

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



Juliana Aparecida Preto de Godoy

**“EFEITO DO DERMATAN SULFATO NA INFLAMAÇÃO,
TROMBOSE, FORMAÇÃO DE NEOINTIMA E MIGRAÇÃO
DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA APÓS LESÃO
ARTERIAL EM CAMUNDONGOS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Juliana Aparecida Preto
de Godoy
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Histologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

G548e

Godoy, Juliana Aparecida Preto de
Efeito do dermatan sulfato na inflamação, trombose,
formação de neoíntima e migração das células da medula
óssea após lesão arterial em camundongos / Juliana
Aparecida Preto de Godoy. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadora: Cristina Pontes Vicente.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Sulfato de Dermatana. 2. Neoíntima. 3.
Inflamação. 4. Células da medula óssea. 5. Trombose.
I. Vicente, Cristina Pontes. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Effect of dermatan sulfate on inflammation, thrombosis, neointima formation and bone marrow cells migration after arterial injury in mice.

Palavras-chave em inglês: Dermatan sulfate; Neointima; Inflammation; Bone marrow cells; Thrombosis.

Área de concentração: Histologia.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Cristina Pontes Vicente, Mauro Sérgio Gonçalves Pavão, Joyce Maria Annichino-Bizzacchi.

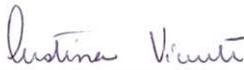
Data da defesa: 17/03/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

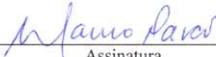
Campinas, 17 de março de 2010

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Mauro Sérgio Gonçalves Pavão


Assinatura

Profa. Dra. Joyce Maria Annichino Bizzacchi


Assinatura

Prof. Dr. Fábio Trindade Maranhão Costa

Assinatura

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Assinatura

Dedico

*À minha Família,
MEU PORTO SEGURO...*

A vida é muitas vezes frágil como espuma e bolhas, mas algumas coisas permanecem íntactas: a bondade perante o problemas dos outros e a coragem perante os seus. (Princesa Diana)

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota. (Madre Teresa de Calcutá)

Se você quer ser bem sucedido, precisa ter dedicação total, buscar seu último limite e dar o melhor de si. (Ayrton Senna)

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus por me dar força e determinação durante essa caminhada. Por me acalantar quando tudo parecia perdido. (Quando a noite esconde a luz, Deus acende as estrelas - Fabio de Melo).

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 principalmente profissional, mas também pessoal.

Aos Professores: Dr. Fabio Trindade da Costa Maranhão, Dr. Edson Rosa Pimentel e Dr. Mauro Sergio Gonçalves Pavão pelo cuidado e atenção na análise prévia da tese e pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Cláudio Werneck pela atenção dispensada e sugestões durante o aprimoramento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural e a todos seus docentes, os quais batalham muito 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 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES/Proex pelo imprescindível suporte financeiro.

A minha super equipe de trabalho, Giane, Daniel, Flavio e Paty. Obrigada por me entenderem nesses tempos de finalização de tese, sei que estava com a tolerância Zero... rsrs.... Prometo que essa fase acaba de acabar.

Aos colegas de trabalho: Ju Nascimento, Maria, Débora, Cíntia, Daniel, Alessandra, Taize, Rafaela, Augusto, Alexandre, Andrea, Fabricia, Ju Monteiro, Pedro, Tati, Fred, Guilherme, Marcos (2...rsrs), Cris e todos os que ali passaram durante esses anos.

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

Aos meus amigos, Danilo e Rony, 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!

Às minhas amigas de faculdade, Tassi, Tatão e Gi (amiga de pós também...rsrs) por estarem sempre presentes, torcendo por mim e por entenderem minha ausência em determinadas ocasiões.

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!!!

A minha nova amiga, Gisele, pelos almoços, cafés e jantares, pelas risadas, por estar sempre presente. Por me fazer companhia quando saía tarde da Unicamp. Obrigada!!!

Ao novo amigo, Stênio, pelas palhaçadas, torcida (recíproca, afinal estamos no mesmo barco) e pela presença, SEMPRE!

Aos meus pais, Flavio 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, pelas conversas sobre o futuro que se estende à nossa frente e pela torcida mútua. Te amo!

A meus primos, Dedé e Sandro, pela enorme torcida e por acreditarem tanto em mim e no meu trabalho. Bruna, obrigada pelas conversas e por me entender. Tici, obrigada pelas festas, me ajudaram muito a refrescar a cuca e seguir adiante.

Ao meu tio Chinês e meu avô Mário (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.

Aos meus familiares, de um modo geral, pela presença e pelo enorme torcida.

Obrigada por entenderem certas ausências.

Ao Marcio, uma pessoa muito especial, por me fazer enxergar ainda mais a importância do meu trabalho e pela torcida, mesmo longe. Pelo exemplo de profissional e, principalmente, pelo exemplo de ser humano. Te admiro demais!

E te amo mais ainda!

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

SUMÁRIO

I – LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
II – RESUMO.....	12
III – ABSTRACT.....	14
IV – INTRODUÇÃO.....	16
1. Células Progenitoras Endoteliais.....	21
2. Dermatan Sulfato.....	25
3. Cofator II da Heparina.....	26
4. Apolipoproteína E.....	28
V – OBJETIVO.....	32
VI – MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
VII – RESULTADOS.....	39
VIII – DISCUSSÃO.....	63
IX – RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS.....	68
X – CONCLUSÕES.....	69
XI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
XII – DECLARAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA.....	82

I. LISTA DE ABREVIATURAS

ApoE – apolipoproteína E

CPE – células progenitoras endoteliais

DS – dermatan sulfato

G-CSF – fator estimulante de colônia granulocítica

HCII – cofator II da heparina

HDL – lipoproteína de alta densidade

LDL – lipoproteína de baixa densidade

MNC – células mononucleares

PAR – receptor protease ativo

VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular

VEGFR2 – receptor para o fator de crescimento do endotélio vascular – 2

VLDL – lipoproteína de densidade muito baixa

II. RESUMO

O dermatan sulfato (DS) é um glicosaminoglicano que pode atuar como um agente antitrombótico, anticoagulante e anti-inflamatório. A aterosclerose é uma doença que acomete os vasos sanguíneos através da formação exacerbada de placas de gordura, interrompendo o fluxo de sangue. A intervenção cirúrgica mais utilizada nesses casos é a angioplastia, entretanto, esse procedimento pode ocasionar uma lesão ao endotélio, onde células e proteínas inflamatórias são recrutadas ao local da lesão, promovendo a migração e proliferação das células musculares lisas ocasionando a reestenose (neointima) do vaso acometido. A recuperação do endotélio, momentos após a lesão, seria uma alternativa terapêutica com o objetivo de se evitar a formação de neointima. Essa recuperação poderia ser feita pelas células progenitoras endoteliais (EPC), existentes na população de células mononucleares (MNC), da medula óssea. Neste estudo, testamos o efeito do DS na inflamação, trombose, formação de neointima e migração de MNC em camundongos selvagens (C57BL06), testamos também o efeito do DS em conjunto com a administração de MNC na formação de neointima em camundongos selvagens, deficientes da proteína cofator II da heparina (HCII^{-/-}) e deficientes em apolipoproteína E (ApoE^{-/-}). Todos os animais analisados passaram por um procedimento cirúrgico na artéria carótida comum esquerda, mimetizando a lesão causada por angioplastia em humanos. Analisamos a formação de trombo, a presença de células inflamatórias e de P-selectina nos animais 1 ou 3 dias após a lesão arterial; a formação de neointima foi analisada 21 após a injúria arterial. Observamos uma inibição da trombose, diminuição de células CD45⁺ e da expressão de P-selectina no local da lesão nos animais selvagens tratados com DS. Foi observado, também, que nos animais selvagens que receberam MNCs ou MNCs + DS, a formação de neointima foi

