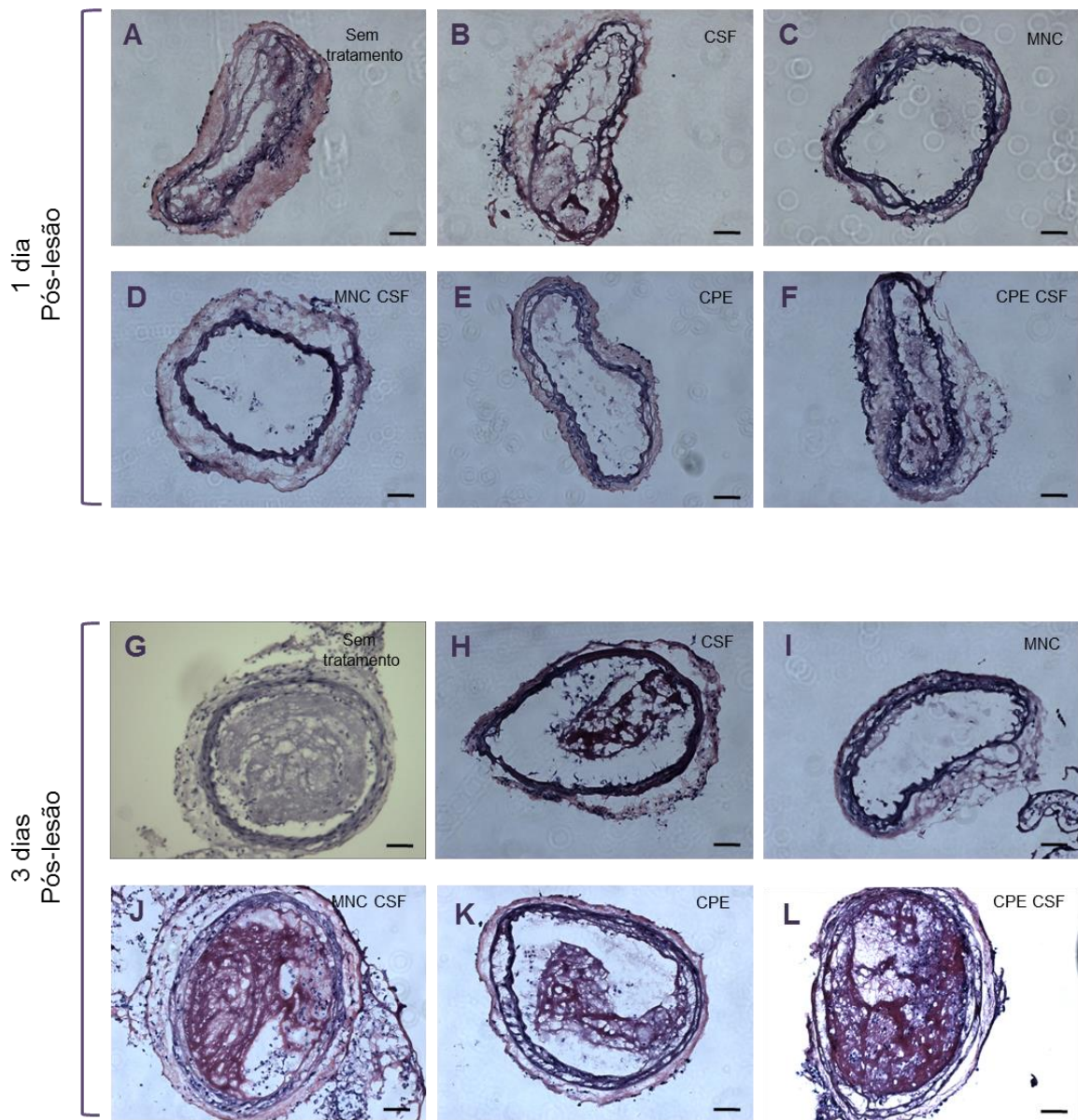


Figura 50. Artérias carótidas comuns de camundongos ApoE^{-/-} 1 e 3 dias após injúria arterial. Cortes corados com Hematoxilina-Eosina. Vinte cortes de cada artéria foram analisados e o corte com maior formação de trombo foi selecionado. (A – F) Artérias de camundongos 1 dia após a lesão arterial. Artérias de camundongos 3 dias após a lesão arterial. (A e G) artéria do grupo lesionado – sem tratamento; (B e H) artéria do grupo tratado com CSF; (C e I) artéria do grupo tratado com MNC (D e J) artéria do grupo tratado com MNC CSF; (E e K) artéria do grupo tratado com CPE; (F e L) artéria do grupo tratado com CPE CSF. Barra = 50 μ m.

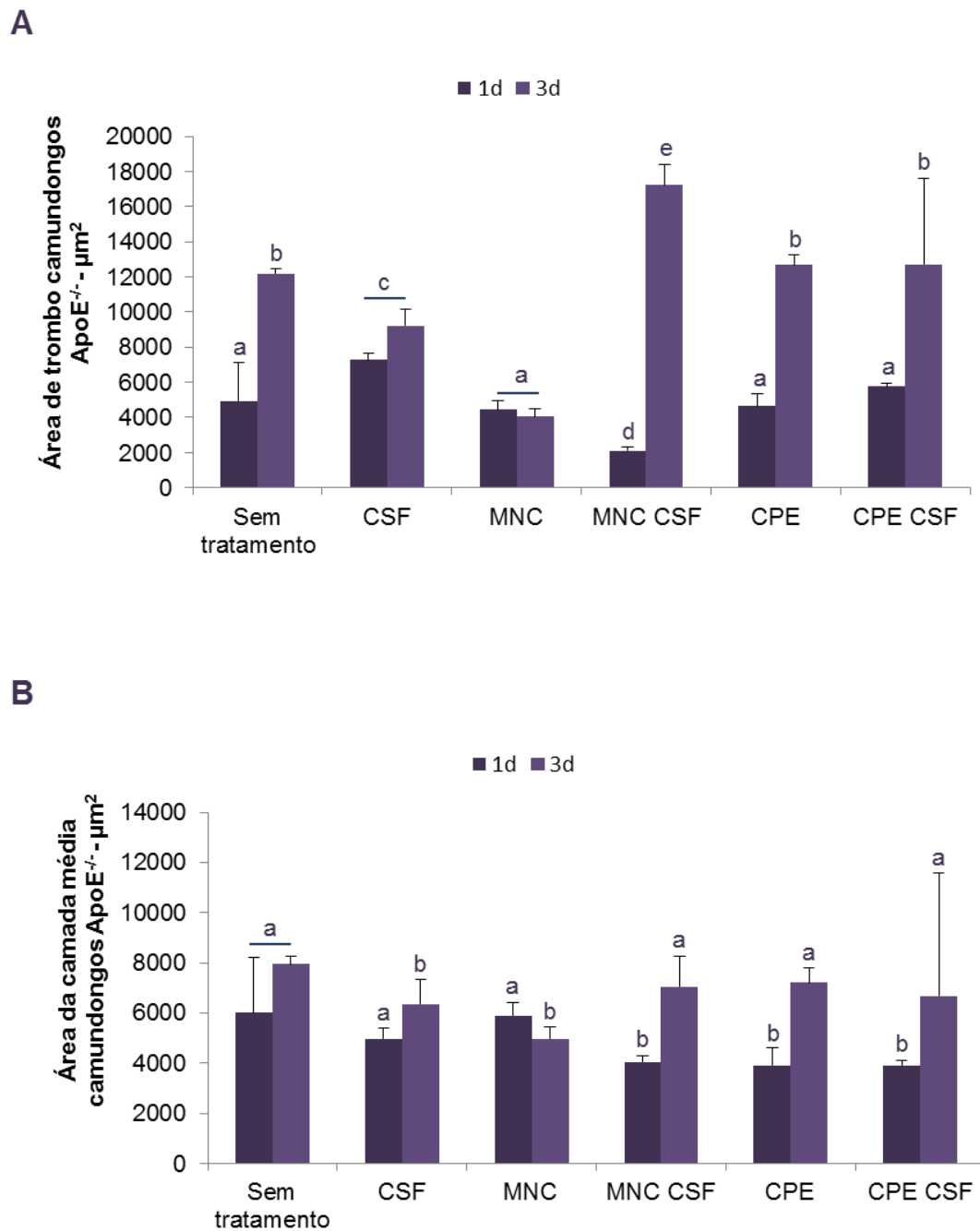


Figura 51. Área de trombo e camada média. (A) A área de trombo (μm^2) foi quantificada como descrito em Materiais e Métodos. (B) Área da média (μm^2) quantificada como descrito em Materiais e Métodos. As colunas representam os valores médios para

cada grupo + desvio padrão; n=3 para cada grupo. Letras diferentes demonstram significância estatística.

b. Atividade gelatinolítica *in situ* nas artérias carótidas de camundongos ApoE^{-/-}.

A administração de CSF isoladamente ou em conjunto com CPE aumentou a atividade enzimática em 45% e 62%, respectivamente, na artéria carótida no primeiro dia após a lesão arterial em relação ao grupo sem tratamento (563,611 ou 628,74 vs. 387,27 densidade integrada, p<0,05) (Figura 52B e F e Figura 53).

Todos os demais tratamentos diminuíram a atividade de gelatinase 'in situ' tanto no dia 1 como no dia 3 após a lesão arterial. A terapia com MNC diminuiu a atividade enzimática em 54% e 91%, respectivamente, 1 e 3 dias após a lesão (177,23 vs. 387,27 ou 143,66 vs. 1679,61 densidade integrada, p<0,05) (Figura 52A e B e 52G e H e Figura 53).

Houve uma diminuição de 53% (180,45 vs. 387,27 densidade integrada, p<0,05) e 40% (655,63 vs. 1679,61 densidade integrada, p<0,05), respectivamente, nos dias 1 e 3 após a lesão arterial em animais que receberam MNC CSF (Figura 52D e 52J e Figura 53). A terapia com CPE apresentou uma diminuição de 93% (26,51 vs. 387,37 densidade integrada, p<0,05) no primeiro dia e de 71% (474,18 vs. 1679,61 densidade integrada, p<0,05) no terceiro dia após a intervenção cirúrgica (Figura 52E e 52K e Figura 53).

O uso de CPE CSF provocou uma diminuição de 80% na atividade de gelatinase no terceiro dia (343,37 vs. 1679,61 densidade integrada, p<0,05) (Figura 52F e 52L e Figura 53).

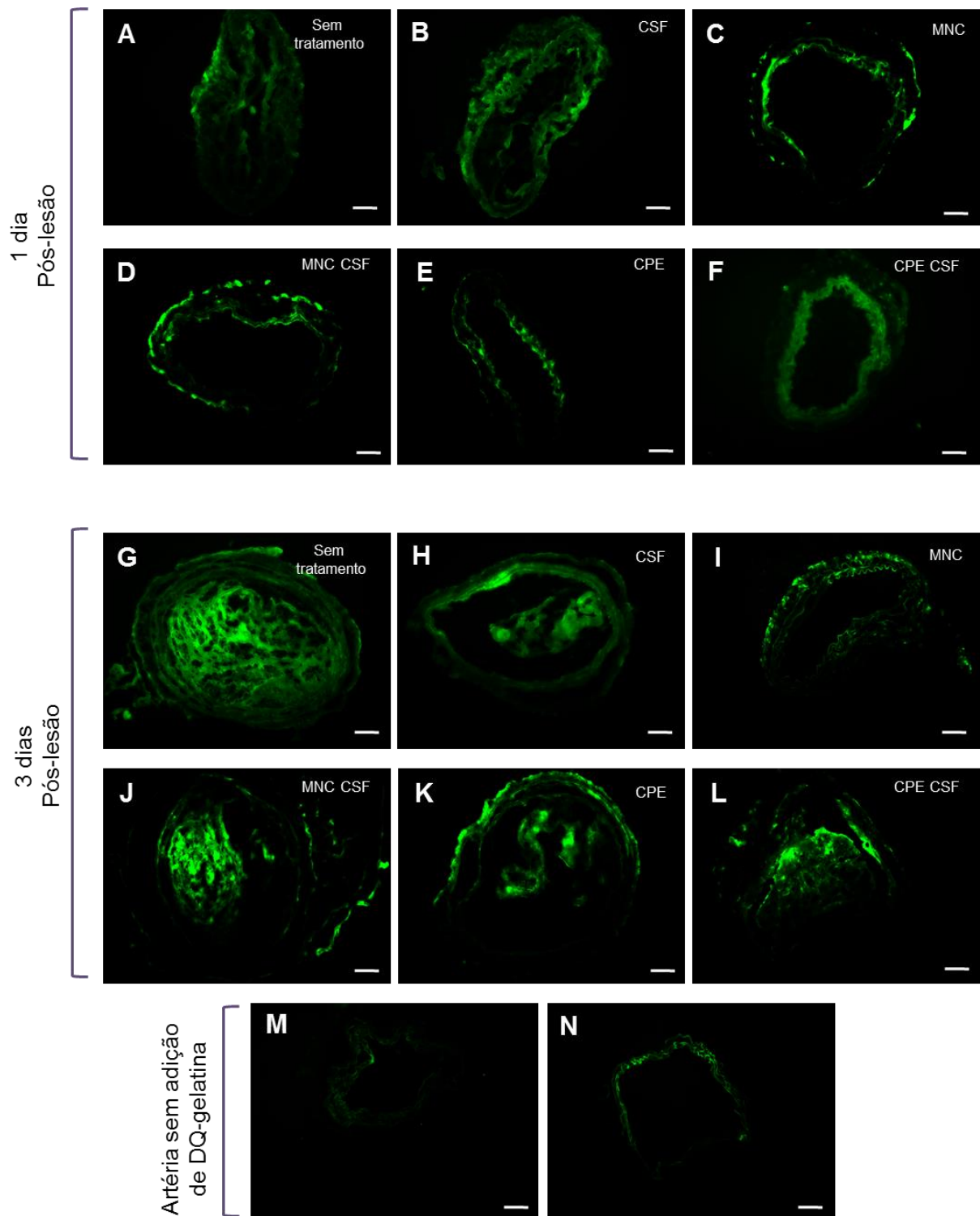


Figura 52. Zimografia ‘in situ’ das artérias carótidas de camundongos ApoE^{-/-} 1 dia após a lesão arterial. A zimografia foi realizada com o uso de DQ-gelatin conjugada com

fluoresceína (FITC) (Invitrogen); a expressão foi analisada subtraindo-se a autofluorescência do tecido da fluorescência presente nas lâminas submetidas à técnica. (A – F) Artérias de camundongos 1 dia após a lesão. Artérias de camundongos 3 dias após a lesão. (A e G) artéria do grupo sem tratamento; (B e H) artéria do grupo tratado com CSF; (C e I) artéria do grupo tratado com MNC; (D e J) artéria do grupo tratado com MNC CSF; (E e K) artéria do grupo tratado com CPE; (F e L) artéria do grupo tratado com CPE CSF; (M e N) Artéria carótida lesionada – autofluorescência do tecido. Barra = 50 μ m.

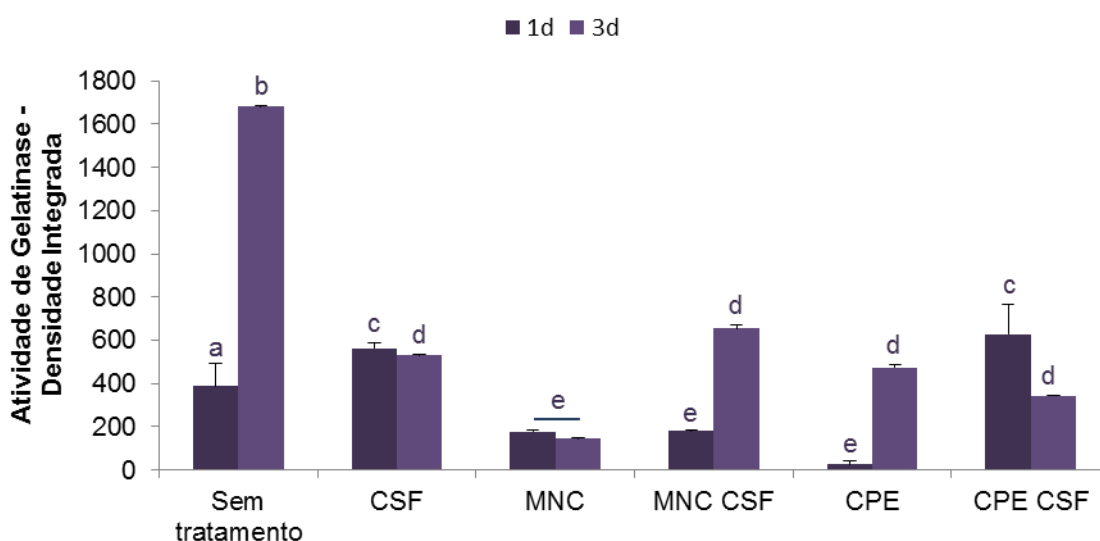


Figura 53. Técnica de Zimografia ‘in situ’ para a detecção de atividade de gelatinases – análise de densidade integrada no software ImageJ. Camundongos ApoE^{-/-} submetidos à injúria arterial foram sacrificados e a artéria carótida esquerda removida. Letras diferenças demonstram diferença estatística.

c. Influência de CSF na migração de MNC ou CPE para o local da lesão.