inibida. Nos animais selvagens tratados com MNC + DS, houve uma maior migração de MNC para o local da lesão. Nos animais HCII^{-/-}, não houve inibição da formação da neointima em nenhum dos dois grupos (tratados com MNC e tratados com MNC + DS). Nos camundongos ApoE^{-/-} a injeção de MNC mesmo em conjunto com o tratamento com DS não foi capaz de inibir a proliferação de neointima; houve melhora apenas quando se administrou o DS isoladamente. Com isso, concluímos que o DS participa da inibição dos processos trombótico e inflamatório, na sua fase inicial, após injúria arterial e promove também a migração de um número maior de MNCs para o local da lesão nos animais selvagens; nos animais ApoE^{-/-}, o DS inibiu a resposta inflamatória inicial e a formação de neointima apenas quando administrado isoladamente, tendo seu efeito anulado quando este foi injetado conjuntamente com as MNC. Este dado sugere que o processo inflamatório local, o estágio de formação das placas de ateroma, o elevado índice de colesterol e os triglicerídeos circulantes podem influenciar no efeito do DS e na capacidade de recuperação do endotélio mediada pela MNCs injetadas nos camundongos ApoE^{-/-}.

III. ABSTRACT

Dermatan sulfate (DS) is a glycosaminoglycan that can act as an antithrombotic, anticoagulant and anti-inflammatory agent. Atherosclerosis is a disease that affects the blood vessels by an exacerbated fat plaques formation, blocking the blood flow. The most used surgical operation, in these cases, is the angioplasty; however, this procedure can cause a lesion to the endothelium, where inflammatory cells and proteins are recruited to the lesion site, promoting smooth muscle cells migration and proliferation, provoking restenosis (neointima) of the attempted vessel. The endothelium recovery, some time after lesion, would be a therapeutic strategy by preventing the neointima formation. This recovery could be done by the endothelial progenitor cells (EPC), present in mononuclear cells (MNC) population, from bone marrow. In this study, we devise the DS effect on inflammation, thrombosis, neointima formation and MNC migration in wild-type mice (C57BL06); we also devise DS effect together with MNC administration on neointima formation in wild-type mice, heparin cofactor II deficient mice (HCII^{-/-}) and apolipoprotein E deficient mice (ApoE^{-/-}). All analyzed animals suffered surgical operation in left common carotid artery, that mimics the lesion caused by angioplasty in humans. We analyzed thrombus formation, inflammatory cells presence and P-selectin in animals 1 and 3 days after lesion; neointima formation was analyzed 21 days after arterial injury. We observed a thrombus inhibition, decreased CD45⁺ cells and P-selectin expression at the lesion site in wild-type animals treated with DS. It was also observed in wild-type animals that received MNC or MNC + DS, the neointima formation was inhibited. In wild-type animals treated with MNC + DS, there were a higher MNC migration to the lesion site. In HCII^{-/-} animals, there was not an inhibition in neointima formation in any of the two groups (treated with MNC or treated with MNC + DS). In ApoE^{-/-}

mice, the MNC injection even in DS presence, was not able to inhibit neointima proliferation; there was an improvement only when DS was administered alone. It follows that DS participate on thrombotic and inflammatory process inhibition, in the initial stages, after arterial injury and it also promote a higher MNC migration to the lesion site in wild-type animals; in ApoE^{-/-} animals, DS inhibited the initial inflammatory response and neointima formation only when administered alone; its effect was null when it was injected together with MNC. This data suggest that local inflammatory process, atheroma plaque state, elevated cholesterol and triglyceride rates can influence on DS effect and on the capacity of endothelium recovery mediated by injected MNC in ApoE^{-/-} mice.

IV. INTRODUÇÃO

Os vasos sanguíneos são formados por 3 camadas: a camada íntima composta de uma camada única de células endoteliais, a camada média formada principalmente fibras elásticas e as células musculares lisas e a camada adventícia, que contém principalmente fibras colágenas e fibroblastos.

As células endoteliais, presentes na camada íntima, atuam como uma barreira não adesiva para plaquetas e leucócitos e produzem uma variedade de importantes fatores regulatórios, tais como as prostaglandinas que causam uma maior permeabilidade capilar e tem o poder de quimiotaxia, atraindo macrófagos durante o processo inflamatório e o óxido nítrico que promove o relaxamento do músculo liso da parede do vaso, fazendo que este dilate aumentando o fluxo sanguíneo e diminuindo a pressão arterial (Cines et al, 1998).

O endotélio pode ser ativado sob ação de inúmeros fatores como tabagismo, níveis de colesterol e triglicérides elevados, diabetes, pressão arterial alterada, dentre outros. Essa ativação faz com que as células endoteliais deixem de produzir as substâncias responsáveis pela homeostase (capacidade do corpo em manter um equilíbrio estável a despeito das alterações exteriores) vascular e iniciem a liberação de fatores pró-inflamatórios tais como moléculas de adesão celular e citocinas que promovem a migração e adesão de monócitos, linfócitos e neutrófilos para o espaço subendotelial (Gotlieb 2005), esta ativação pode promover a inicialização de processos trombóticos e inflamatórios que podem levar a aterosclerose.

Uma das enfermidades que mais causa óbitos, entre a população adulta, nos países industrializados, é a aterosclerose, que é a principal responsável pela patogenia do miocárdio e do acidente vascular cerebral isquêmico. A aterosclerose é uma doença que acomete as paredes

vasculares, ocorrendo em locais susceptíveis de vasos sanguíneos. As lesões se iniciam com a ativação do endotélio e, progressivamente, afetam toda a parede vascular, incluindo as camadas média e adventícia. Os fatores de risco para essa doença são os mesmos que causam a ativação endotelial como hipertensão, tabagismo, diabetes, obesidade e predisposição genética; os detalhes moleculares ainda não foram esclarecidos (Insull, 2009).

A formação das placas de ateroma se iniciam quando partículas de LDL deixam o sangue circulante e penetram na camada íntima das artérias, quando a quantidade de LDL aumenta, este tende a se acumular nesse local. Essas partículas são então modificadas por enzimas e oxidadas em partículas pró-inflamatórias, o que provoca uma reação do sistema imune inato dentro da camada média.