Os camundongos ApoE^{-/-} após dieta rica em gordura apresentam taxas mais elevadas de colesterol e triglicerídeos bem como uma provável resistência à insulina; isso pode estar diretamente relacionado à uma menor taxa de migração de células para o local da lesão.

Houve uma maior migração de células, tanto as MNC (22 células) como as CPE (40 células), para o local da lesão no terceiro dia após a lesão sem a presença de DS (Figura 54A-C e 55J-L e Figura 56).

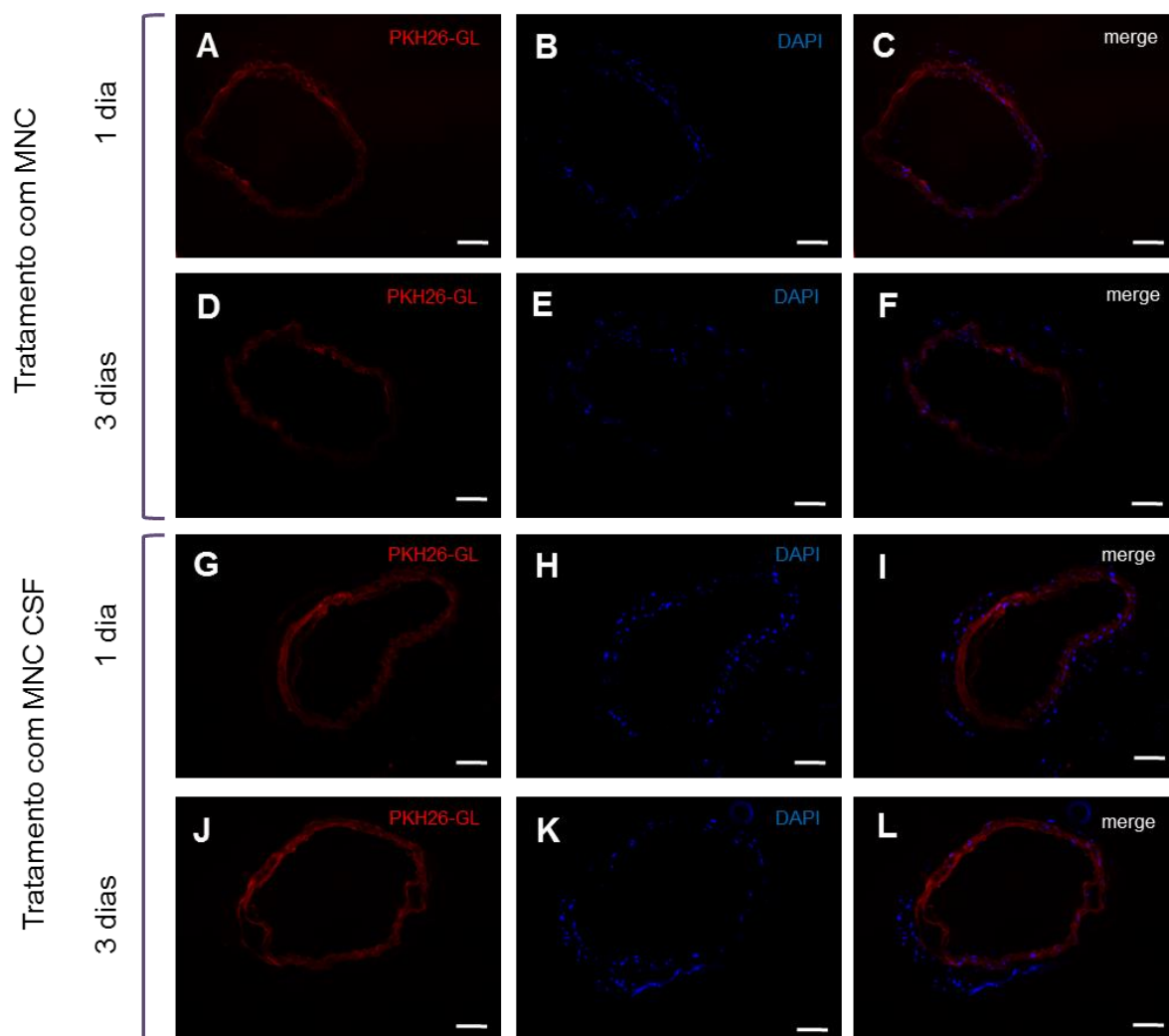


Figura 54. Migração de MNC na presença ou ausência de CSF. As MNC foram marcadas com PKH26-GL e injetadas com ou sem DS. (A) artéria carótida de camundongos 1 dia após a lesão injetados com MNC; (B) DAPI; (C) sobreposição das Figuras A e B; (D) artéria carótida de camundongos 3 dias após a lesão injetados com MNC; (E) DAPI; (F) sobreposição das Figuras D e E; (G) artéria carótida de camundongos 1 dia após a lesão injetados com MNC e CSF; (H) DAPI; (I) sobreposição das Figuras G e

H; (J) artéria carótida de camundongos 3 dias após a lesão injetados com MNC e CSF; (K) DAPI; (L) sobreposição das Figuras J e K. Barra = 50 μ m.

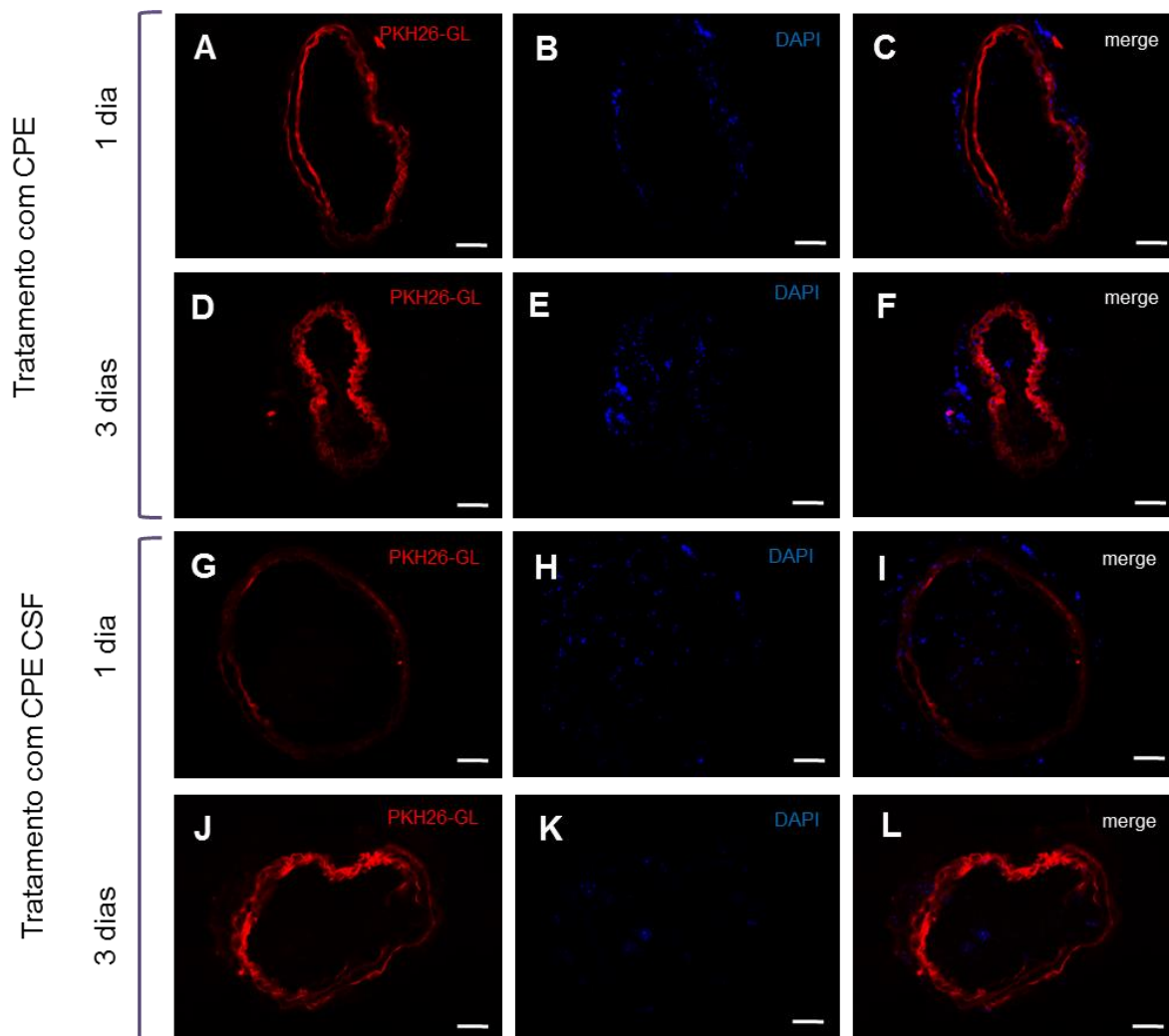


Figura 55. Migração de CPE na presença ou ausência de CSF. As CPE foram marcadas com PKH26-GL e injetadas com ou sem DS. (A) artéria carótida de camundongos 1 dia após a lesão injetados com CPE; (B) DAPI; (C) sobreposição das Figuras A e B; (D) artéria carótida de camundongos 3 dias após a lesão injetados com CPE; (E) DAPI; (F) sobreposição das Figuras D e E; (G) artéria carótida de camundongos 1 dia após a lesão injetados com CPE e CSF; (H) DAPI; (I) sobreposição das Figuras G e H; (J) artéria carótida de camundongos 3 dias após a lesão injetados com CPE e CSF; (K) DAPI; (L) sobreposição das Figuras J e K. Barra = 50 μ m.

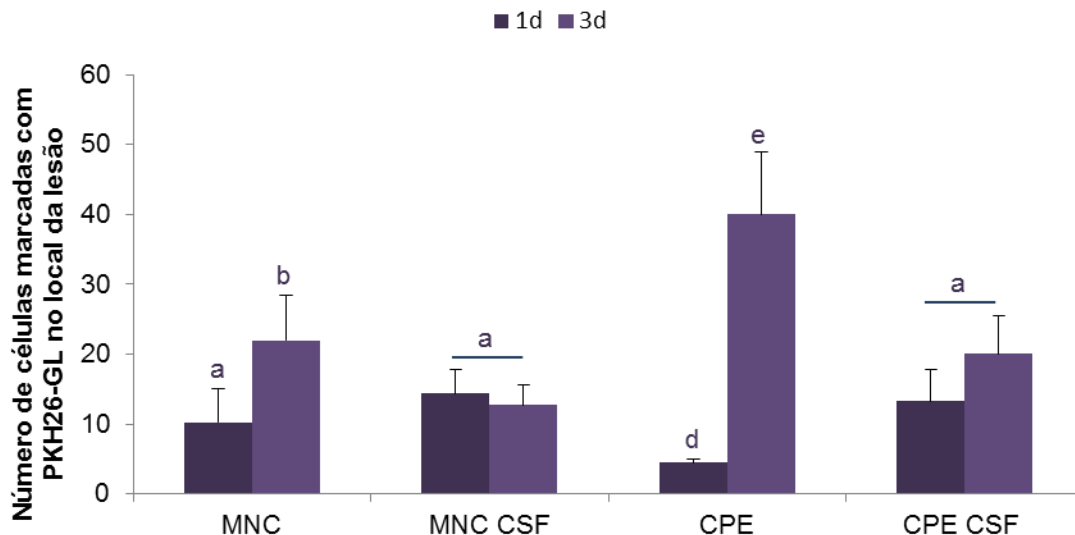


Figura 56. Migração das MNC ou CPE na presença ou ausência de CSF. As CPE marcadas com PKH26-GL e injetadas na presença ou ausência de CSF 1 e 3 dias após a lesão arterial, foram quantificadas utilizando o software ImageJ. Letras diferentes demonstram significância estatística.

d. Fator transformante de crescimento beta (TGF- β)

O TGF- β ativo não diferiu entre os grupos analisados tanto no dia 1 como no dia 2 (Figura 57A).

No primeiro dia após a lesão arterial, tratamentos utilizando MNC ou CPE CSF foram capazes em aumentar a quantidade de TGF- β total; tal aumento foi de aproximadamente 26% quando utilizado MNC (1970,23 vs. 1557,122 pg/mL, $p < 0,05$) (Figura 57B) e cerca de 23% quando tratados com CPE CSF (1922,56 vs. 1557,122 pg/mL, $p < 0,05$) (Figura 57B).

No terceiro dia após a intervenção cirúrgica, apenas o tratamento com CSF apresentou aumento de 48% no nível de TGF- β total (3115,65 vs. 2102,12 pg/mL, $p < 0,05$) (figura 57B).

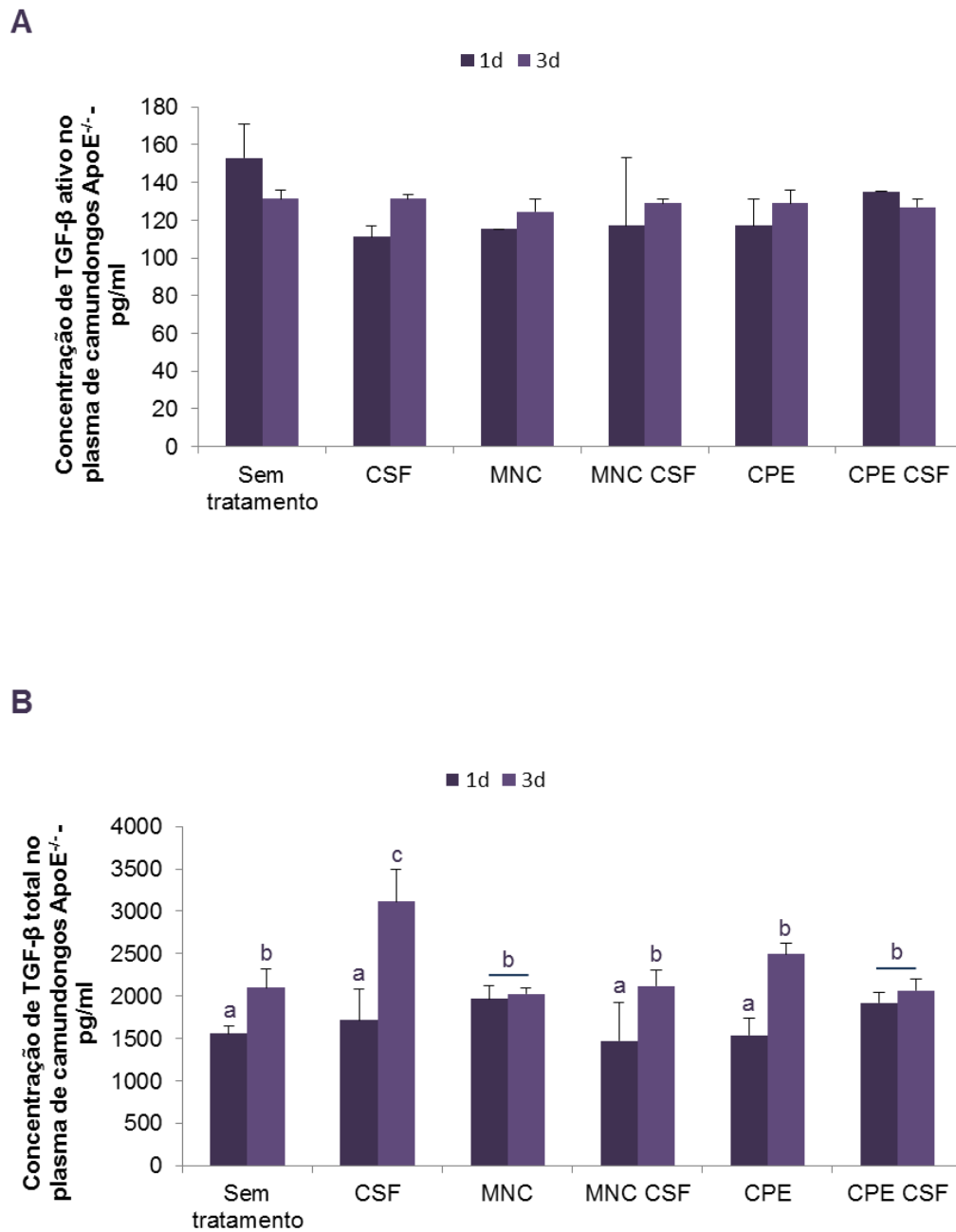


Figura 57. Quantificação do Fator de Transformação do Crescimento β (TGF β) no plasma de camundongos ApoE^{-/-}. A determinação dos níveis de TGF β foram dosados no plasma de camundongos ApoE^{-/-}. Letras diferentes demonstram significância estatística.

e. Citocinas pró-inflamatória (TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10).