A presença de partículas LDL oxidado leva ao reconhecimento destas por células T reativas, as quais também liberam citocinas pró-inflamatórias. Macrófagos estimulados por essas citocinas se transformam nas chamadas células espumosas (“foam cells”) e podem secretar metaloproteinases que levam ao rompimento da placa aterosclerótica. Com essa ruptura, fatores subendoteliais entram em contato com a circulação sanguínea, ativando a cascata de coagulação sanguínea (Stoll e Bendszus, 2006).

A ruptura da placa causa a exposição do fator tecidual, uma glicoproteína transmembrânica, de células endoteliais que inicia a cascata de coagulação sanguínea. O fator tecidual entra em contato com o fator VIIa presente no plasma sanguíneo (Libby, 2002; Tracy, 2003), formando o complexo de fatores VIIa/tecidual que converte o fator X em fator Xa, o qual se combina com o fator Va, convertendo a protrombina em trombina. A trombina converte o fibrinogênio em monômeros de fibrina, que leva a formação do trombo no local da lesão arterial.

A trombina não apenas converte fibrinogênio em fibrina, como também é capaz de clivar receptores de proteína G. Estes receptores são denominados receptores protease ativos – PARs, os quais, quando clivados medeiam a resposta plaquetária, induzindo a agregação e degranulação plaquetária. A trombina pode ativar também PAR1 na membrana das células endoteliais (Coughlin, 2002), causando expressão de moléculas de adesão na sua superfície e liberando uma variedade de citocinas e outros mediadores que aumentam o recrutamento de plaquetas e leucócitos (Figura 1). Todo esse processo leva à estenose do vaso, com formação de um trombo oclusivo que prejudica o fluxo sanguíneo no local da lesão arterial.

A angioplastia coronariana percutânea é o tratamento mais utilizado para a estenose vascular provocada pelo crescimento exacerbado de placas de ateroma nas artérias levando a oclusão ou semi oclusão destas. Este processo consiste na dilatação mecânica por meio de *stents* (extensores) no local do sítio vascular onde ocorreu a limitação ou interrupção do fluxo sanguíneo normal. Entretanto, esses procedimentos podem causar a injúria endotelial, levando a ativação da cascata de coagulação onde a produção exacerbada de fibrina leva à re-occlusão (reestenose) do vaso. Quando ocorre a lesão arterial, a fibrina, as plaquetas e os leucócitos que formam o trombo e iniciam a reação inflamatória local são observados até aproximadamente 72 horas após a lesão, quando então, o trombo desaparece e se inicia a recuperação do endotélio vascular. Por volta de 3 meses após a lesão (em seres humanos), a estenose passa a ocorrer como resultado da proliferação de células musculares lisas e deposição de matriz extracelular no lúmen dos vasos (Farb et al., 1999). Cerca de 50% dos pacientes submetidos à esses procedimentos cirúrgicos apresentam restenose (Serruys et al 1994; Fischman et al 1994), sendo necessário novas intervenções cirúrgicas, o que ocasiona grandes prejuízos ao paciente e também, eleva significativamente os custos do tratamentos para os sistemas de saúde.

A restenose é causada pela formação de neointima, a qual é formada pela proliferação exacerbada de células musculares lisas que podem migrar da camada média do vaso lesionado ou se originarem da circulação sanguínea (Figura 2). Estudos recentes mostraram que as células musculares lisas que causam a formação de neointima provêm de progenitores das células musculares lisas, advindos tanto da medula óssea como da circulação (Hristov e Weber, 2009).

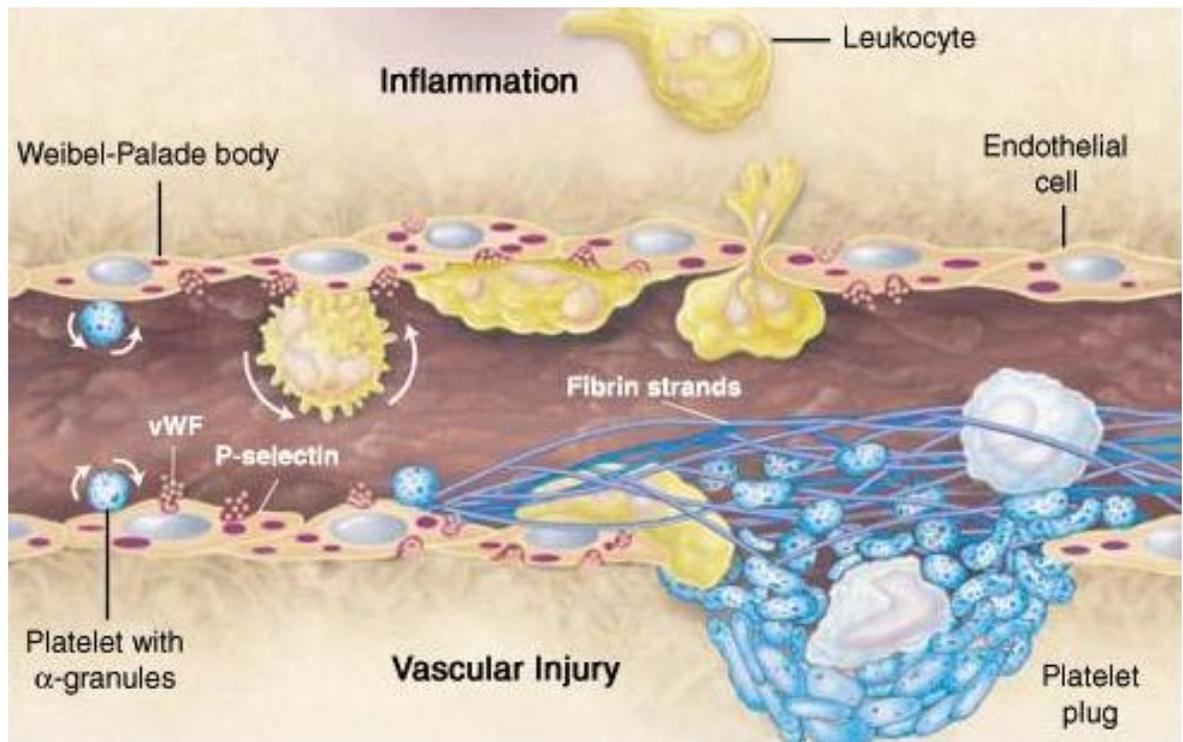


Figura 1 – Ativação endotelial (labs.idi.harvard.edu/wagner/media/image2.html).