A administração de CSF ocasionou uma queda no nível de TNF- α tanto no primeiro dia (35%) como no terceiro dia (48%) (Figura 58A). A terapia com CPE CSF diminuiu o nível dessa molécula no terceiro dia após a lesão arterial (35%) (Figura 58A). Os demais tratamentos não apresentaram diferença estatística significativa entre si (Figura 58A).

Nos camundongos ApoE^{-/-} que receberam injeções de CPE houve uma maior liberação de IL-10 no plasma 1 dia após a intervenção cirúrgica quando comparados com os animais que não receberam tratamento; tal aumento foi em torno 53% (1494,40 vs. 975,89 pg/mL, $p < 0,05$) (Figura 58B). Os demais grupos não diferiram entre si nos tempos analisados.

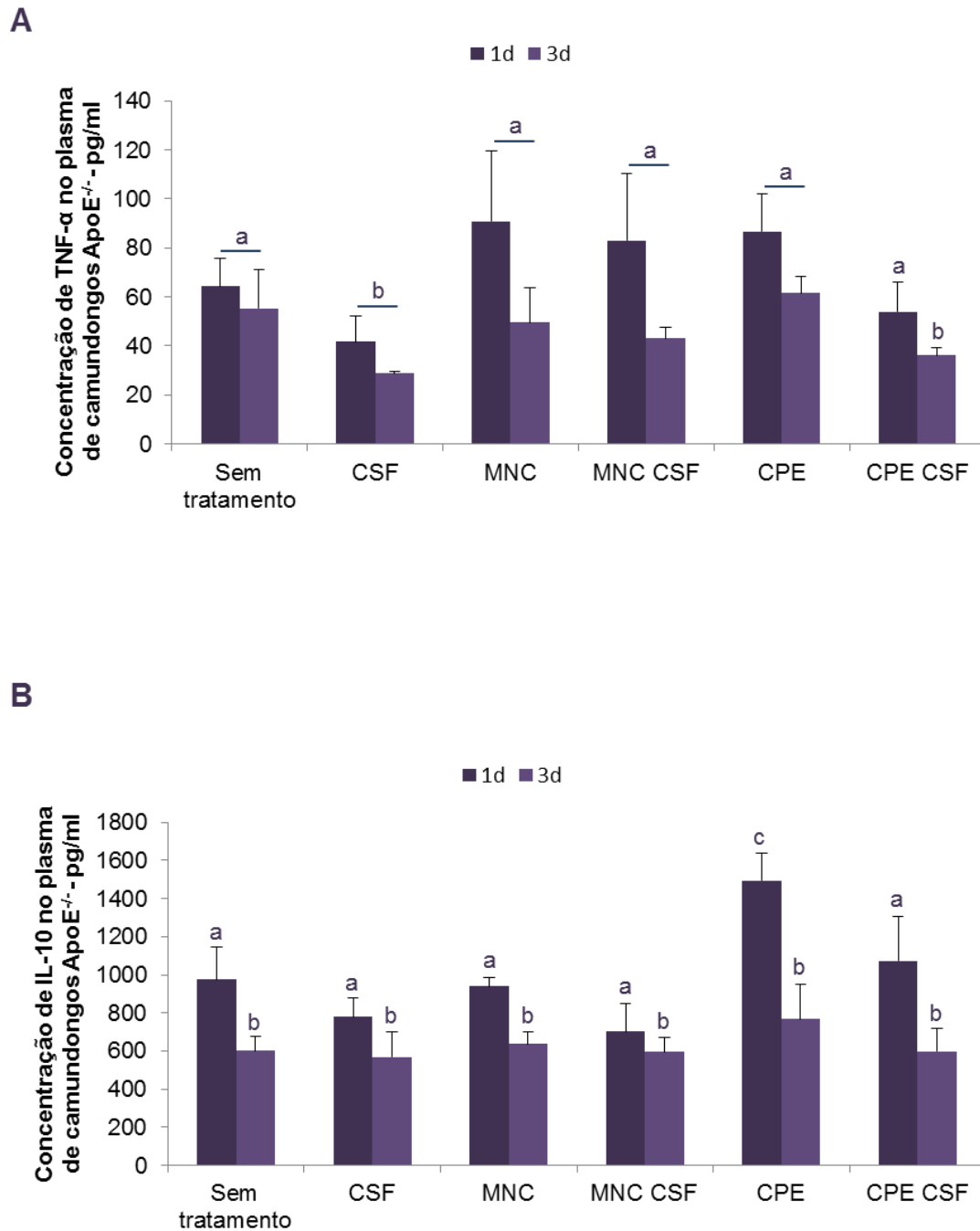


Figura 58. Quantificação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10) no plasma de camundongos ApoE^{-/-}. A determinação dos níveis de TNF- α e IL-10 foram dosados no plasma de camundongos ApoE^{-/-}. (A) Níveis de TNF- α no plasma (pg/mL). (B) Níveis de IL-10 no plasma (pg/mL). Letras diferentes demonstram significância estatística.

f. SDF-1

A terapia com CPE CSF no dia 1 após a cirurgia apresentou uma diminuição acentuada no nível de SDF-1 plasmático (49,34 vs. 407,87 pg/mL, $p < 0,05$) em relação ao controle (Figura 59D). Os demais tratamentos não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo lesionado tanto no dia 1 como no dia 3 após a lesão arterial nos níveis de SDF-1 circulante.

Alguns tratamentos causaram um aumento de SDF-1 no local da lesão; a terapia com MNC CSF ou CPE demonstraram um aumento dessa molécula em relação ao grupo lesionado (236% ou 116%, respectivamente) no primeiro dia após a lesão arterial (Figura 59A e C). No terceiro dia após a intervenção cirúrgica, quase todos os tratamentos (exceto MNC) apresentaram expressão menor de SDF-1 em relação ao grupo lesionado (49% ou 56% ou 54% ou 60%, respectivamente CSF, MNC CSF, CPE, ou CPE CSF) (Figura 59B e C).

O fato da expressão de SDF-1 diminuir ao longo do tempo pode demonstrar uma capacidade diminuída em mobilizar e aderir as células-tronco provenientes da medula óssea; tal efeito pode estar relacionado a dieta rica em gorduras administrada a esses animais.

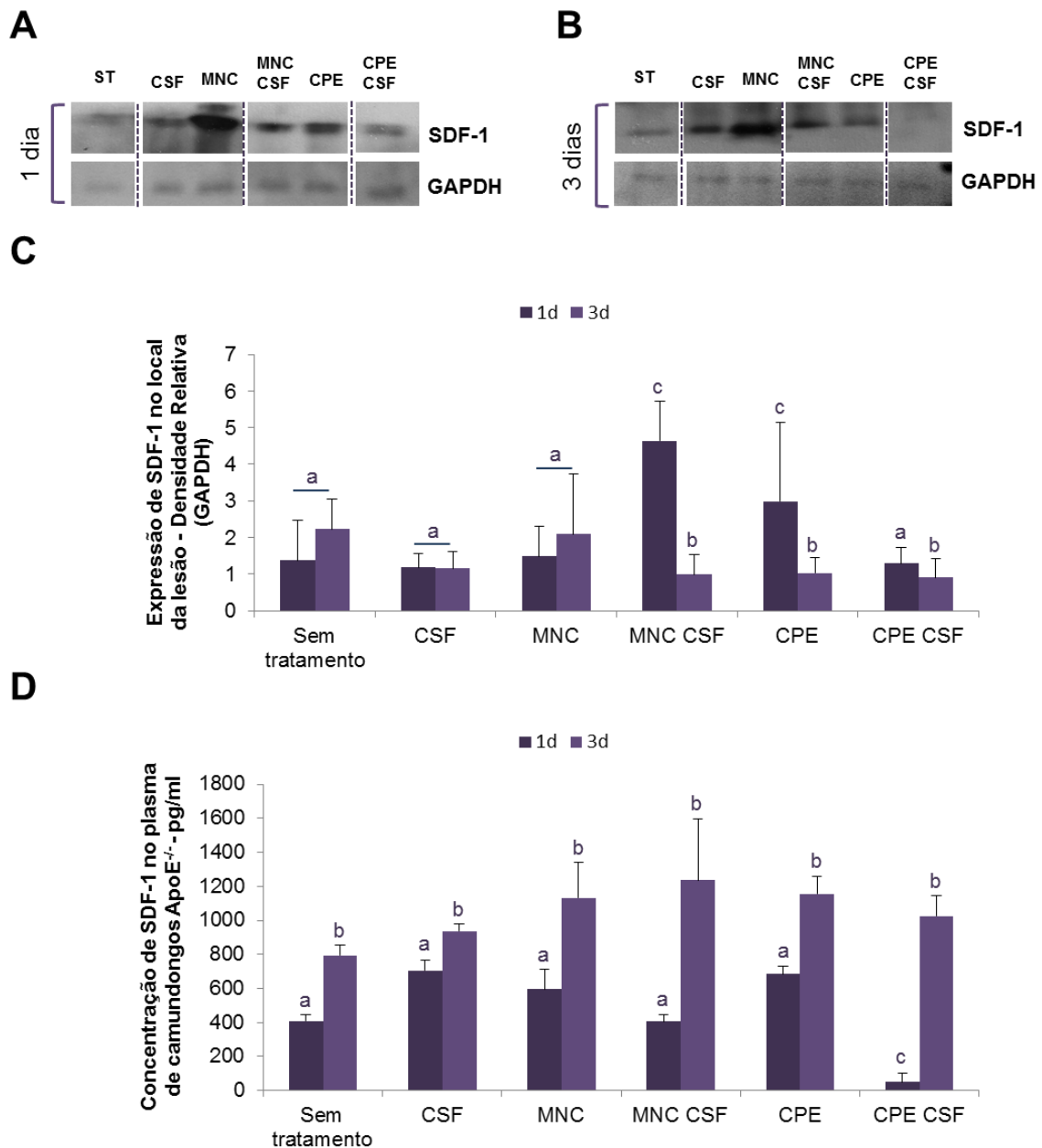


Figura 59. Quantificação do fator derivado de estroma 1 (SDF-1) em camundongos ApoE^{-/-}. (A) expressão de SDF-1 no local da lesão 1 dia após a cirurgia. (B) expressão de SDF-1 no local da lesão 3 dias após a cirurgia. (C) Quantificação da intensidade das bandas analisadas no software ImageJ e normalizadas com o controle interno (GAPDH). (D) Níveis de SDF-1 no plasma de camundongos ApoE^{-/-}. Letras diferentes demonstram significância estatística.

g. Moléculas de adesão

No primeiro dia após a lesão arterial, os camundongos ApoE^{-/-} tratados com MNC ou MNC CSF apresentaram um aumento na expressão de P-selectina (22% ou 56%, respectivamente) (Figura 60A e C). Os demais grupos tiveram a expressão dessa molécula diminuída no dia 1 (43% ou 52% ou 53%, respectivamente, CSF ou CPE ou CPE CSF) (Figura 60A e C). No entanto, 3 dias após a cirurgia, todos os grupos apresentaram um elevado aumento na expressão dessa molécula em relação ao grupo sem tratamento (203% ou 1878% ou 165% ou 617% ou 378%, respectivamente, CSF ou MNC ou MNC CSF ou CPE ou CPE CSF) (Figura 60B e C). O elevado na expressão de P-selectina quando do uso principalmente de MNC pode estar relacionado com o caráter inflamatório dessas células, as quais quando em um ambiente inflamatório, devido ao aumento dos níveis de colesterol e triglicerídeos advindos da dieta rica em gorduras, podem influenciar num aumento da inflamação.

A molécula de adesão, ICAM-1, responsável por uma adesão mais firme à parede vascular se apresenta aumentada em todos os grupos analisados em relação ao grupo sem tratamento (234% ou 296% ou 33% ou 82% ou 102%, respectivamente, CSF ou MNC ou MNC CSF ou CPE ou CPE CSF) no primeiro dia após a cirurgia (Figura 60D e F). No terceiro dia, tratamentos com MNC (150%) ou MNC CSF (36%) aumentaram a expressão de ICAM-1 (Figura 60E e F); os tratamentos que utilizaram MNC apresentaram os maiores aumentos e provavelmente se relaciona ao caráter inflamatório dessas células. As terapias com CSF (70%) ou CPE (76%) ou CPE CSF (61%) diminuíram a expressão dessa molécula em relação ao grupo não tratado (Figura 60E e F).

O uso de CPE mostrou um aumento de P-selectina nos dois momentos analisados, já a molécula de ICAM-1 teve sua expressão diminuída ao longo do tempo; tal efeito pode ser causado por um caráter adesivo das CPE (P-selectina) mas a transmigração (ICAM-1) dessas células para o espaço subendotelial se mostra pouco eficiente.

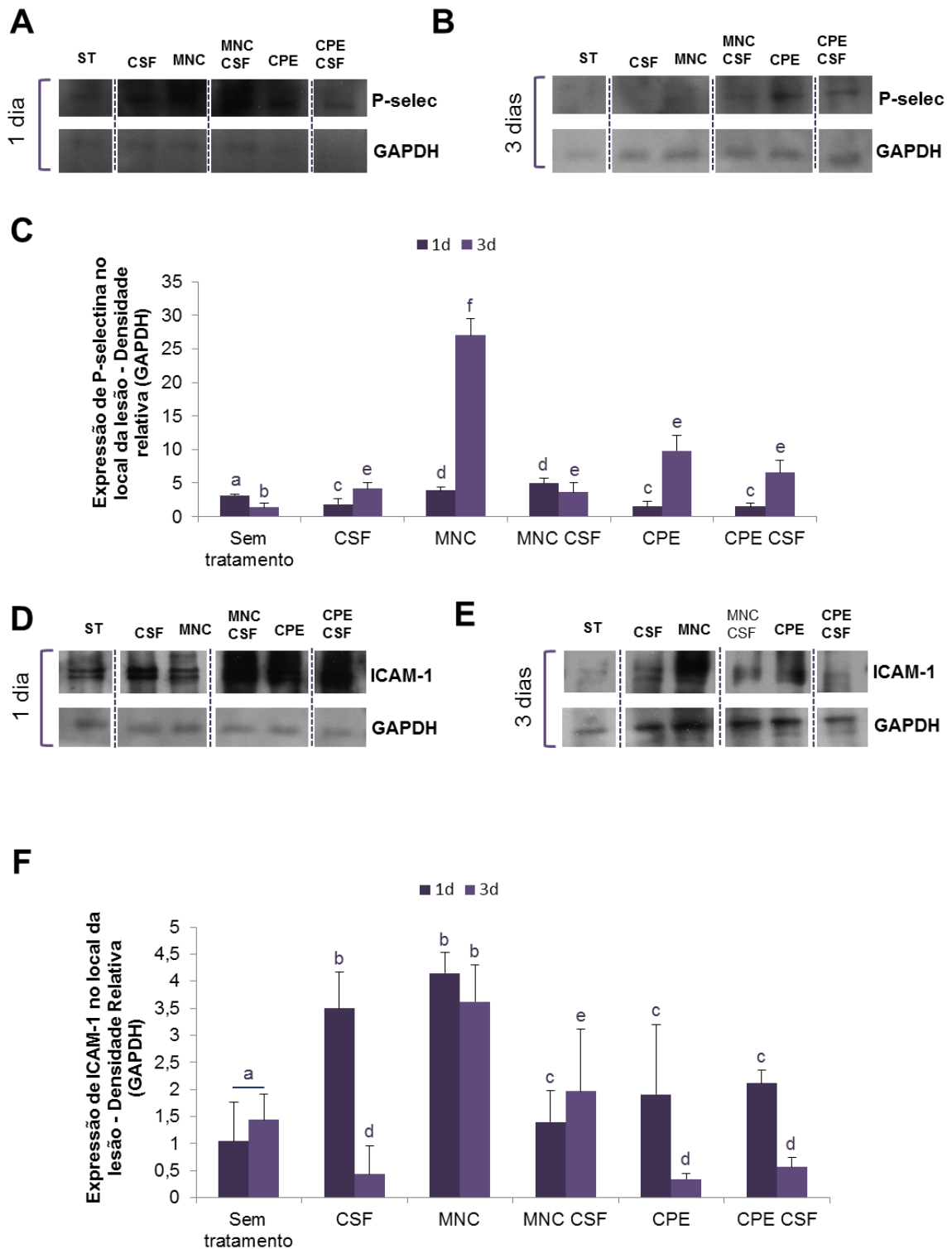


Figura 60. Quantificação das moléculas de adesão, P-selectina e ICAM-1, em camundongos ApoE^{-/-}. A determinação da expressão de P-selectina no local da lesão foi

realizada por western blotting, as bandas analisadas no software ImageJ e normalizadas com o controle interno (GAPDH) (A) expressão de P-selectina 1 dia após a lesão; (B) expressão de P-selectina 3 dias após a lesão; (C) Quantificação da intensidade das bandas por ImageJ; (D) expressão de ICAM-1 1 dia após a cirurgia; (E) expressão de ICAM-1 3 dias após a lesão; (F) Quantificação da intensidade das bandas por ImageJ. Colunas no gráfico representam média da diferença relativa em relação ao grupo sem tratamento. Letras diferentes demonstram significância estatística.

h. eNOS

A terapia utilizando CPE junto com CSF foi capaz de aumentar a expressão de eNOS no terceiro dia após a lesão arterial (57%) em relação ao grupo não lesionado (Figura 61B e C). Todos os demais grupos falharam no processo de reverter a expressão de eNOS, a qual é diminuída após uma injúria vascular (Figura 61A, B e C).