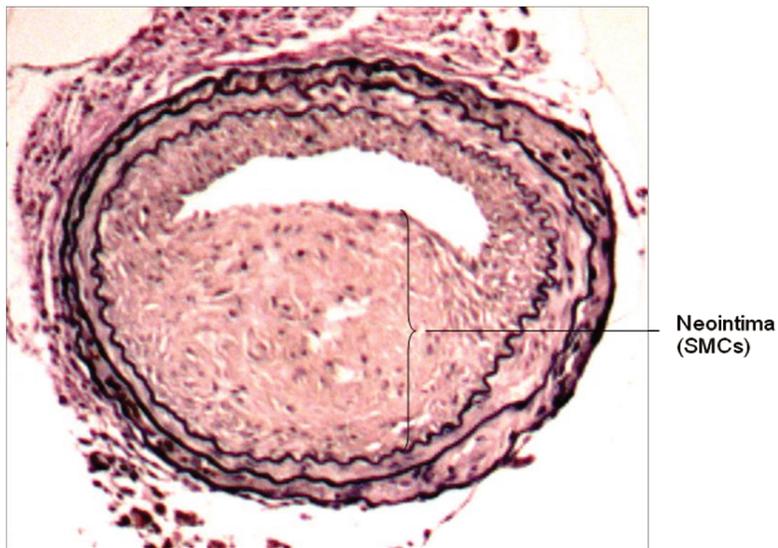


Figura 2 – Neointima (Vicente et al., 2007).

Uma variedade de agentes terapêuticos está sendo empregada para se tentar modular a função vascular e regenerar as células endoteliais nos estágios pós-operatórios de pacientes submetidos à angioplastia. Entre os candidatos estão as estatinas (que inibem a enzima 3-hidróxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductase, a qual limita a formação de colesterol no fígado) e os bloqueadores de angiotensina (que controla o volume de líquido extracelular e a pressão arterial), estas drogas têm mostrado capacidade de mediar a proteção vascular independente da causa do problema (Werner and Nickenig, 2006), mas essas alternativas têm se mostrado pouco promissoras na tentativa de reduzir a incidência de restenose.

A regeneração do endotélio vascular é um evento importante e deve ocorrer nos primeiros momentos após a injúria vascular para se prevenir a resposta em relação à lesão endotelial e, conseqüentemente, 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) como as chamadas células progenitoras endoteliais.

Tratamento com substâncias que inibam a formação de trombina pode ser muito importante. Diante disso, o dermatan sulfato (DS), um glicosaminoglicano, que é capaz de se ligar ao cofator II da heparina (HCII), inibe a ação da trombina, tem se mostrado bastante promissor. A administração concomitante de DS e células progenitoras endoteliais poderiam fornecer uma melhora mais significativa em pacientes acometidos por oclusão de vasos.

1. Células Progenitoras Endoteliais

Em 1997, um grupo de pesquisadores (Asahara et al., 1997) obtiveram, pela primeira vez, células progenitoras endoteliais CD34⁺ a partir de humanos adultos. Estas células foram capazes de se diferenciar, “ex vivo”, em células com um fenótipo endotelial e são chamadas de “células progenitoras endoteliais” (CPE). Elas 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). Essas células tem sido alvo de diversos estudos atualmente e podem ser a base para uma nova estratégia terapêutica com o objetivo de recuperar o endotélio mais rapidamente. Alguns grupos de pesquisa demonstraram que a transfusão sistêmica ou mobilização intrínseca das células progenitoras endoteliais melhora a reconstituição do endotélio após dano, resultando em uma formação diminuída da neo-íntima (Werner et al., 2003; Walter et al., 2002; Werner et al., 2002). A rápida regeneração da monocamada endotelial pode prevenir a restenose através da síntese endotelial de mediadores anti-proliferativos como o óxido nítrico (Urbich e Dimmeler, 2004).

As células progenitoras endoteliais (CPEs), 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, CD133, o receptor para o fator de crescimento endotelial vascular-2 (VEGFR-2) e CD45 negativas (Peichev et al., 2000; Gehling et al., 2000). Células com esses marcadores são encontradas preferencialmente na medula óssea (Quirici et al., 2001). No sangue circulante são encontradas células endoteliais mais maduras, as quais não expressam o marcador CD 133. Essa perda de marcador reflete certa diferenciação em direção às células endoteliais maduras.

A molécula de CD34 é uma proteína transmembrana altamente glicosilada com 75 à 120 kd sendo, 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 CD133, 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 CD133 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).

Dados experimentais demonstraram que a transfusão sistêmica de CPEs saudáveis em condições de danos às artérias pode melhorar a reendotelização resultando em uma formação reduzida da neointima (Werner et al., 2003).

Para avaliar o valor prognóstico das CPEs circulantes, Werner et al. (2005) realizaram um estudo da EPCAD (células progenitoras endoteliais em doenças arteriais coronarianas), no qual o número de CPEs CD34+/KDR+ foi determinado através da citometria de fluxo em 519 pacientes com a CAD (doenças arteriais coronarianas) documentada. Após o ajustes de idade, sexo, fatores de risco, terapia medicamentosa, intervenção coronária percutânea e doenças concomitantes, o aumento dos níveis de CPEs foram associados com um menor risco de morte cardiovascular, de um evento cardiovascular grave e de hospitalização.

Inúmeros estudos têm avaliado a função das CPEs 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 CPEs circulantes aumenta significativamente (Gill et al., 2001; Shintani et al., 2001). Existem duas possíveis fontes para a endotelização: (1) migração e irradiação endotelial a partir de células endoteliais pré-existentes ou (2) recrutamento de progenitores das células endoteliais a partir da circulação (Peichev et al., 2000). Os dados experimentais do estudo realizado por Hu et al. (2003) forneceram uma sólida evidência de que as células endoteliais que regeneraram tecidos lesados se

originaram a partir de células do sangue circulante e não a partir de células endoteliais dos vasos adjacentes.

Hu et al. (2003) observaram uma perda maciça de endotélio nos pacientes submetidos à transplante entre 3 e 7 dias após a cirurgia, cujas paredes vasculares ainda não estão completamente recobertas pelas células endoteliais circulantes. Isto indica que certas áreas transplantadas perdem a monocamada de células endoteliais durante o período inicial de tempo. Tal exposição das proteínas da matriz extracelular ao sangue pode ser um risco para a formação de trombose. Se a adesão das células progenitoras circulantes pudesse ser realizada em um estágio mais precoce, a falha do transplante seria reduzida devido à inibição de trombose ou lesões neointimas.

Embora o número de células progenitoras CD34+ na circulação periférica seja baixo, citocinas como fator estimulante de colônias granulocíticas (G-CSF) promovem a mobilização dessas células a partir da medula óssea para a circulação periférica. A porcentagem de células CD34+ expressando CD133+ e VEGFR2+ é de apenas 2% do total de células CD34+ circulantes (Peichev et al., 2000).

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).

As diferentes patologias levam a uma diminuição das 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. As injeções de células progenitoras endoteliais isoladas para a recuperação de lesões e de drogas, como o dermatan sulfato, 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.

2. O Cofator II da Heparina

O HCII é uma proteína plasmática que inibe a trombina quando em presença de dermatan sulfato, heparan sulfato ou heparina. O HCII circula no plasma humano à uma concentração de $\sim 1\mu\text{mol/L}$ e tem uma vida-média de 2 à 3 dias (Tollefsen e Pestka 1985). O HCII inibe a trombina, mas não apresenta efeito contra outras proteases envolvidas na coagulação ou fibrinólise. Os camundongos deficientes em HCII são viáveis e férteis, e não apresentam trombose espontânea ou qualquer outra anomalia morfológica. Em comparação com camundongos normais, entretanto, eles apresentam um menor tempo de oclusão trombótica da artéria carótida após indução de injúria endotelial e o DS é incapaz de prolongar o tempo de oclusão em modelos de trombose usando a injúria produzida por laser através do uso de rosa de bengala. Esses resultados demonstram que a presença de HCII é essencial para o efeito antitrombótico do DS (Vicente et al., 2004; Vicente et al., 2007).

Parte da trombina gerada após a injúria vascular continua ligada à fibrina ou à componentes da parede vascular na sua forma ativa, a qual não é inibida pelo complexo antitrombina/heparina circulante, mas sim pelo complexo cofator II da heparina/Dermatan sulfato (Liaw et al., 2001). A administração de dermatan sulfato (DS), mas não heparina, atenua a

proliferação das células musculares lisas após injúria da artéria carótida em coelhos (Buchanan e Brister, 1998). Esse efeito anti-proliferativo do DS pode ser explicado pela estimulação do cofator II da heparina (HCII) em inibir não só a trombina livre, mas também a ligada ao trombo.

3. Dermatan Sulfato

O dermatam sulfato, 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).

Foi observado que o dermatam sulfato 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 dos vasos. Estes resultados demonstram que deve haver uma via anticoagulante relacionada com as camadas subendoteliais e que esta via é dependente de dermatan sulfato e sua interação com o cofator II da heparina (HCII) e estaria ativada em situações patológicas como as observadas após a lesão arterial (Tovar et al., 2005). Foi demonstrado por He et al (2008) que o dermatan sulfato 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 dermatam sulfato é capaz de se ligar a vários fatores ligantes de heparina como: FGF-2, fator de crescimento de hepatócitos, fibronectina, cofator II da heparina (HCII) e com o fator plaquetário 4 inibidor de proteína C, nestes dois últimos casos agindo com fator antitrombótico e anticoagulante. Foi observado em determinadas lesões epiteliais que o dermatam sulfato é o principal glicosaminoglicano liberado e o único capaz de ativar a expressão de I-CAM na superfície das células endoteliais *in vitro* e aumentar os níveis circulantes destas moléculas *in vivo*. As modificações da parede dos vasos sanguíneos, em relação ao perfil de glicosaminoglicanos que ocorrem na lesão arterial, estão relacionadas com a capacidade deste durante a recuperação da lesão. Recentemente Belmiro et al (2009) demonstraram que o DS possui uma atividade anti-inflamatória em modelos de colite em ratos.

Vicente et al. (2007) demonstraram que a administração de dermatan sulfato durante as primeiras 48 horas após a injúria inibiu a formação da neointima em camundongos HCII+/+ mas não em camundongos HCII-/. Durante eventos ateroscleróticos o HCII se liga a trombina, a qual estimula a adesão de células musculares lisas e estimula as células endoteliais a recrutar leucócitos e macrófagos (Tracy, 2003), com a formação de neointima. Quando o dermatan sulfato está presente, o HCII se liga à ele, inibindo os estímulos sobre a trombina e diminuindo a formação de neointima.

As células musculares lisas arteriais sintetizam proteoglicanos que estimulam a ligação trombina-HCII e podem servir como parte de um mecanismo auto-regulatório prevenindo a proliferação dessas células na íntima (McGuire e Tollefsen, 1987). Embora o DS seja mais abundante nas placas ateroscleróticas que nas artérias normais, sua estrutura é alterada e sua habilidade em estimular o HCII diminui (Shirk et al., 2000). Um mecanismo dependente de HCII

para limitar a proliferação das células musculares lisas pode ser perdido durante a formação das placas de ateroma.

4. Apolipoproteína E

Apolipoproteína E (apoE), uma glicoproteína sintetizada principalmente no fígado e cérebro, é um constituinte de todas as lipoproteínas exceto LDL. ApoE é também sintetizada por monócitos e macrófagos nos vasos sanguíneos, e sugere-se que tenha efeitos locais na homeostase de colesterol e em reações inflamatórias nos vasos ateroscleróticos (Curtiss, 2000). Ela também atua na absorção de colesterol da dieta (Sehayek et al., 2000).

Camundongos deficientes em ApoE (ApoE^{-/-}) foram criados simultaneamente em dois laboratórios independentes, através da inativação gênica. Esses animais apresentam o colesterol total ao redor de 500mg/dl plasma, a sua maioria em partículas de VLDL e quilomicrons (Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992). Com isso, o desenvolvimento de aterosclerose é acelerado, mimetizando o que acontece com os seres humanos atualmente.

O colesterol é um esteróide lipídico encontrado nas membranas celulares e transportado no plasma sanguíneo de todos os animais. A maior parte do colesterol presente no corpo é sintetizada pelo próprio organismo (no retículo endoplasmático das células), sendo apenas uma pequena quantidade adquirida pela dieta. O colesterol é mais abundante em locais que mais sintetizam ou tem membranas densamente agrupadas em maior número, como o fígado, medula espinhal e cérebro. O colesterol tem papel central em muitos processos bioquímicos como na fabricação da bile e é o principal precursor para a síntese de vitamina D e vários hormônios esteróides (cortisol, aldosterona, progesterona, estrógeno, testosterona e outros), mas é mais

conhecido pela associação existente entre doenças cardiovasculares e as diversas lipoproteínas que o transportam. Níveis aumentados de colesterol, especialmente elevadas concentrações de LDL, estão associados com a formação de ateromas nas artérias. O colesterol é transportado na corrente sanguínea pelas lipoproteínas, as quais carregam tanto o colesterol como triglicerídeos internamente.

Os triglicerídeos são compostos por uma molécula de glicerol e três moléculas de ácidos graxos, sendo a principal fonte de estocagem nos animais, os quais se acumulam no tecido adiposo na forma de gordura. Os triglicerídeos são mobilizados dos adipócitos ou adquiridos na dieta e são utilizados como fonte energética. Quando em excesso, participam do processo de aterosclerose.