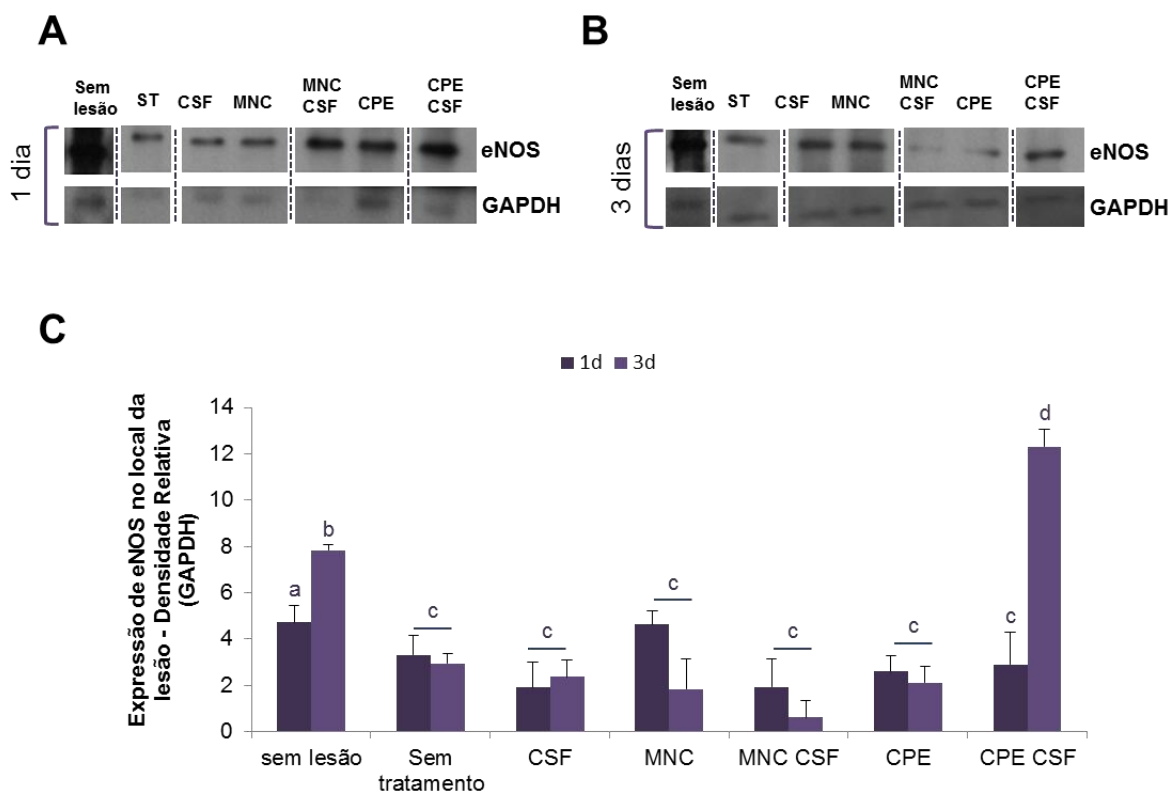


Figura 61. Quantificação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em camundongos ApoE^{-/-}. A determinação da expressão de eNOS no local da lesão foi realizada por western blotting, as bandas analisadas no software ImageJ e normalizadas com o controle interno (GAPDH). (A) Expressão de eNOS 1 dia após a lesão. (B) expressão de eNOS 3 dias após a lesão. (C) Quantificação da intensidade das bandas. Colunas no gráfico representam média da diferença relativa em relação ao grupo sem tratamento. Letras diferentes demonstram significância estatística.

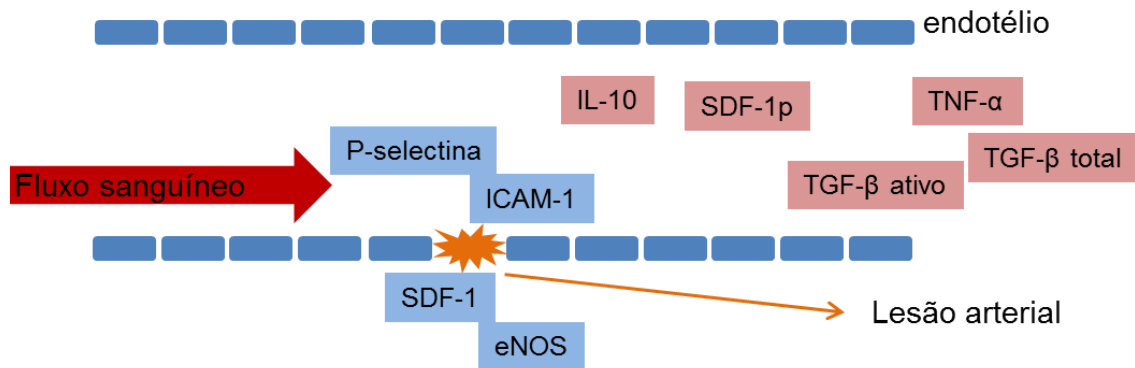
VII. DISCUSSÃO

Intervenções clínicas utilizadas como tratamentos de desobstrução de artérias que estão acometidas por placas de ateroma em geral provocam uma injúria mecânica, a qual ativa tanto a cascata de coagulação como o processo inflamatório podendo levar a restenose do vaso por proliferação exacerbada de células musculares lisas em direção ao lúmen do vaso, obstruindo-o. A trombose e a inflamação apresentam relação direta com a magnitude da restenose. Terapias capazes de prevenir ou inibir esses eventos iniciais e, ao mesmo tempo, recuperar o vaso lesionado são de extrema importância no campo das doenças cardiovasculares.

Inúmeros fatores e moléculas são ativados e/ou liberados tanto localmente como sistemicamente após uma lesão vascular. Dentre todos os fatores envolvidos nesse processo, nosso estudo concentrou as análises em moléculas envolvidas tanto na inflamação local como sistêmica bem como em fatores responsáveis pela mobilização de células-tronco da medula óssea, as quais podem ajudar na recuperação vascular.

As moléculas estudadas no nosso modelo de lesão vascular estão mostradas na figura abaixo, onde observamos injúria às células endoteliais e, conseqüente, adesão de plaquetas (ICAM-1), adesão de leucócitos às células endoteliais ativadas (P-selectina), diminuição da capacidade de regulação do tônus vascular (eNOS), migração de células-tronco (SDF-1), produção de colágeno por células musculares lisas e fibroblastos (TGF- β), regulação de expressão de MMPs (TNF- α) e possível aumento de citocina anti-inflamatória (IL-10) como uma resposta do organismo para balancear o estado inflamatório.

- Moléculas analisadas localmente
- Moléculas circulantes



O resumo da ação dos tratamentos está mostrado nas tabelas abaixo:

- Camundongos C57BL6

C57BL6	TGFβ ativo	TGFβ total	TNFα	IL-10	SDF-1 plasma	SDF-1 local	P-selectina	ICAM-1	eNOS	Atividade Gelatinase	Migração EPC
Sem tratamento											
DS					↑1d	↑1d		↓3d	↓1d 3d	↓1d 3d	
MNC			↓3d			↑1d	↑1d ↓3d	↑3d	↑3d	↑	
MNC DS		↑1d				↑1d	↑1d ↓3d	↑1d ↓3d	↓1d		
CPE			↑1d			↑3d	↑1d ↑3d	↑1d 3d	↓1d 3d		
CPE DS			↑1d 3d			↑1d 3d	↑1d ↓3d	↑1d 3d	↑1d 3d		↑

C57BL6	TGFβ ativo	TGFβ total	TNFα	IL-10	SDF-1 plasma	SDF-1 local	P-selectina	ICAM-1	eNOS	Atividade Gelatinase	Migração EPC
Sem tratamento											
CSF		↑1d	↑1d ↓3d		↑1d	↑1d			↓1d 3d	↑	
MNC			↓3d			↑1d	↑1d ↓3d	↑3d	↑3d	↑	
MNC CSF			↓3d				↑1d ↓3d	↓1d 3d	↓1d		
CPE			↑1d			↑3d	↑1d ↑3d	↑1d 3d	↓1d 3d		
CPE CSF			↑1d				↑1d ↑3d	↑1d ↓3d	↓1d 3d		↑

- Camundongos ApoE^{-/-}

ApoE	TGFβ ativo	TGFβ total	TNFα	IL-10	SDF-1 plasma	SDF-1 local	P-selectina	ICAM-1	eNOS	Atividade Gelatinase	Migração EPC
Sem tratamento											
DS		↑1d	↑1d 3d		↑1d	↓1d 3d	↑3d	↑3d	↓1d 3d	↓	
MNC							↑3d	↑1d 3d	↓3d	↓	↑3d
MNC DS		↑1d				↑1d ↓3d	↑3d	↑3d	↓1d 3d	↓	
CPE				↑1d		↑1d ↓3d	↑3d	↑1d ↓3d	↓1d 3d	↓	↑3d
CPE DS			↑1d			↑1d ↓3d	↑3d	↓3d	↓1d 3d	↑	

ApoE	TGFβ ativo	TGFβ total	TNFα	IL-10	SDF-1 plasma	SDF-1 local	P-selectina	ICAM-1	eNOS	Atividade Gelatinase	Migração EPC
Sem tratamento											
CSF						↓3d	↑3d	↑1d ↓3d	↓1d 3d	↑	
MNC							↑3d	↑1d 3d	↓3d	↓	↑3d
MNC CSF						↑1d ↓3d	↑3d	↑1d 3d	↓1d 3d	↓	↑1d
CPE				↑1d		↑1d ↓3d	↑3d	↑1d ↓3d	↓1d 3d	↓	↑3d
CPE CSF					↓1d	↓3d	↑3d	↑1d ↓3d	↓1d ↑3d	↑	↑1d

Em um estudo prévio do nosso grupo, observamos que a administração de MNC provenientes da medula óssea de camundongos C57BL6 juntamente com DS foi capaz de

prevenir a formação de neointima após lesão arterial em camundongos (Godoy et al., 2011). Baseado nesse estudo, nós demonstramos o efeito de terapias utilizando tanto MNC como CPE na presença ou não de GAGs (DS ou CSF) na inflamação após a injúria vascular em camundongos C57BL6 e ApoE^{-/-}.

Em 1992, Libby e colaboradores lançaram, pela primeira vez, a hipótese de que a inflamação poderia influenciar a formação de neointima, propondo que moléculas com efeitos autócrinos e/ou parácrinos, como o TNF- α , poderiam modificar o mecanismo de ação de células musculares lisas durante esse processo. Uma cascata de eventos se inicia imediatamente após a colocação de *stents*. A primeira consequência é o desnudamento endotelial, seguido de rompimento da placa de ateroma e exposição de moléculas subendoteliais; uma camada de plaquetas e fibrinas é formada no local da lesão. Plaquetas ativadas expressando P-selectina aderem a leucócitos circulantes através da ligação com PSGL-1 e inicia o processo de rolamento leucocitário na superfície lesionada. A migração de leucócitos através da camada de plaquetas-fibrina e, posterior, diapedese em direção ao ambiente subendotelial é influenciada por citocinas liberadas por células musculares lisas e macrófagos residentes na parede vascular (Welt e Rogers, 2002).

No nosso estudo, observamos que, em camundongos C57BL6, terapias utilizando MNC na ausência ou presença de DS ou CSF ou tratamento com CPE juntamente com DS podem estar atuando na inibição da adesão de leucócitos através da redução da expressão de P-selectina; já em camundongos ApoE^{-/-} todos os tratamentos analisados aumentaram a expressão dessa molécula.

O DS proveniente de mamíferos, como o utilizado no nosso estudo, possui, principalmente, dissacarídeos 4-monosulfatados e essa molécula não é capaz de inibir a ligação de P-selectina à células tumorais, mesmo em altas concentrações (Kozlowski et al., 2011). Kozlowski et al. (2011) observaram que a administração de DS (100 μ g/animal) provenientes de ascídias 10 minutos após a injeção de células LS180 (células de carcinoma de intestino) foi capaz de diminuir as interações mediadas por P-selectina (plaquetas-células tumorais) na microvasculatura pulmonar e este efeito dura por até 3 horas. No nosso estudo, a dose de DS utilizada foi de 20mg/kg de animal (aproximadamente 500 μ g de DS por injeção para um camundongo de 25g) e mesmo com essa dose não observamos

diminuição na expressão de P-selectina quando administramos apenas o DS tanto no camundongo C57BL6 como no ApoE^{-/-}. Tal resultado pode estar relacionado diretamente ao padrão de sulfatação diferente entre os DS de mamíferos (4-monosulfatado) e de ascídias (2,6-sulfatados ou 2,4-sulfatados) e também ao momento em que a expressão dessa molécula foi analisada (1 dia e 3 dias) visto que Kozlowski et al (2011) mostraram que o efeito dura por até 3 horas.

Borsig et al (2007) mostraram que o tratamento com CSF foi capaz de inibir as interações entre P- e L-selectinas; o CSF também inibiu o recrutamento de neutrófilos em 2 modelos de inflamação (indução de peritonite usando tioglicolato e inflamação pulmonar com o uso de LPS). A dose utilizada foi de 0,2 – 0,5mg/animal de CSF intravenoso no modelo de peritonite e 0,25mg/animal intraperitoneal no inflamação pulmonar; no nosso modelo de tratamento utilizamos a dose de 10µg/injeção num total de 4 injeções (40µg CSF) e, provavelmente, por essa diferença na dosagem não observamos diminuição significativa na expressão de P-selectina quando do uso de CSF (sozinho ou em conjunto com células).

Entretanto, Hubert et al.(2014) demonstraram que após injúria endotelial causada por laser em camundongos, os neutrófilos recrutam ECFCs para o local de lesão e aumentam seu potencial pró-angiogênico. No modelo *in vivo*, essa interação ocorre quando o trombo está estabelecido e necessita apenas da presença de neutrófilos, sem a necessidade de plaquetas ou fibrina. Nesse mesmo estudo, uma análise em cultura mostrou que a interação entre neutrófilos ativados e células endoteliais ativadas é um pré-requisito para a captura de ECFCs; os neutrófilos ativam as ECFCs, aumentando suas propriedades angiogênicas, como a habilidade em migrar e formar estruturas semelhantes a vasos. Esta interação de ECFCs com os neutrófilos é mediada por PSGL-1/L-selectina. Baseado nesse estudo, a presença de neutrófilos no local da lesão seria de grande importância para a adesão das células sem estar relacionado a presença de plaquetas e fibrinas.

Massberg e colaboradores (2006) mostraram, que após injúria arterial por cloreto férrico, as plaquetas eram as responsáveis pela mobilização de células progenitoras; entretanto, em um experimento em cultura a fibrina e não as plaquetas seriam as responsáveis pela adesão de células CD34 positivas (De Boer et al., 2006). Abou-Saleh e

colaboradores (2009) mostraram que CPE humanas derivadas do sangue periférico se ligam à plaquetas via P-selectina e que essas células foram capazes de inibir a ativação e agregação plaquetárias, a adesão ao colágeno em cultura e a formação de trombo *in vivo*, principalmente através da COX-2 e secreção de PGI₂. Eles também mostraram que o sobrenadante das CPE foi mais eficaz na inibição da formação de trombo do que apenas as células, sugerindo que o efeito antitrombótico das CPE está relacionado a liberação de fatores de inibição plaquetária (Abou-Saleh et al., 2009).