O colesterol plasmático em camundongos normais sob uma dieta regular é de aproximadamente 80mg/dl de plasma, sendo carregado em partículas chamadas de HDL (lipoproteínas de alta densidade); os camundongos possuem poucas partículas de LDL (lipoproteínas de baixa densidade) e VLDL (lipoproteínas de densidade muito baixa). A alta taxa HDL/LDL é mantida mesmo quando os camundongos são submetidos à dietas ricas em gorduras, como as consumidas pelos humanos na sociedade moderna. Isso é uma característica contrastante com os seres humanos, os quais carregam seu colesterol em partículas de LDL (110mg/dl plasma) (Havel e Kane, 1989), sendo que a taxa HDL/LDL é menor que nos animais. Em humanos, deve-se tentar manter uma alta taxa de HDL/LDL (com níveis elevados de HDL e baixos de LDL), visto que altos níveis de LDL são um dos principais fatores de risco para o início da aterosclerose. Apesar dessa diferença, tanto o transporte como o metabolismo de colesterol são

bastante similares nas duas espécies, sugerindo que distúrbios no metabolismo de lipoproteínas plasmáticas também podem levar ao aparecimento da aterosclerose em camundongos (Miller, 1982).

Camundongos ApoE^{-/-}, que desenvolvem aterosclerose após alimentação com dieta do tipo Western (rica em gorduras), demonstraram que a hiperlipidemia é um pré-requisito essencial para a formação da placa aterosclerótica (Pendse et al., 2009). Estudos recentes indicam que a apolipoproteína E (ApoE) exerce um papel fundamental na “captura” de lipídios periféricos e na hemóstase energética e, conseqüentemente, no desenvolvimento da síndrome metabólica, a qual se caracteriza pela combinação de graves condições como obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertensão, dislipidemia e um estado pró inflamatório (Grundy et al., 2004). O estudo das lesões arteriais e formação de neo-íntima em animais ateroscleróticos é essencial para compreender como o processo de recuperação de endotélio pode ocorrer nesta situação patológica.

Em um estudo com camundongos ApoE^{-/-} (deficientes em apolipoproteína E) que receberam 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). Entretanto, um estudo posterior (George et al., 2005), também com camundongos ApoE^{-/-}, mostrou que a administração de células da medula óssea e células progenitoras endoteliais aumentaram o tamanho da lesão aterosclerótica e que a administração apenas das células progenitoras endoteliais podem influenciar negativamente na estabilidade das placas ateroscleróticas.

Um estudo com humanos (Kang et al., 2004), onde se administrou fator estimulante de granulócitos seguido de injeções de células mononucleares (MNCs) obtidas do sangue periférico, promoveu a melhora da função cardíaca e a angiogênese em pacientes com infarto do miocárdio; no entanto, foi observado o agravamento da restenose.

A literatura mostra o DS como um agente anti-trombótico, capaz de inibir a ação da trombina. Diante disso, nosso trabalho testou o possível potencial anti-inflamatório do DS e também relacionamos essa resposta inflamatório inicial com a formação de neointima tanto em camundongos selvagens como em camundongos ateroscleróticos. Em relação às MNCs, existem dados controversos quanto ao seu potencial terapêutico, alguns estudos mostram um ganho na função e reparo de determinados tecidos enquanto outros observaram nenhuma melhora ou, em alguns casos, piora no quadro. Em vista disso, nosso estudo analisou a possível ação das MNCs na prevenção da formação de neointima em camundongos selvagens e ateroscleróticos.

V. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

O objetivo geral da tese foi avaliar a ação da administração dermatan sulfato na inflamação, trombose, formação de neointima e migração das células mononucleares, após lesão arterial em camundongos.

2. Objetivos Específicos

- 1- Avaliar a magnitude da lesão endotelial provocada pela lesão mecânica através da quantificação de células endoteliais (células CD31 positivas) no endotélio da artéria carótida tanto não lesionada como lesionada em camundongos selvagens;
- 2- Avaliar o papel do dermatan sulfato na inflamação inicial pela da presença de células inflamatórias (CD45 positivas) e presença de P-selectina, uma proteína ligada a adesão de macrófagos, em camundongos selvagens;
- 3- Avaliar o efeito do dermatan sulfato e da injeção de células mononucleares na formação de neointima em camundongos selvagens, camundongos HCII^{-/-} e camundongos ApoE^{-/-};
- 4- Verificar a migração das células mononucleares injetadas em camundongos normais na presença e ausência de dermatan sulfato.

VI. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados camundongos de linhagem C57BL/6 adquiridos no CEMIB/UNICAMP, camundongos deficientes para o cofator II da heparina (HCII^{-/-}) e camundongos deficientes da apolipoproteína E (ApoE^{-/-}), sendo estes dois últimos criados no biotério do departamento de bioquímica da UNICAMP sob a responsabilidade do prof. Dr. Claudio C. Werneck e da profa. Dra. Cristina P. Vicente. Foram utilizados aproximadamente 10 camundongos em cada grupo estudado.

2. Grupos de animais testados

Neste estudo foram testados 7 grupos de animais: (1) controle - animais normais; (2) animais normais tratados com dermatan sulfato (DS); (3) animais normais tratados com células monocleares (MNCs); (4) animais normais tratados com DS e MNCs; (5) Animais HCI^{-/-} tratados com MNC; (6) Animais HCI^{-/-} tratados com MNC e DS (7) animais ApoE^{-/-} (8) animais ApoE^{-/-} injetados com DS; (9) animais ApoE^{-/-} injetados com MNCs e (10) animais ApoE^{-/-} injetados com DS e MNCs. Todos os animais ApoE^{-/-} foram alimentados com dieta do tipo Western. Houve aproximadamente 8 animais em cada grupo. Todos os animais passaram pelo procedimento descrito no item 4.

3. Dieta do tipo Western

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.

Tabela 1. Composição detalhada da dieta western

Componente	g/Kg
Caseína	195
Amido de milho	320,7
Dextrina	79,6
Banha animal	50
Manteiga	204
Celulose	50
Mix mineral (AIN-93M)	35
Mix vitamínico (AIN-93M)	10
l-cistina	1,8
Bitartarato de colina	2,5
Sacarose	51,4

Esta dieta leva à formação de placas de gordura nos vasos dos camundongos deficientes em ApoE, que sem esta dieta desenvolvem pouca ou nenhuma aterosclerose. Esta situação mimetiza, parte dos fatores de risco que grande parte da população se submete nos dias atuais.

4. Lesão arterial

Camundongos pesando $25g \pm 2$ foram anestesiados com 16 mg/kg de xilazina e 100 mg/kg de ketamina. As artérias carótidas esquerda comum e interna foram firmadas com um grampo para a interrupção do fluxo sanguíneo e uma sonda metálica de 0,63 mm de diâmetro foi introduzida na artéria carótida comum através da artéria carótida externa (esse procedimento será repetido 3x). Esta sonda provoca uma dilatação do vaso de aproximadamente 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, os grampos foram removidos e a pele foi suturada com fio 6.0.