De Boer et al. (2006) mostraram que num ensaio em cultura, a ligação direta de células CD34 à células endoteliais não ativadas ou ativadas ou ao subendotélio está limitada quando analisado sob fluxo, sugerindo que as células CD34+ são inertes às células endoteliais ou moléculas subendoteliais. Além disso, eles mostraram que as plaquetas atuam como um fator intermediário para a adesão de CPE, sendo um pré-requisito para o processo inicial de adesão dessas células ao local de injúria vascular. Eles mostraram que em caso de injúria vascular, o trombo plaquetário se acumula em regiões próximas a lesão, expondo a molécula de P-selectina, a qual estimula a adesão de células CD34+.

O mecanismo utilizado pelas CPE para a adesão apresenta similaridades com outras cascatas de adesão celular, todas iniciadas por uma adesão inicial mediada por P-selectina nas plaquetas (Springer, 1994). Isso foi observado em inúmeros subtipos leucocitários como linfócitos T (Alon et al., 1994), células NK (Sheikh et al., 2004), neutrófilos (Zwaginga et al., 1999) ou monócitos (Kuijper et al., 1998). De Boer et al. (2006) mostraram em um modelo *in vivo* que o recrutamento de células CD34+ é específico para injúrias e acontecem na presença de leucócitos maduros, provavelmente utilizando ligantes similares.

Em nosso trabalho, os tratamentos que não promoveram a diminuição da expressão de P-selectina, possivelmente, podem estar utilizando essa molécula como o mecanismo de adesão de células progenitoras ao local da lesão.

Durante o processo de rolamento leucocitário, o contato dessas células com a superfície endotelial permite que os leucócitos sofram influência de citocinas associadas à superfície endotelial. Essas citocinas são secretadas a partir de um microambiente inflamado e podem sofrer transcitose através do endotélio e serem expressas na superfície

das células endoteliais associadas à proteoglicanos (Rot e von Andrian, 2004; Colditz et al., 2007). Elas são apresentadas aos leucócitos através de interações com a proteína G acoplada à receptores de citocinas; há a indução de sinais intracelulares levando a ativação de integrinas e, posterior, adesão leucocitária mais firme bem como a mudança de formato dos leucócitos e formação de pseudópodos (Rot e von Andrian, 2004). Uma importante integrina responsável pela firme adesão dos leucócitos é a ICAM-1, a qual apresenta aumento na sua expressão após a ativação endotelial (Hogg et al., 2002).

O uso de DS na ausência ou presença de MNC ou CPE diminuiu essa expressão em camundongos C57BL6 e, provavelmente, inibindo uma resposta inflamatória mais acentuada; entretanto, quando analisamos os animais ApoE^{-/-}, observamos que tratamentos com CSF, CPE ou CPE CSF foram mais eficientes.

Penc et al (1999) observaram um aumento nos níveis de ICAM-1 circulante após 5 horas da administração de DS; entretanto a dose utilizada foi de 4mg de DS injetados intraperitonealmente. Nosso estudo mostrou que uma dose intravenosa menor de DS (500µg/injeção num total de até 4 injeções) foi capaz de diminuir a expressão de ICAM-1 em camundongos C57BL6. Além disso, Penc et al (1999) mostraram um aumento nos níveis de RNAm de ICAM-1 em células endoteliais humanas de microvasculatura da derme 4 horas após o tratamento, com o pico máximo em 6 horas; nós também observamos um aumento nos níveis de RNAm de ICAM-1 tanto no dia 1 como dia 3 em camundongos C57BL6 após tratamento com DS.

Tal aumento de RNAm de ICAM-1 pode estar relacionado com o efeito do DS sobre as células endoteliais, ativando-as mesmo na ausência de outros fatores estimulantes como as citocinas ou fatores de crescimento (Penc et al., 1999). Essa habilidade de DS em induzir a expressão de ICAM-1 em células endoteliais é única entre os GAGs. O DS puro induziu a expressão de ICAM-1 na superfície celular de maneira dose-dependente em concentrações iguais ou menores que as encontradas *in vivo* (Penc et al., 1998). Nosso estudo mostrou que tratamentos utilizando DS com MNC ou CPE aumentaram a expressão da molécula ICAM-1 nos 2 modelos animais utilizados, tal efeito pode ser causado pela ativação dessas células pelo DS utilizado o que a expressão de ICAM-1.

A coagulação é também um processo que se inicia após a lesão endotelial por expor fatores subendoteliais ao sangue circulante. A cascata de coagulação é um processo que resulta na formação de trombina e subsequente conversão de fibrinogênio em fibrina. Testes de rotina para análise do processo de coagulação são baseados em ensaios de formação de coágulo após o início da coagulação sanguínea (TTPa). Assim como a heparina, o CSF prolonga o TTPa (Mourão et al., 2001). Nossos resultados mostraram que o TTPa é prolongado na terapia com FuCS nas 12 primeiras horas após a lesão; após 1 dia o TTPa se normaliza e permanece praticamente inalterado até 3 dias. Normalmente o prolongamento de TTPa está diretamente relacionado à concentração administrada. Borsig et al. (2007) mostraram que o CSF é capaz de aumentar em até 2,5 vezes o TTPa em camundongos que receberam 500µg/animal dessa molécula; no nosso experimento utilizamos 0,5µg/g animal que fornece aproximadamente 12,5µg de CSF por injeção. Com uma menor quantidade da droga, o TTPa se normaliza ao longo do tempo.

Glauser et al. (2008) mostraram que a adição de CSF tanto a plasma normal como a plasma livre de serpinas aumentou o tempo de coagulação de maneira similar. Analisaram também a ação do CSF na geração de trombina ou fator Xa, observando que houve um retardamento na formação dessas proteases. Quando o experimento foi realizado com plasma livre de anti-trombina e de HCII, o CSF reteve sua ação. Esses experimentos demonstraram claramente que a atividade anti-coagulante do CSF é independente de serpina. Entretanto em nossos experimentos, a atividade de trombina é diminuída 3 e 6 horas após a administração de CSF, se normalizando após 12 horas.

Mourão et al. (1998) mostraram que em um modelo usando coelhos, o tempo de sangramento causado pela administração de CSF aumenta com o aumento da dose desse GAG. Demonstraram também que o TTPa aumentou rapidamente após a injeção e diminuiu gradativamente ao longo do tempo. Esse efeito pode ser devido a rápida remoção desse GAG da circulação tanto pela degradação enzimática como pela internalização por outros órgãos ou absorção pelos vasos sanguíneos. Observamos que o tempo de sangramento provocado pelo CSF foi superior aos animais que não receberam a droga em todos os períodos estudados.

O DS exerce sua ação através da ligação ao cofator II da heparina e aumenta a taxa de inibição de trombina em aproximadamente 10.000 vezes (Vicente et al., 2004). O DS também prolonga o TTPa no plasma analisado em cultura (Vicente et al., 2004). Vicente et al. (2004) mostraram que a administração de DS prolonga o TTPa em camundongos selvagens mas não apresenta esse efeito em animais HCII^{-/-}, fortalecendo a evidência de que a ação de DS é dependente de HCII. No nosso trabalho, a administração de DS prolongou o TTPa nas primeiras 12 horas após a administração, se normalizando após 24 horas. O tempo de sangramento foi prolongado em todos os tempos estudados e não observamos diminuição da atividade de trombina nos tempos analisados.

O DS também causa a diminuição da geração de trombina através de sua ligação com o cofator II da heparina (HCII) (Vicente et al., 2007). A trombina é conhecida por seus efeitos pleiotrópicos em cultura através da modulação de inúmeros processos no sistema vascular como permeabilidade vascular, tônus vascular, inflamação e formação de novos vasos (Schuepbach et al., 2009; Rex et al., 2009; Martorell et al., 2008) e também por ativar células envolvidas na resposta inflamatória como os monócitos, linfócitos T, mastócitos e células endoteliais (Miyamoto et al., 2010). Ela também pode afetar a migração leucocitária, formação de edemas e processos relacionados com o reparo tecidual (Rickle et al., 2003; Verkleij et al., 2010). Por promover a diminuição de trombina, o tratamento com DS pode estar afetando a migração de células inflamatórias de maneira independente das moléculas de adesão.

O CSF, por apresentar atividade anti-coagulante através da inibição da anti-trombina e do HCII (Mourão et al., 1996), pode também estar atuando negativamente na migração de células inflamatórias através da diminuição de trombina. Entretanto, a capacidade desse GAG em inibir a formação de trombo é menor comparado com o tratamento com DS e isso pode influenciar na resposta inflamatória.

A regeneração endotelial é essencial para o restabelecimento de vasos saudáveis e recobrimento de colágeno subendotelial exposto durante a lesão vascular. Nós mostramos que MNC injetadas juntamente com DS em camundongos C57BL6 provocaram uma maior migração dessas células para o local da lesão (Godoy et al., 2011); no presente estudo, também observamos uma maior migração de CPE quando injetadas junto com DS. Esse

efeito pode ser atribuído à ativação do FGF-2 pela molécula de DS (Penc et al., 1998; Trowbridge e Gallo, 2002); esse GAG pode sequestrar FGF-2, o qual estimula a proliferação de células endoteliais (Lamallice et al., 2007).

Ao mesmo tempo em que alguns tratamentos apresentam uma diminuição na formação de trombo e, conseqüentemente, diminuição na expressão de algumas moléculas de adesão, nós observamos um aumento na expressão de SDF-1 local em todos os grupos de animais C57BL6 comparados com o grupo sem tratamento. Os efeitos biológicos de SDF-1 são mediados pelo receptor dessa molécula, CXCR4, o qual é expresso em linhagens celulares incluindo células da linhagem muscular, células endoteliais, leucócitos e células progenitoras (Murdoch et al., 1999; Kucia et al., 2004; Ratajczak et al., 2003). Como a camada média dos vasos sanguíneos é composta principalmente de células musculares lisas, a expressão de SDF-1 tende a ser alta devido a sua interação com o receptor CXCR4.

A isquemia e várias citocinas, incluindo VEGF e fator estimulante de colônia macrofágica (GM-CSF), foram relacionadas com a mobilização de CPE para sítios de neovascularização (Takahashi et al., 1999). CPE expressam CXCR4 o que permite sua adesão à locais de neovascularização em tecidos isquêmicos, o qual libera o fator estimulante, SDF-1. Outras células pro-angiogênicas CXCR4⁺ são compostas por células hematopoiéticas imaturas e maduras e progenitores das células musculares lisas, as quais apresentam propriedades pro-angiogênicas tanto direta como indiretas (Ho et al., 2012). Como observado em nosso estudo, as CPE injetadas através da veia da cauda são capazes de atingir o local da lesão vascular provavelmente pela estimulação de SDF-1; a terapia com DS apresentou níveis elevados de SDF-1 no plasma de animais C57BL6 e ApoE^{-/-} bem como o CSF em camundongos C57BL6, isso poderia explicar o número maior de células nos grupos tratados com GAG em relação ao grupo que recebeu apenas as CPE.

O complexo CXCR4/SDF-1 pode influenciar as vias de sinalização PI3K/AKT e MAPK, as quais contribuem para a secreção de várias MMPs (Fenandis et al., 2004; Tang et al., 2008); MMP-2 e MMP-9 estão envolvidos na migração de células através da membrana basal (Janowska-Wieczorek et al., 2000). A atividade proteolítica de gelatinases (incluindo as MMPs) *in situ* se mostrou alta em todos os grupos de animais C57BL6

analisados exceto o grupo que recebeu apenas DS. A alta atividade enzimática poderia ser responsável pela maior migração de CPE em animais que receberam essas células juntamente com DS ou CSF; expressão elevada de SDF-1 no local da lesão estimula a migração de células, as quais após a ligação com o receptor CXCR4 estimulam uma maior secreção de MMPs, aumentando a atividade das gelatinases, o que facilita a migração dessas células.

As MMPs apresentam uma função importante na degradação de colágeno e outras macromoléculas da matriz extracelular (Murphy e Docherty, 1992), várias MMPs são recrutadas para a liberação e processamento de moléculas como o TGF- β (Chen et al., 2013). Isso induz a produção de matriz extracelular, em especial o colágeno, por células presentes no local da injúria (Border e Noble, 1994).

O TGF- β apresenta uma importante função no reparo e regeneração após injúria vascular (MacLellan et al., 1993; Border e Noble, 1994). O TGF- β é sintetizado em praticamente todas as células e secretado como um complexo latente associado a proteína de latência; uma vez secretado, esse complexo latente pode ser ativado por mudanças de pH, aumento de temperatura ou ação de enzimas proteolíticas, liberando o TGF- β maduro (MacLellan et al., 1993; Border e Noble, 1994). No sistema vascular, a coexistência de células endoteliais e células musculares lisas é essencial para a ativação de TGF- β 1 (MacLellan et al., 1993; Border e Noble, 1994). Nosso estudo mostrou que o TGF- β total foi maior em animais C57BL6 e ApoE^{-/-} tratados com CSF ou MNC DS; isso pode ser explicado por uma atividade aumentada de gelatinases nesses grupos, o que ocasiona aumento de MMPs e, conseqüente, aumento da liberação de TGF- β ; o TGF- β ativo não mostrou diferença entre os tratamentos estudados.

Belmiro et al (2011) demonstrou que a terapia com DS foi capaz de diminuir a produção de TGF- β , o que diminuiu o dano tubular e a fibrose em modelo murino de obstrução uretral unilateral; nossos tratamentos não foram eficazes em diminuir os níveis dessa molécula, provavelmente devido ao modelo estudado.

Os camundongos ApoE^{-/-} apresentaram uma menor migração de células (CPE ou MNC) para o local da lesão, principalmente quando houve a utilização de GAGs (DS ou

CSF); esse efeito se mostrou oposto ao animal C57BL6, onde essas moléculas favorecem a migração de células.

Os processos patológicos envolvidos em doenças vasculares incluem a acumulação de lipídeos que foram retidos por moléculas da matriz extracelular, principalmente os proteoglicanos versicano, biglicano e decorina de condroitin sulfato e dermatan sulfato (Williams e Tabas, 1998). Na parede vascular, os proteoglicanos são sintetizados principalmente por células musculares lisas, formando um componente ativo que regula a migração e proliferação celular (Wight, 1995). Em vasos coronários acometidos por aterosclerose, há uma alteração na distribuição e propriedades bioquímicas dos proteoglicanos (Kolodgie et al., 2002); possivelmente essas mudanças aumentam a afinidade dessas moléculas por LDL, exacerbando a retenção lipídica (Williams e Tabas, 1998).

No nosso modelo animal, os camundongos ApoE^{-/-} apresentaram nível aumentado de colesterol total, o qual apresenta uma porcentagem de LDL, as quais se associam aos GAGs administrados intravenosamente e, provavelmente, inibindo a migração e adesão de células no local da lesão.

Estudos indicam que a localização transiente de células-tronco em tecidos lesionados poderia ser suficiente para que eventos de regeneração se iniciem, sugerindo a liberação de mediadores parácrinos (Wollert e Drexler, 2005; Fiegel et al., 2006; Cantley, 2005). Inúmeros mecanismos envolvendo comunicações célula-célula foram identificados, como a secreção de fatores de crescimento, citocinas, receptores de membrana e nucleotídeos (Levine, 2004; Lucas et al., 2001; Albi e Viola Magni, 2004; Taback e Hoon, 2004). A hipótese de que microvesículas liberadas a partir das células apresentam um importante função na comunicação célula-célula (Janowska-Wieczorek et al., 2001; Baj-Krzyworzeka et al., 2002; Morel et al., 2004; Christian, 2002). Deregibus e colaboradores (2007) mostraram que microvesículas derivadas de CPE são capazes de promover a angiogênese em cultura e *in vivo* através da transferência horizontal de RNAm para células endoteliais vasculares humanas.

A relevância e severidade de doenças cardiovasculares associadas com redução da biodisponibilidade de NO tem resultado em esforços para se reverter esse quadro e

conservar a sinalização adequada de NO no coração e vasos sanguíneos através de intervenções terapêuticas. No sistema cardiovascular, a molécula de sinalização NO, a qual é produzida por eNOS tem função crucial na manutenção da função vascular normal, mediada por capacidade de vasodilatação e inúmeros efeitos anti-aterogênicos (Zhang et al., 2011). Nosso ensaio demonstrou que terapias utilizando MNC ou EPC DS em animais C57BL6 foram capazes em aumentar a concentração de eNOS no local da lesão e, conseqüentemente, reestabelecer função vascular normal. Nos animais ApoE^{-/-}, apenas o tratamento com CPE CSF foi capaz de alcançar tal efeito.

A retenção subendotelial de LDL é mediada através da interação dessa molécula com proteoglicanos da matriz extracelular (Tabas et al., 2007; Williams e Tabas, 1995). Uma das interações mais importantes ocorre entre o domínio positivo da apolipoproteína B com a região negativa composta de glicosaminoglicanos sulfatados nas cadeias de proteoglicanos (Williams, 2001; Khalil et al., 2004). Os animais ApoE^{-/-} apresentam inúmeros eventos aterogênicos similares aos que acometem os seres humanos como aumento da adesão de leucócitos às células endoteliais, formação de células espumosas e desenvolvimento de lesão fibróticas (Nakashima et al., 2007). A deleção do gene ApoE está associada com a acumulação de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDLs) e quilomicrons contendo apoB48, ao invés de apo100, os quais interagem com proteoglicanos por uma via alternativa (Flood et al., 2002).

O aumento da retenção de VLDLs e quilomicrons no espaço subendotelial de camundongos ApoE^{-/-} pode ocasionar uma exacerbação da inflamação local através do aumento de células espumosas, as quais liberam inúmeras moléculas relacionadas a inflamação; isso pode explicar o fato de nossos tratamentos, apesar de utilizarem moléculas anti-coagulantes e anti-inflamatórias, não conseguirem inibir a resposta inflamatória após lesão arterial. O DS presente nos vasos sanguíneos se localiza na camada adventícia (He et al., 2008) e a injeção de DS exógeno pode acarretar um aumento desse GAG na parede vascular, aumentando a retenção de VLDLs e quilomícrons em camadas subendoteliais do vaso.

A hipercolesterolemia tem sido extensamente identificada como um fator de risco para a aterosclerose, entretanto, sua influência na reendotelização após injúria arterial

permanece incerta. Li et al. (2009) mostraram que o aumento da expressão de VEGF dependente da presença de colesterol e poderia explicar a grande proliferação de CPE observada quando em altos níveis de colesterol; as CPE de camundongos ApoE^{-/-} foram cultivadas em concentrações de colesterol e analisadas por ensaio de MTS (ensaio de proliferação celular). A secreção de VEGF e outros fatores de crescimento pelas CPE podem favorecer a angiogênese em tecidos isquêmicos por promover a proliferação e migração de células endoteliais locais (Ii et al, 2005; Losordo e Dimmeler, 2004; Urbich et al., 2005); esse efeito parácrino poderia contribuir para a reendotelização em resposta a injúria arterial. Entretanto, VEGF tem sido associado a formação de lesão e progressão da aterosclerose (Celletti et al., 2001; Inoue et al., 1998).

A utilização de tratamentos que promovam a migração e diferenciação de células progenitoras endoteliais para o local da lesão arterial tem sido objeto de muitos estudos atualmente. Os mecanismos que promovem a adesão das CPE ao local da lesão arterial ainda não estão bem estabelecidos. No entanto observamos no nosso trabalho, que o tratamento com as CPE associado ao DS ou ao CSF não inibe a expressão de P-selectina e I-CAM no primeiro dia o que pode estar diretamente relacionado com um aumento do processo inflamatório iniciado pela lesão arterial, mas podemos inferir que estes aumentos possam estar relacionados também com a adesão das CPE ao local da lesão arterial influenciando diretamente no homing e na re-endotelização dos vasos após a lesão.

VIII. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS

- 1- O dermatan sulfato inibiu a reação inflamatória pela diminuição da expressão de moléculas de adesão e aumentou a migração de CPE para o local da lesão através do aumento de SDF-1. Com isso, o dermatan sulfato pode ser utilizado como um medicamento anti-inflamatório na resposta aguda à lesão.
- 2- O dermatan sulfato se mostrou também ser um agente antitrombótico, diminuindo a formação de trombo nos primeiros 3 dias após a lesão. Ele também pode ser um substituto à atual terapia com heparina com a vantagem de não provocar possíveis hemorragias.
- 3- O condroitin sulfato fucosilado aumentou o tempo de sangramento e não foi capaz de diminuir a formação de trombo, aumentando a área da camada média dos vasos sanguíneos.
- 4- A terapia celular, feita com células provenientes da medula óssea e cultivadas em meio EGM-2, se mostrou efetiva nos camundongos C57BL6 (tanto isoladamente como em combinação com o dermatan sulfato), diminuindo a inflamação e aumentando a expressão de eNOS sugerindo que essas células possam estar participando de uma possível recuperação endotelial.
- 5- O tratamento com MNC aumentam a inflamação mesmo na presença de DS ou CSF e não foi eficaz na recuperação da expressão de eNOS.
- 6- Tanto o DS como o CSF foram capazes de mobilizar uma maior quantidade de células (CPE) para o local da lesão em camundongos C57BL6, sugerindo um papel de quimioatração desses GAGs.
- 7- A migração de células (MNC ou CPE) é diminuída em camundongos ApoE^{-/-} devido à retenção de lipoproteínas pelas moléculas de glicosaminoglicanos (DS ou CSF).
- 8- Tratamento com CSF na presença ou ausência de células foi capaz de diminuir a expressão de ICAM-1 em camundongos ApoE^{-/-}, provavelmente dificultando a transmigração de células para o espaço subendotelial.
- 9- O tratamento com CPE CSF foi capaz de promover a recuperação da expressão de eNOS em camundongos ApoE^{-/-}.

IX. CONCLUSÃO

Este estudo forneceu evidências de que o dermatan sulfato pode ser utilizado como um anti-inflamatório e preventivo da formação de trombose após a lesão arterial. Observamos também que a terapia celular utilizada em conjunto com DS foi capaz de melhorar o quadro inflamatório e, ao mesmo tempo, melhorar o tônus vascular em camundongos C57BL6. Nos animais ApoE^{-/-}, o DS foi capaz de diminuir a formação de trombo bem como o CSF mas a migração das células se mostrou inibida provavelmente pela retenção de lipoproteínas pelos GAGs; o tratamento com CPE CSF se mostrou eficaz em diminuir a transmigração celular, ao mesmo tempo, em que melhorou o tônus vascular.

X. BIBLIOGRAFIA

ABBOTT, J. D. et al. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. **Circulation**, v. 110, n. 21, p. 3300-5, Nov 2004.

ASAHARA, T. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**, v. 275, n. 5302, p. 964-967, FEB 14 1997.

ASKARI, A. T.; PENN, M. S. Stromal cell-derived factor-1 mediates stem cell homing and tissue regeneration. **Discov Med**, v. 3, n. 18, p. 46-7, Oct 2003.

BASTOS, M. F. et al. Fucosylated chondroitin sulfate inhibits Plasmodium falciparum cytoadhesion and merozoite invasion. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 4, p. 1862-71, 2014.

BATISTATOU, A. et al. Expression patterns of dysadherin and E-cadherin in lymph node metastases of colorectal carcinoma. **Virchows Arch**, v. 448, n. 6, p. 763-7, Jun 2006.

BELMIRO, C. et al. Unfractionated heparin and new heparin analogues from ascidians (chordate-tunicate) ameliorate colitis in rats. **J Biol Chem**, v. 284, n. 17, p. 11267-78, Apr 2009.

BELMIRO, C. L. et al. Dermatan sulfate reduces monocyte chemoattractant protein 1 and TGF- β production, as well as macrophage recruitment and myofibroblast accumulation in mice with unilateral ureteral obstruction. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 7, p. 624-33, Jul 2011.

BORDER, W. A.; NOBLE, N. A. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. **N Engl J Med**, v. 331, n. 19, p. 1286-92, Nov 1994.

BORSIG, L. et al. Selectin blocking activity of a fucosylated chondroitin sulfate glycosaminoglycan from sea cucumber - Effect on tumor metastasis and neutrophil recruitment. **Journal of Biological Chemistry**, p. 14984-14991, MAY 18 2007.

BOUVY, C. et al. Contributing role of extracellular vesicles on vascular endothelium haemostatic balance in cancer. **J Extracell Vesicles**, v. 3, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 1976.

BROZE, G. J.; YIN, Z. F.; LASKY, N. A tail vein bleeding time model and delayed bleeding in hemophilic mice. **Thromb Haemost**, v. 85, n. 4, p. 747-8, Apr 2001.

BUTENAS, S.; ORFEO, T.; MANN, K. G. Tissue factor in coagulation: Which? Where? When? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, n. 12, p. 1989-96, Dec 2009.

CAYATTE, A. J. et al. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. **Arterioscler Thromb**, v. 14, n. 5, p. 753-9, May 1994.

CELLETTI, F. L. et al. Effect of human recombinant vascular endothelial growth factor165 on progression of atherosclerotic plaque. **J Am Coll Cardiol**, v. 37, n. 8, p. 2126-30, Jun 2001.

CERADINI, D. J. et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. **Nat Med**, v. 10, n. 8, p. 858-64, Aug 2004.

CHEN, G. et al. Expression of cyclooxygenase-2 in rat vascular smooth muscle cells is unrelated to nuclear factor-kappaB activation. **Life Sci**, v. 64, n. 14, p. 1231-42, 1999.

CHEN, R.; XUE, J.; XIE, M. Osthole regulates TGF- β 1 and MMP-2/9 expressions via activation of PPAR α/γ in cultured mouse cardiac fibroblasts stimulated with angiotensin II. **J Pharm Pharm Sci**, v. 16, n. 5, p. 732-41, 2013.

COLDITZ, I. G. et al. Chemokines at large: in-vivo mechanisms of their transport, presentation and clearance. **Thromb Haemost**, v. 97, n. 5, p. 688-93, May 2007.

DAHLBÄCK, B. Blood coagulation. **Lancet**, v. 355, n. 9215, p. 1627-32, May 2000.

DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P.; RABELINK, T. J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation**, v. 115, n. 10, p. 1285-95, Mar 2007.

DONAHUE, M. et al. Endothelial progenitor cells in coronary artery disease. **Biol Chem**, v.394, n. 10, p. 1241-52, Oct 2013.

ESMON, C. T.; ESMON, N. L. The link between vascular features and thrombosis. **Annu Ver Physiol**, v. 73, p. 503-14, 2011.

FAROOQ, V.; GOGAS, B. D.; SERRUYS, P. W. Restenosis: delineating the numerous causes of drug-eluting stent restenosis. **Circ Cardiovasc Interv**, v. 4, n. 2, p. 195-205, Apr 2011.

FELDMAN, L. J. et al. Interleukin-10 inhibits intimal hyperplasia after angioplasty or stent implantation in hypercholesterolemic rabbits. **Circulation**, v. 101, n. 8, p. 908-16, Feb 2000.

FERNANDIS, A. Z. et al. Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells. **Oncogene**, v. 23, n. 1, p. 157-67, Jan 2004.

FIEDLER, U. et al. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. **Blood**, v. 103, n. 11, p. 4150-6, Jun 2004.

FLOOD, C. et al. Identification of the proteoglycan binding site in apolipoprotein B48. **J Biol Chem**, v. 277, n. 35, p. 32228-33, Aug 2002.

FUJITA, M. et al. Pulmonary hypertension in TNF-alpha-overexpressing mice is associated with decreased VEGF gene expression. **J Appl Physiol**, v. 93, n. 6, p. 2162-70, Dec 2002.

FUNK, C. D.; FITZGERALD, G. A. COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 50, n. 5, p. 470-9, Nov 2007.

FÖRSTERMANN, U. Biochemistry and molecular biology of nitric oxide synthases. **Arzneimittelforschung**, v. 44, n. 3A, p. 402-7, Mar 1994.

FÖRSTERMANN, U. et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**, v. 23, n. 6 Pt 2, p. 1121-31, Jun 1994.

GALKINA, E.; LEY, K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 165-97, 2009.

GEHLING, U. et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. **Blood**, v. 95, n. 10, p. 3106-3112, MAY 15 2000.

GHADGE, S. K. et al. SDF-1 α as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction. **Pharmacol Ther**, v. 129, n. 1, p. 97-108, Jan 2011.

GHOSH, J. et al. The role of transforming growth factor beta1 in the vascular system. **Cardiovasc Pathol**, v. 14, n. 1, p. 28-36, 2005 Jan-Feb 2005.

GILL, M. et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. **Circulation Research**, p. 167-174, FEB 2 2001.

GLAUSER, B. F. et al. Serpin-independent anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate. **Thromb Haemost**, v. 100, n. 3, p. 420-8, Sep 2008.

GODOY, J. A. et al. Dermatan sulfate and bone marrow mononuclear cells used as a new therapeutic strategy after arterial injury in mice. **Cytotherapy**, v. 13, n. 6, p. 695-704, Jul 2011.

GRUNDY, S. et al. Definition of metabolic syndrome - Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, p. E13-E18, FEB 2004.

GUNNETT, C. A. et al. IL-10 deficiency increases superoxide and endothelial dysfunction during inflammation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 279, n. 4, p. H1555-62, Oct 2000.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N Engl J Med**, v. 352, n. 16, p. 1685-95, Apr 2005.

HAVEL, R. Biology of cholesterol, lipoproteins and atherosclerosis. **Clin Exp Hypertens A**, v. 11, n. 5-6, p. 887-900, 1989.

HE, L. et al. Vascular dermatan sulfate regulates the antithrombotic activity of heparin cofactor II. **Blood**, p. 4118-4125, APR 15 2008.

HEALY, L. et al. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 26, p. 12240-4, Dec 1995.

HO, T. K. et al. Stromal-Cell-Derived Factor-1 (SDF-1)/CXCL12 as Potential Target of Therapeutic Angiogenesis in Critical Leg Ischaemia. **Cardiol Res Pract**, v. 2012, p. 143209, 2012.

HOGG, N. et al. Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. **Immunol Rev**, v. 186, p. 164-71, Aug 2002.

HRISTOV, M.; ERL, W.; WEBER, P. Endothelial progenitor cells - mobilization, differentiation, and homing. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 23, n. 7, p. 1185-1189, JUL 2003.

HUA, S. Targeting sites of inflammation: intercellular adhesion molecule-1 as a target for novel inflammatory therapies. **Front Pharmacol**, v. 4, p. 127, 2013.

HUANG, A. et al. Contribution of 20-HETE to augmented myogenic constriction in coronary arteries of endothelial NO synthase knockout mice. **Hypertension**, v. 46, n. 3, p. 607-13, Sep 2005.

HUBBARD, A. K.; ROTHLEIN, R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. **Free Radic Biol Med**, v. 28, n. 9, p. 1379-86, May 2000.

HUBER, D. et al. Tissue-type plasminogen activator (t-PA) is stored in Weibel-Palade bodies in human endothelial cells both in vitro and in vivo. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3637-45, May 2002.

INOUE, M. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. **Circulation**, v. 98, n. 20, p. 2108-16, Nov 1998.

INSULL, W. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. **Am J Med**, v. 122, n. 1 Suppl, p. S3-S14, Jan 2009.

JAITOVICH, A.; JAIM ETCHEVERRY, G. Adhesion molecules. Their role in cardiovascular physiopathology. **Medicina (B Aires)**, v. 64, n. 5, p. 455-62, 2004.

JANOWSKA-WIECZOREK, A. et al. Differential MMP and TIMP production by human marrow and peripheral blood CD34(+) cells in response to chemokines. **Exp Hematol**, v. 28, n. 11, p. 1274-85, Nov 2000.

KAUSER, K. et al. Role of endogenous nitric oxide in progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 278, n. 5, p. H1679-85, May 2000.

KHALIL, M. F.; WAGNER, W. D.; GOLDBERG, I. J. Molecular interactions leading to lipoprotein retention and the initiation of atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 12, p. 2211-8, Dec 2004.

KHOKHA, R.; MURTHY, A.; WEISS, A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 9, p. 649-65, Sep 2013.

KIETADISORN, R.; JUNI, R. P.; MOENS, A. L. Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 302, n. 5, p. E481-95, Mar 2012.

KIM, M. S.; DEAN, L. S. In-stent restenosis. **Cardiovasc Ther**, v. 29, n. 3, p. 190-8, Jun 2011.

KLYACHKIN, Y. M. et al. The role of bioactive lipids in stem cell mobilization and homing: novel therapeutics for myocardial ischemia. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 653543, 2014.

KOBAYASHI, T. et al. The tetraspanin CD63/lamp3 cycles between endocytic and secretory compartments in human endothelial cells. **Mol Biol Cell**, v. 11, n. 5, p. 1829-43, May 2000.

KOZLOWSKI, E. O.; PAVAO, M. S.; BORSIG, L. Ascidian dermatan sulfates attenuate metastasis, inflammation and thrombosis by inhibition of P-selectin. **J Thromb Haemost**, v.9, n. 9, p. 1807-15, Sep 2011.

KRIEGLSTEIN, C. F.; GRANGER, D. N. Adhesion molecules and their role in vascular disease. **Am J Hypertens**, v. 14, n. 6 Pt 2, p. 44S-54S, Jun 2001.

KUCIA, M. et al. Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. **Blood Cells Mol Dis**, v. 32, n. 1, p. 52-7, 2004 Jan-Feb 2004.

KUHLENCORDT, P. J. et al. Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice. **Circulation**, v. 103, n. 25, p. 3099-104, Jun 2001.

LACAUD, G. et al. Haploinsufficiency of Runx1 results in the acceleration of mesodermal development and hemangioblast specification upon in vitro differentiation of ES cells. **Blood**, v. 103, n. 3, p. 886-889, FEB 1 2004.