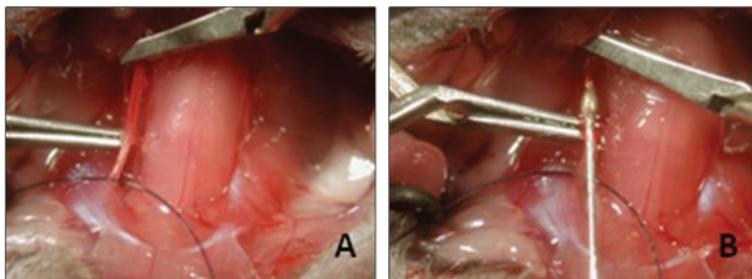


Figura 3. A. Isolamento da artéria carótida comum esquerda e o uso de clampes para interrupção do fluxo sanguíneo. B. Introdução da sonda metálica.

Alguns animais, tanto selvagens como ApoE^{-/-}, receberam, através da veia da cauda, 4 injeções (20mg/kg de animal) de dermatan sulfato 10 minutos, 12 horas, 24 horas e 48 horas após a cirurgia. Alguns grupos receberam injeções de MNCs na concentração de 2×10^6 células/injeção 1 hora e 24 horas após a lesão.

5. Preparo do material histológico

Os camundongos foram sacrificados em diferentes tempos após a lesão arterial: 1 dia, 3 dias e 21 dias. Logo após o sacrifício, uma incisão foi feita no átrio direito e o animal foi perfundido com soro fisiológico durante 5 minutos à pressão constante de 100mmHg através de um cateter localizado no ventrículo esquerdo. As artérias carótidas comuns foram removidas e embebidas em Tissue Tek OCT. As artérias carótidas foram cortadas de modo a se obter 5 cortes de 8µm cada por lâmina, totalizando 15 lâminas, entre cada lâmina haverá um intervalo de 80µm tentando, dessa maneira, percorrer os 2mm da artéria lesada.

6. Isolamento das células mononucleares

As células mononucleares foram isoladas da medula óssea de camundongos selvagens. Essas células são isoladas através de gradiente de Ficoll. O Ficoll é uma mistura de polissacarídeos de alta densidade e permite a separação de partículas de acordo com sua densidade.

7. Caracterização das Células Mononucleares

As células mononucleares foram caracterizadas quanto à presença de marcadores específicos para células progenitoras endoteliais. Essa caracterização analisou a presença de EPCs tanto na medula óssea como no sangue periférico de camundongos selvagens sem lesão, lesionados 3 dias e lesionados injetados com MNCs 3 dias. As MNCs foram marcadas com anticorpos para marcadores de superfície CD133 conjugado com Cy5, CD34 conjugado com FITC e VEGFR2 conjugado com Cy5. As análises foram realizadas em citômetro de fluxo (FACScalibur, BD Biosciences).

8. Análise da Migração das Células Mononucleares

Alguns animais receberam injeções de células marcadas com PKH-26 GL (Sigma, St. Louis, MO), o qual é um marcador fluorescente de membrana para células vivas. As células foram marcadas de acordo com instruções do fabricante. Os animais que receberam essas células se recuperaram durante 7 dias após a cirurgia. Após esse período, eles foram sacrificados e as artérias analisadas quanto à presença dessas células.

9. Análise histológica

Algumas lâminas foram corados através da técnica de Verhoeff Van Giemsa, a qual é específica para fibras elásticas para a análise da formação de neointima. Realizou-se ensaios imunohistoquímicos para a análise da presença de células musculares lisas (A2547 - Sigma), leucócitos CD45⁺ (H230 – Santa Cruz Biotechnology, CA), células endoteliais (RM5200 – Caltag, UK), fator de Von Willebrand (ab6994 – Abcam, MA), para P-selectina (AF737, Minneapolis, MN). Foi realizado a técnica para detecção de lipídios neutros (Oil Red O) nos animais alimentados com dieta do tipo Western. Analisou-se também a presença de células no lúmen do vaso através da técnica de DAPI. 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.

10. Cálculo Áreas Neointima e Média

A porcentagem da área de neointima foi calculada pela subtração da área oclusa de lúmen da área total encoberta pela lâmina elástica interna. A área média foi calculada, em μm^2 , pela subtração da área encoberta pela lâmina elástica interna da lâmina elástica externa. As medidas foram feitas sem o conhecimento do genótipo do animal em análise.

11. Quantificação de Colesterol e Triglicerídeos

O colesterol total e o triglicerídeos foram dosados através de métodos enzimáticos em espectrofotômetro. Foram utilizados kits tanto para o colesterol total (Laborlab 01400) quanto para triglicerídeos (Laborlab 02700). Ambos os testes foram realizados em soro sanguíneo obtidos tanto de animais normais quanto de animais ApoE^{-/-} alimentados com dieta do tipo Western.

O teste foi realizado da seguinte maneira: utilizamos inicialmente 3 cubetas, sendo elas, B (branco – sem amostra), P (padrão – reativo padrão) e D (desconhecido – soro sanguíneo). Adicionamos o reativo de trabalho e incubamos em banho-maria à 37°C por 15 minutos; esfriamos as amostras e lemos em Espectrofotômetro a 505nm, zerando o aparelho com água destilada.

12. Análise Estatística

Valores médios foram obtidos para as medidas das áreas íntima e média; a significância estatística foi determinada através do teste t-student. Valores de *P* menores ou iguais à 0,05 foram considerados significativos.

VII. RESULTADOS

Extensão da lesão arterial provocada por dilatação mecânica

A dilatação das artérias carótidas comum esquerdas dos camundongos foi feita com o uso de uma sonda metálica que mimetiza a angioplastia, levando à perda de células endoteliais como demonstrado por imunofluorescência com o anticorpo anti-CD31 24 horas após a lesão arterial (Figuras 1A, B e C). Observou-se uma perda de células endoteliais superior a 50% tanto nos camundongos normais não-tratados como nos camundongos tratados com DS (Figura 1D). Este experimento demonstra que a lesão inicial é similar nos animais não-tratados e tratados.

Efeito do DS na trombose após lesão arterial em animais normais

Foi realizada uma imunohistoquímica para o fator de Von Willebrand (VWF) em cortes obtidos de animais não-tratados (Figura 2A, B) e tratados com DS (Figura 2C, D) para a determinação da área ocupada pelo trombo dentro do lúmen do vaso e para calcular a porcentagem da área ocupada pelo trombo 1 e 3 dias após a injúria. Nos animais não tratados, o trombo ocupa uma área de aproximadamente 80% do lúmen tanto nos dias 1 e 3 após a injúria e esse trombo desaparece depois de 7 dias (dado não mostrado). Nos animais tratados com DS, a inibição da formação do trombo chega a 75% (Figura 2E). Esses resultados indicam que a injúria causada pela sonda promove a formação de um trombo nos primeiros dias após a lesão, o qual é inibido após administração de DS.

Efeito do DS na migração de células CD45⁺ 3 dias após lesão arterial

A migração de células CD45⁺ foi determinada contando-se a quantidade de células presentes no local da lesão 3 dias após a injúria arterial na presença ou ausência de DS. O

anticorpo anti-CD45 usado nos ensaios imunohistoquímicos detecta alguns tipos de células-tronco hematopoiéticas e todos os leucócitos em diferentes estágios de maturação.