LAMALICE, L.; LE BOEUF, F.; HUOT, J. Endothelial cell migration during angiogenesis. **Circ Res**, v. 100, n. 6, p. 782-94, Mar 2007.

LI, W. et al. Growth factors enhance endothelial progenitor cell proliferation under high glucose conditions. **Med Sci Monit**, v. 15, n. 12, p. BR357-63, Dec 2009.

LI, X. et al. Revascularization of ischemic tissues by PDGF-CC via effects on endothelial cells and their progenitors. **J Clin Invest**, v. 115, n. 1, p. 118-27, Jan 2005.

LIBBY, P. et al. A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression. **Circulation**, v. 86, n. 6 Suppl, p. III47-52, Dec 1992.

LIBBY, P.; THEROUX, P. Pathophysiology of coronary artery disease. **Circulation**, v. 111, n. 25, p. 3481-3488, JUN 28 2005.

LOSORDO, D. W.; DIMMELER, S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part I: angiogenic cytokines. **Circulation**, v. 109, n. 21, p. 2487-91, Jun 2004.

MACLELLAN, W. R.; BRAND, T.; SCHNEIDER, M. D. Transforming growth factor-beta in cardiac ontogeny and adaptation. **Circ Res**, v. 73, n. 5, p. 783-91, Nov 1993.

MARTORELL, L. et al. Vascular effects of thrombin: involvement of NOR-1 in thrombin induced mitogenic stimulus in vascular cells. **Front Biosci**, v. 13, p. 2909-15, 2008.

MCEVER, R. P. et al. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. **J Clin Invest**, v. 84, n. 1, p. 92-9, Jul 1989.

MIRAGLIA, S. et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: Isolation, characterization, and molecular cloning. **Blood**, p. 5013-5021, DEC 15 1997.

MIYAMOTO, M. et al. TRA-418, a thromboxane A2 receptor antagonist and prostacyclin receptor agonist, inhibits platelet-leukocyte interaction in human whole blood. **Thromb Haemost**, v. 104, n. 4, p. 788-95, Oct 2010.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Nitric oxide and the vascular endothelium. **Handb Exp Pharmacol**, n. 176 Pt 1, p. 213-54, 2006.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, p. 109-42, Jun 1991.

MOURAO, P. et al. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm - Sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 39, p. 23973-23984, SEP 27 1996.

MOURÃO, P. A. et al. Inactivation of thrombin by a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. **Thromb Res**, v. 102, n. 2, p. 167-76, Apr 2001.

_____. Antithrombotic activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm: sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action. **Br J Haematol**, v. 101, n. 4, p. 647-52, Jun 1998.

_____. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. Sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. **J Biol Chem**, v. 271, n. 39, p. 23973-84, Sep 1996.

MURDOCH, C.; MONK, P. N.; FINN, A. Cxc chemokine receptor expression on human endothelial cells. **Cytokine**, v. 11, n. 9, p. 704-12, Sep 1999.

MURPHY, G.; DOCHERTY, A. J. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 7, n. 2, p. 120-5, Aug 1992.

NAKASHIMA, Y. et al. Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 5, p. 1159-65, May 2007.

NICHOLS, M. et al. European cardiovascular disease statistics 2012. **European Heart Network**, Brussels, European Society of Cardiology, Sophia Antipolis, 2012.

NODA, K. et al. Leukocyte adhesion molecules in diabetic retinopathy. **J Ophthalmol**, v. 2012, p. 279037, 2012.

OZAKA, T. et al. Weibel-Palade bodies as a storage site of calcitonin gene-related peptide and endothelin-1 in blood vessels of the rat carotid body. **Anat Rec**, v. 247, n. 3, p. 388-94, Mar 1997.

PACHECO, R. et al. Different antithrombotic mechanisms among glycosaminoglycans revealed with a new fucosylated chondroitin sulfate from an echinoderm. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v. 11, n. 6, p. 563-573, SEP 2000.

PEICHEV, M. et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. **Blood**, v. 95, n. 3, p. 952-958, FEB 1 2000.

PENC, S. F. et al. Dermatan sulfate activates nuclear factor-kappaB and induces endothelial and circulating intercellular adhesion molecule-1. **J Clin Invest**, v. 103, n. 9, p. 1329-35, May 1999.

_____. Dermatan sulfate released after injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. **J Biol Chem**, v. 273, n. 43, p. 28116-21, Oct 1998.

PENDSE, A. et al. Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond. **Journal of Lipid Research**, p. S178-S182, APR 2009.

QUIRICI, N. et al. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. **British Journal of Haematology**, v. 115, n. 1, p. 186-194, OCT 2001.

RAJESH, M. et al. CB2 cannabinoid receptor agonists attenuate TNF-alpha-induced human vascular smooth muscle cell proliferation and migration. **Br J Pharmacol**, v. 153, n. 2, p. 347-57, Jan 2008.

RATAJCZAK, M. Z. et al. Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. **Stem Cells**, v. 21, n. 3, p. 363-71, 2003.

_____. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. **Leukemia**, v. 20, n. 11, p. 1915-24, Nov 2006.

RAUSCHER, F. et al. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. **Circulation**, p. 457-463, JUL 29 2003.

REINDERS, J. H. et al. Isolation of a storage and secretory organelle containing Von Willebrand protein from cultured human endothelial cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 804, n. 3, p. 361-9, Jul 1984.

REX, S. et al. Immune versus thrombotic stimulation of platelets differentially regulates signalling pathways, intracellular protein-protein interactions, and alpha-granule release. **Thromb Haemost**, v. 102, n. 1, p. 97-110, Jul 2009.

RHEE, S. G. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. **Science**, v. 312, n. 5782, p. 1882-3, Jun 2006.

RICKLES, F. R.; PATIERNO, S.; FERNANDEZ, P. M. Tissue factor, thrombin, and cancer. **Chest**, v. 124, n. 3 Suppl, p. 58S-68S, Sep 2003.

ROBERTS, N.; JAHANGIRI, M.; XU, Q. Progenitor cells in vascular disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 9, n. 3, p. 583-591, JUL-SEP 2005.

ROBERTSON, A. K. et al. Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis. **J Clin Invest**, v. 112, n. 9, p. 1342-50, Nov 2003.

ROJAS, A. I.; AHMED, A. R. Adhesion receptors in health and disease. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 10, n. 3, p. 337-58, 1999.

RONDAIJ, M. G. et al. Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 5, p. 1002-7, May 2006.

ROT, A.; VON ANDRIAN, U. H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 891-928, 2004.

ROY, S. et al. Role of PKC- α in NF- κ B-MT1-MMP-mediated activation of proMMP-2 by TNF- α in pulmonary artery smooth muscle cells. **J Biochem**, v. 153, n. 3, p. 289-302, Mar 2013.

RUIZ-ORTEGA, M. et al. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. **Cardiovasc Res**, v. 74, n. 2, p. 196-206, May 2007.

SCHNYDER-CANDRIAN, S. et al. Localization of alpha 1,3-fucosyltransferase VI in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 15, p. 8369-74, Jul 2000.

SCHUEPBACH, R. A. et al. Protection of vascular barrier integrity by activated protein C in murine models depends on protease-activated receptor-1. **Thromb Haemost**, v. 101, n. 4, p. 724-33, Apr 2009.

SHIBA, Y. et al. M-CSF accelerates neointimal formation in the early phase after vascular injury in mice: the critical role of the SDF-1-CXCR4 system. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 2, p. 283-9, Feb 2007.

SHINTANI, S. et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. **Circulation**, p. 2776-2779, JUN 12 2001.

SHIROZU, M. et al. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell derived factor 1 (SDF1) gene. **Genomics**, v. 28, n. 3, p. 495-500, Aug 1995.

SPRAGUE, A. H.; KHALIL, R. A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. **Biochem Pharmacol**, v. 78, n. 6, p. 539-52, Sep 2009.

STOLL, G.; KLEINSCHNITZ, C.; NIESWANDT, B. Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment. **Blood**, v. 112, n. 9, p. 3555-3562, NOV 1 2008.

SUMPIO, B. E.; RILEY, J. T.; DARDIK, A. Cells in focus: endothelial cell. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 34, n. 12, p. 1508-12, Dec 2002.

TABAS, I.; WILLIAMS, K. J.; BORÉN, J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. **Circulation**, v. 116, n. 16, p. 1832-44, Oct 2007.

TAILOR, A.; GRANGER, D. N. Role of adhesion molecules in vascular regulation and damage. **Curr Hypertens Rep**, v. 2, n. 1, p. 78-83, Feb 2000.

TAKAHASHI, N. et al. Vascular endothelial growth factor induces activation and subcellular translocation of focal adhesion kinase (p125FAK) in cultured rat cardiac myocytes. **Circ Res**, v. 84, n. 10, p. 1194-202, May 1999.

TANG, C. H. et al. Involvement of matrix metalloproteinase-9 in stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway of lung cancer metastasis. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 1, p. 35-43, Jan 2008.

TANG, Y. L. et al. Hypoxic preconditioning enhances the benefit of cardiac progenitor cell therapy for treatment of myocardial infarction by inducing CXCR4 expression. **Circ Res**, v.104, n. 10, p. 1209-16, May 2009.

TAPON-BRETAUDIÈRE, J. et al. A fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm modulates in vitro fibroblast growth factor 2-dependent angiogenesis. **Mol Cancer Res**, v. 1, n. 2, p. 96-102, Dec 2002.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. **Physiol Rev**, v. 86, n. 2, p. 515-81, Apr 2006.

THERUVATH, T. P.; JONES, J. A.; IKONOMIDIS, J. S. Matrix metalloproteinases and descending aortic aneurysms: parity, disparity, and switch. **J Card Surg**, v. 27, n. 1, p. 81-90, Jan 2012.

TOLLEFSEN, D. Heparin cofactor II modulates the response to vascular injury. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 27, n. 3, p. 454-460, MAR 2007.

TOVAR, A. M. et al. Dermatan sulfate is the predominant antithrombotic glycosaminoglycan in vessel walls: implications for a possible physiological function of heparin cofactor II. **Biochim Biophys Acta**, v. 1740, n. 1, p. 45-53, Apr 2005.

TROWBRIDGE, J.; GALLO, R. Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. **Glycobiology**, v. 12, n. 9, p. 117R-125R, SEP 2002.

URBICH, C. et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. **J Mol Cell Cardiol**, v. 39, n. 5, p.733-42, Nov 2005.

URBICH, C.; DIMMELER, S. Endothelial progenitor cells - Characterization and role in vascular biology. **Circulation Research**, v. 95, n. 4, p. 343-353, AUG 20 2004.

UTGAARD, J. O. et al. Rapid secretion of prestored interleukin 8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells. **J Exp Med**, v. 188, n. 9, p. 1751-6, Nov 1998.

VAJKOCZY, P. et al. Multistep nature of microvascular recruitment of Ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. **Journal of Experimental Medicine**, p. 1755-1765, JUN 16 2003.

VASA, M. et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. **Circulation**, p. 2885-2890, JUN 19 2001.

VERKLEIJ, C. J. et al. The role of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in diabetic wound healing. **Thromb Res**, v. 126, n. 5, p. 442-6, Nov 2010.

VICENTE, C. P. et al. Antithrombotic activity of dermatan sulfate in heparin cofactor II deficient mice. **Blood**, v. 104, n. 13, p. 3965-70, Dec 2004.

VICENTE, C. P.; HE, L.; TOLLEFSEN, D. M. Accelerated atherogenesis and neointima formation in heparin cofactor II deficient mice. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4261-7, Dec 2007.

WAGNER, D. D.; OLMSTED, J. B.; MARDER, V. J. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. **J Cell Biol**, v. 95, n. 1, p. 355-60, Oct 1982.

WALTER, D. H. et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. **Circulation**, v. 105, n. 25, p. 3017-24, Jun 2002.

WANG, M. et al. Matrix metalloproteinase 2 activation of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta1-type II receptor signaling within the aged arterial wall. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 7, p. 1503-9, Jul 2006.

WARD, M. et al. Tranilast prevents activation of transforming growth factor-beta system, leukocyte accumulation, and neointimal growth in porcine coronary arteries after stenting. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 22, n. 6, p. 940-948, JUN 2002.

WELT, F. G.; ROGERS, C. Inflammation and restenosis in the stent era. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 22, n. 11, p. 1769-76, Nov 2002.

WERNER, N. et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. **Circulation Research**, p. E17-E24, JUL 25 2003.

WERNER, N.; NICKENIG, G. Clinical and therapeutical implications of EPC biology in atherosclerosis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 318-332, APR-JUN 2006.

WERNER, N. et al. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation - Effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, p. 1567-1572, OCT 2002.

WILLIAMS, K. J. Interactions of lipoproteins with proteoglycans. **Methods Mol Biol**, v. 171, p. 457-77, 2001.

WILLIAMS, K. J.; TABAS, I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 15, n. 5, p. 551-61, May 1995.

WINCKERS, K.; TEN CATE, H.; HACKENG, T. M. The role of tissue factor pathway inhibitor in atherosclerosis and arterial thrombosis. **Blood Rev**, v. 27, n. 3, p. 119-32, May 2013.

YANCOPOULOS, G. et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 242-248, SEP 14 2000.

YIN, A. et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. **Blood**, p. 5002-5012, DEC 15 1997.

YONG, K.; KHWAJA, A. Leucocyte cellular adhesion molecules. **Blood Rev**, v. 4, n. 4, p. 211-25, Dec 1990.

YUAN, S. Y. et al. Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. **Microvasc Res**, v. 83, n. 1, p. 82-8, Jan 2012.

ZANNETTINO, A. C. et al. Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor. **J Cell Physiol**, v. 204, n. 2, p. 714-23, Aug 2005.

ZARUBA, M. M. et al. Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 4, p. 313-23, Apr 2009.

ZEMANI, F. et al. Ex vivo priming of endothelial progenitor cells with SDF-1 before transplantation could increase their proangiogenic potential. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 4, p. 644-50, Apr 2008.

ZHANG, Y. et al. Modulating endothelial nitric oxide synthase: a new cardiovascular therapeutic strategy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 301, n. 3, p. H634-46, Sep 2011.

ZIMMERMAN, G. A. Two by two: the pairings of P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 18, p. 10023-4, Aug 2001.

ZIMMERMAN, M. A. et al. Interleukin-10 attenuates the response to vascular injury. **J Surg Res**, v. 121, n. 2, p. 206-13, Oct 2004.

XI. COMITÊ DE ÉTICA

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada Influência dos glicosaminoglicanos e da terapia celular na inflamação após lesão arterial em camundongos:

() não se enquadra no § 4º do Artigo 1º da Informação CCPG 002/13, referente a bioética e biossegurança.

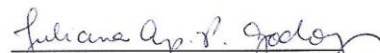
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

(X) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. 2009/05, Instituição: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 2265-1, Instituição: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição:

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Aluno: Juliana Aparecida Preto de Godoy


Orientador: Dra. Cristina Pontes Vicente

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido



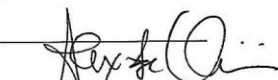
Carimbo e assinatura

Prof. Dra. HELENA COUTINHO FRANCO DE OLIVEIRA
Presidente
CIBio/IB-UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Prof. Dr. ALEXANDRE LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA
Presidente da Comissão de Ética no Uso de
Animais CEUA/UNICAMP

ANEXO 1

Expressão gênica de *p-selectina*, *icam-1*, *sdf-1*, *tgf-β*, *tnf-α* e *enos* nos camundongos C57BL6.

A fim de avaliar os níveis de RNAm de moléculas envolvidas na inflamação, homeostase e remodelamento vascular, artérias carótidas dos diferentes grupos de camundongos C57BL6 foram removidas e o RNA extraído.

Quando comparamos os diferentes tratamentos utilizados com o objetivo de avaliar a magnitude da inflamação, observamos que alguns tratamentos como DS ou CPE ou CPE DS ou CPE CSF apresentaram uma maior expressão de P-selectina no dia 1 após a intervenção cirúrgica (Figura 1A); esse aumento se mantém nos grupos DS ou CSF no dia 3 (Figura 1B).

A análise da expressão de ICAM-1, molécula também envolvida na inflamação, revelou uma expressão gênica aumentada no primeiro dia após a lesão arterial nos grupos que foram tratados com DS ou CSF ou CPE ou CPE CSF (Figura 1C); tal aumento foi observado em quase todos os grupos no terceiro dia, exceto o grupo de animais que receberam injeções de CPE (Figura 1D).

A análise da expressão gênica de SDF-1, molécula envolvida na mobilização de células-tronco da medula óssea para o sangue circulante, mostrou aumento na quantidade de RNAm desse fator 1 dia após a injúria vascular em camundongos tratados com DS ou MNC ou MNC DS ou MNC CSF em relação ao grupo lesionado (Figura 2A). No terceiro dia após a lesão, o grupo tratado com DS manteve a expressão de SDF-1 alta, bem como os animais tratados com CSF ou CPE DS ou CPE CSF (Figura 2B).

Citocinas envolvidas em respostas sistêmicas, como o TNF- α , e as envolvidas na produção de colágeno por células musculares lisas e fibroblastos, como o TGF- β , foram analisadas quanto à presença de RNAm e a influência dos diferentes tratamentos nessa expressão.

O TGF- β apresenta uma expressão gênica aumentada nos animais que receberam tratamentos como MNC ou MNC CSF ou CPE no primeiro dia após a injúria arterial

(Figura 3A); essa superexpressão foi também observada em animais tratados com CSF ou CPE ou CPE DS ou CPE CSF no terceiro dia após a lesão (Figura 31B). Os demais grupos ou apresentaram semelhança com o grupo controle ou apresentaram expressão diminuída desse gene (Figuras 3A e B).

O TNF- α está superexpresso em quase todos os grupos no dia 1 após a lesão arterial (DS ou CSF ou MNC ou MNC DS ou MNC CSF ou CPE) exceto nos grupos tratados com CPE DS ou CPE CSF, os quais tiveram essa expressão diminuída (Figura 3C). Já no terceiro dia após a intervenção cirúrgica, terapias utilizando DS ou MNC ou CPE aumentaram a expressão gênica de TNF- α (Figura 3D) enquanto que animais que receberam tratamento utilizando CSF ou MNC DS ou CPE DS apresentaram diminuição na expressão desse gene (Figura 3D).

O eNOS está envolvida no tônus vascular, bem como em manter o endotélio não adesivo para leucócitos, inibindo também a agregação plaquetária. A análise da expressão gênica pode nos indicar se algum dos tratamentos utilizados em nosso estudo está modulando o local da lesão de modo a se recuperar a homeostasia.

No primeiro dia após a lesão arterial, todos os grupos apresentaram expressão gênica aumentada de eNOS (Figura 4A) quando comparado com o grupo não lesionado (artérias carótidas intactas); tal efeito pode estar relacionado com a tentativa do organismo em evitar uma lesão drástica no local onde ocorreu a injúria. Tal efeito é observado no terceiro dia após a lesão apenas nos grupos tratados com DS ou CSF ou MNC DS ou CPE (Figura 4B).

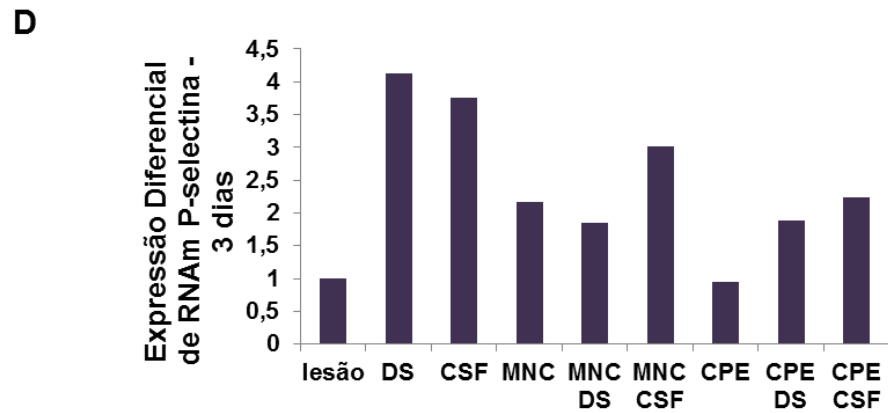
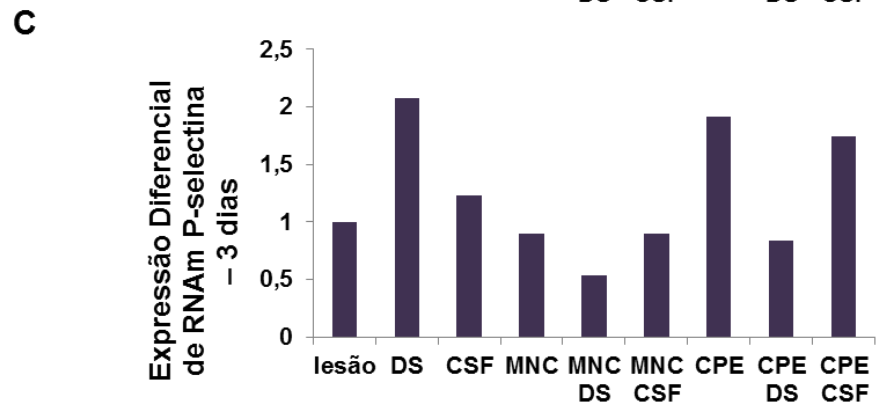
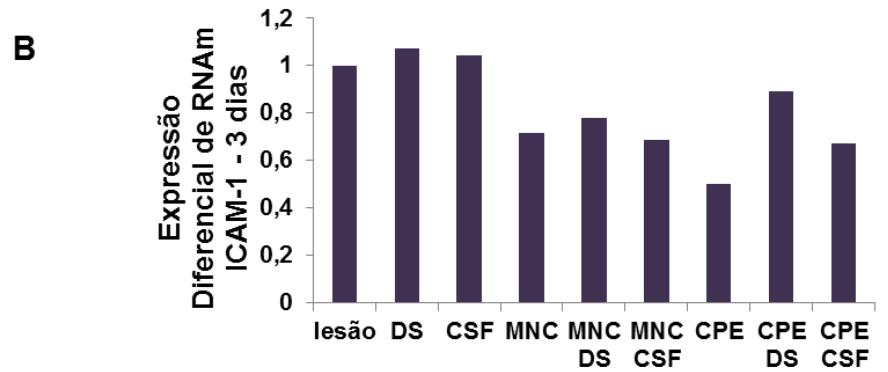
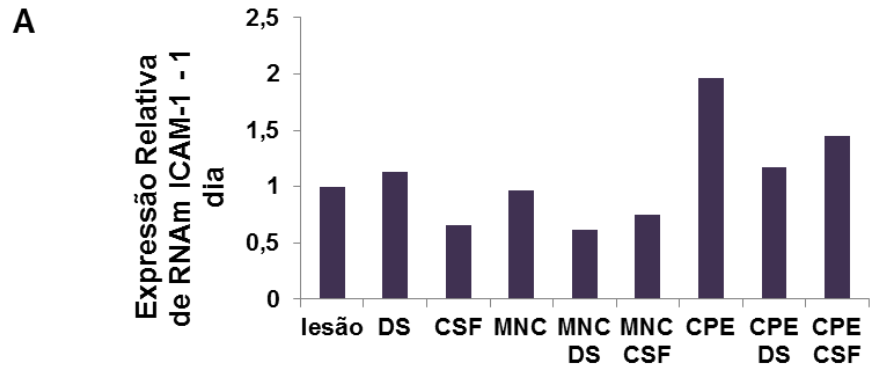


Figura 1. Expressão gênica de *p-selectina* e *icam-1* normalizada por *36b4*. (A) Expressão gênica de *p-selectina* 1 dia após a lesão arterial. (B) Expressão gênica de *p-selectina* 3 dias após a lesão arterial. (C) Expressão gênica de *icam-1* 1 dia após a lesão arterial. (D) Expressão gênica de *icam-1* 3 dias após a lesão arterial.

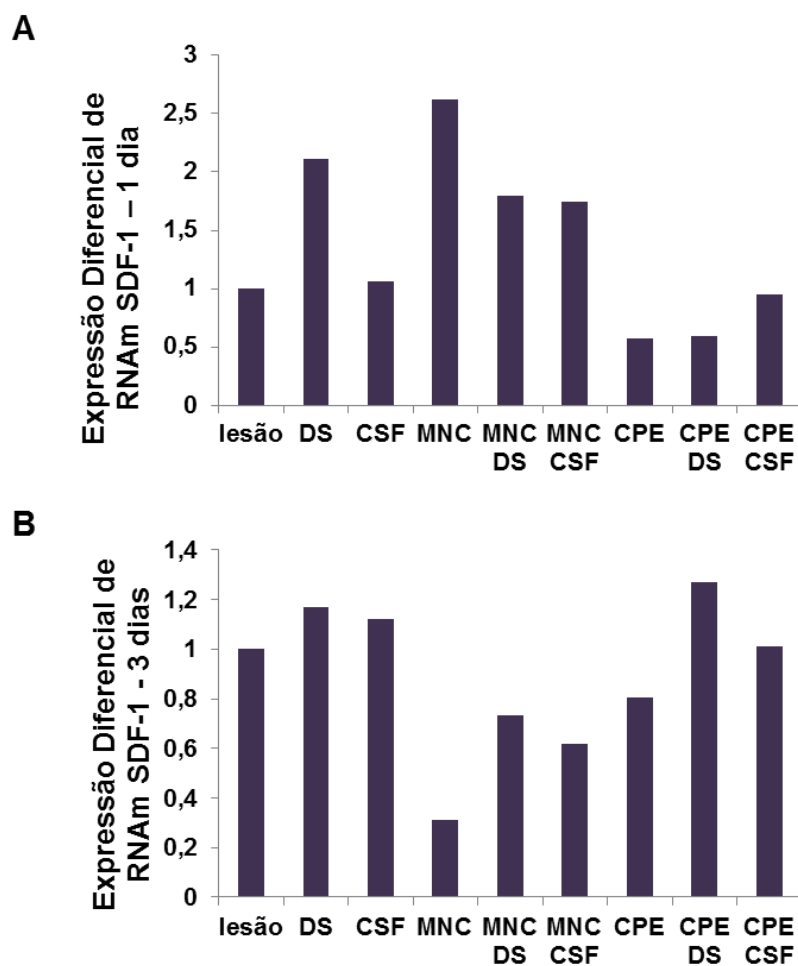


Figura 2. Expressão gênica de *sdf-1* normalizada por *36b4*. (A) Expressão gênica de *sdf-1* 1 dia após a lesão arterial. (B) Expressão gênica de *sdf-1* 3 dias após a lesão arterial.

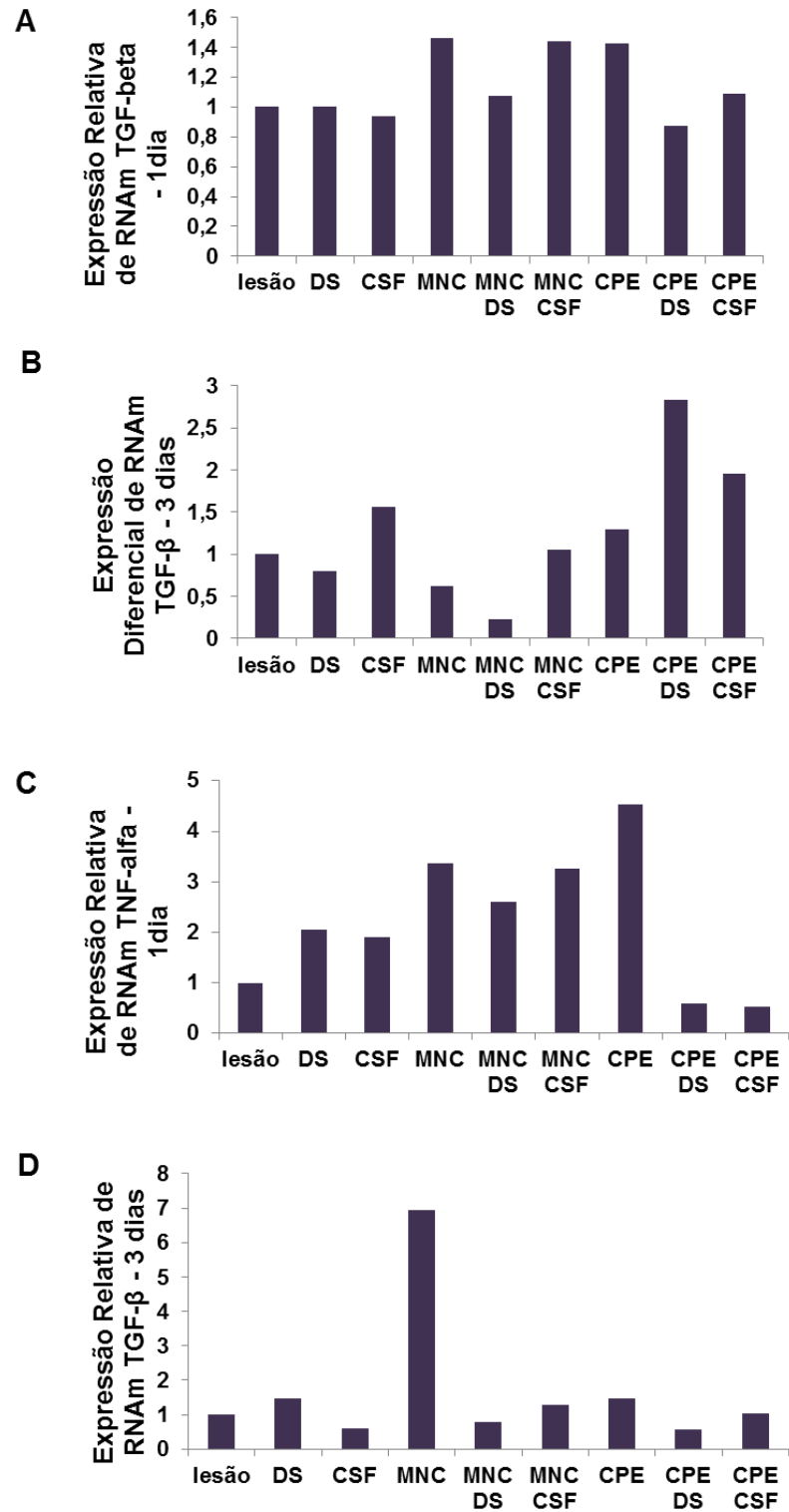


Figura 3. Expressão gênica de *tgf-β* e *tnf-α* normalizada por *36b4*. (A) Expressão gênica de *tgf-β* 1 dia após a lesão arterial. (B) Expressão gênica de *tgf-β* 3 dias após a lesão

arterial. (C) Expressão gênica de *tnf-α* 1 dia após a lesão arterial. (D) Expressão gênica de *tnf-α* 3 dias após a lesão arterial.

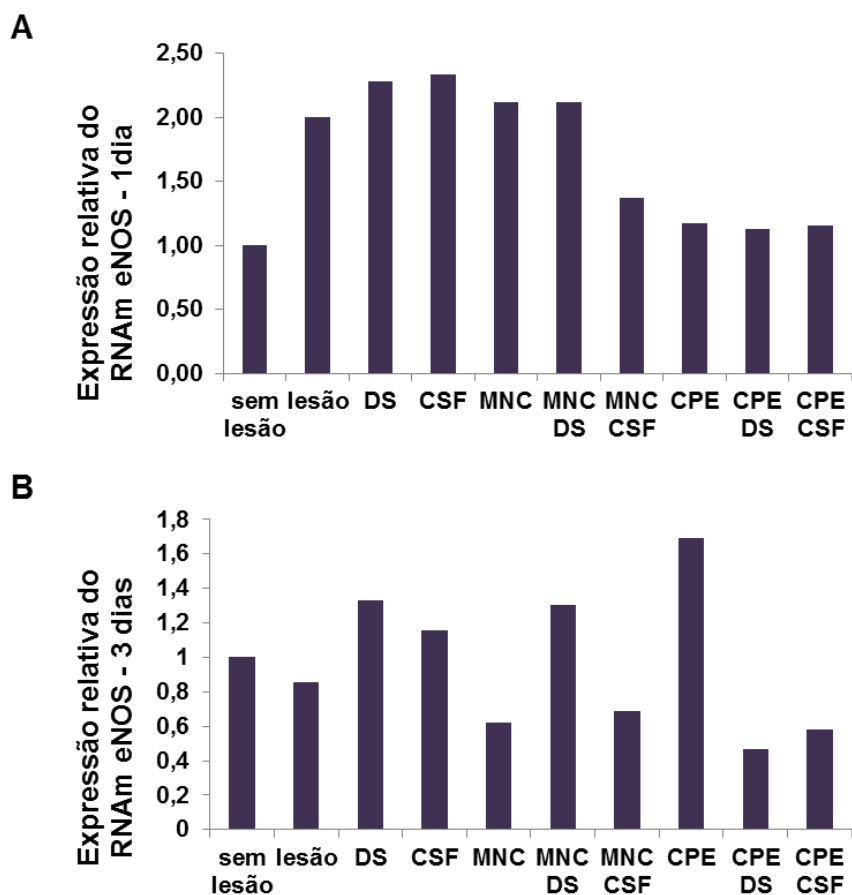


Figura 4. Expressão gênica de *enos* normalizada por *36b4*. (A) Expressão gênica de *enos* 1 dia após a lesão arterial. (B) Expressão gênica de *enos* 3 dias após a lesão arterial.