Analisou-se cortes da carótida, 3 dias após a injúria, de camundongos normais não tratados (Figura 3B) e tratados com DS (Figura 3C) e comparou-se os resultados com um corte de carótida não lesionada (Figura 3A). Tratamento com DS diminuiu o número de células CD45⁺ na parede vascular em aproximadamente 61% (p=0.0003, n=4 para cada grupo) (Figura 3G).

Nos animais ApoE^{-/-}, 3 dias após lesão, também se contabilizou a quantidade de células CD45⁺. Os animais lesionados (Figura 3E) e os tratados com DS (Figura 3F) foram comparados com um corte de carótida usado como controle negativo da reação de imunofluorescência (Figura 3D). A administração de DS inibiu a presença de células CD45⁺ em aproximadamente 57% (p = 0.0003, n = 4 para cada grupo) (Figura 3G).

A presença de células CD45⁺ nos camundongos lesionados não diferiu entre animais normais e animais ApoE^{-/-}; o tratamento com DS também apresentou inibição similar nos dois grupos de animais.

Efeito do DS na ativação de células endoteliais

Analisou-se a expressão da P-selectina em cortes de carótida 1 dia após injúria tanto de animais não-tratados como tratados com DS. A P-selectina é uma molécula de adesão celular que é expressa em células endoteliais ativadas e plaquetas. Ela é essencial no recrutamento inicial de leucócitos ao local da injúria durante a inflamação. Quando as células endoteliais são ativadas por moléculas como histamina e trombina que podem estar presentes no local da lesão, a P-selectina se move do interior para a superfície celular, promovendo o rolamento e a adesão de células inflamatórias. A resposta celular que promove a expressão da P-selectina na membrana das

células é rápida acontecendo nas primeiras 24 após a lesão e desaparecendo logo a seguir. Observou-se que 1 dia após a injúria há um aumento da presença de P-selectina na parede dos vasos sanguíneos de animais não tratados (Figura 4B) e esta expressão é quase totalmente abolida quando há administração de DS (Figura 4C). A Figura 4A foi usada como controle negativo da reação (sem a presença de anticorpo primário durante o experimento de imunohistoquímica).

Formação de neointima em camundongos normais e HCII^{-/-}

A neointima é composta principalmente de células musculares lisas, que tem sua proliferação aumentada após a lesão arterial e podem provocar a restenose do vaso sanguíneo lesionado. A formação de neointima foi analisada sob várias condições 21 dias após a dilatação mecânica da artéria carótida comum. Vinte lâminas foram preparadas de cada artéria lesionada com um intervalo de 100µm entre elas. A seguir, as lâminas foram coradas com a técnica de Verhoeff Van Gienson (VVG) para a identificação da lâmina elástica. O corte com maior área de neointima foi identificado e tanto a área de neointima como a área média foram determinadas. Na figura 5 observamos cortes de carótidas de animais normais ou HCII^{-/-}, injetados ou não com DS e ou MNCs corado com VVG. Na figura 5G-L são identificadas as células musculares lisas por imunohistoquímica utilizando-se anticorpo anti- α -actina. Realizamos também a técnica de DAPI para a confirmação da presença de células no lúmen (Figura 5M-R).

Nós analisamos a área da neointima em camundongos normais não-tratados, camundongos normais tratados com DS, camundongos normais injetados com MNC, camundongos normais tratados com DS e injetados com MNC, animais HCII^{-/-} injetados com MNC e animais HCII^{-/-} tratados com DS e injetados com MNC (Figura 6A). Os resultados mostraram que a administração de DS inibe a formação de neointima em aproximadamente 72%

(69 vs. 19%, $p = 0.0008$) e a injeção de MNC isoladamente inibe a formação de neointima em 21% (69 vs. 58%, $p = 0,05$). Contudo, quando se administrou DS em conjunto com MNC, a formação de neointima foi significativamente menor (19 ou 58 vs. 4.8%, $p < 0.01$). As áreas médias não diferiram significativamente entre todos os tratamentos ou fenótipos (Figura 6B).

O efeito inibitório observado quando da administração de DS é dependente da presença de HCII, visto que o tratamento com MNC ou MNC em conjunto com DS nos camundongos HCII^{-/-} não apresentou efeito na inibição da neointima em comparação com os animais normais injetados apenas com DS ou DS em conjunto com MNC (79 ou 80% de ocupação do lúmen VS. 18 ou 4.8%, respectivamente). A dose de DS escolhida foi equivalente à 634 μ g/ml de plasma, assumindo-se um volume de plasma de 31.5ml/kg de peso corpóreo. Esta dose já mostrou ser capaz de prolongar o tempo de trombose, em artérias carótidas após injúria fotoquímica, de 60 para 100 minutos (Vicente et al., 2004).

Formação de neointima em camundongos ApoE^{-/-}

A formação da neointima foi analisada como descrito anteriormente após 21 dias. As figuras 7 A, B, C e D mostram a coloração com VVG para identificação da lâmina elástica. As figuras 7 E, F, G e H mostram a presença de células musculares lisas utilizando o anticorpo anti- α -actina. Foi também realizada a técnica de DAPI para demonstrar que grande parte da área de lúmen ocupada é devido à presença de células (Figura 7I, J, K e L).

Analizamos a porcentagem da área de neointima em todos os grupos (ApoE^{-/-}, ApoE^{-/-} DS, ApoE^{-/-} MNCs e ApoE^{-/-} MNCs + DS) (Figura 8A). Os resultados mostraram que a administração de DS inibiu a formação de neointima em aproximadamente 81% (75 vs. 14,8% p

= área do lúmen ocupada por neointima); as injeções de MNCs isoladamente não inibiram a formação de neointima (75 vs. 83,3% p) e mesmo quando administradas em conjunto com DS, a inibição não foi significativa (75 vs. 60,1% p). A porcentagem de área média não diferiu estatisticamente entre os grupos (Figura 8B).

Análise da presença de lipídios no lúmen vascular em animais ApoE^{-/-} alimentados com dieta do tipo Western

Analisamos a presença de gordura no lúmen da carótida utilizando-se a técnica do Oil Red O que identifica lipídios. Nos animais normais não há a presença dessas placas (Figura 9A), mas os animais ApoE^{-/-} apresentam uma grande área do lúmen ocupada por essas placas em todos os grupos estudados (Figura 9B).

Quantificação de colesterol e triglicerídeos

A quantificação de colesterol e triglicerídeos foi feita através do método colorimétrico. Foram analisados 2 grupos: (1) animais normais com dieta normal e (2) animais ApoE^{-/-} com dieta do tipo Western. No primeiro grupo, a quantidade de colesterol foi, em média, 83mg/dl plasma e de triglicerídeos foi aproximadamente 43mg/dl plasma. No grupo 2, a quantidade de colesterol foi quase 9 vezes maior que no grupo 1 (755 vs. 83mg/dl plasma – Figura 10A) e a quantidade de triglicerídeos foi 3 vezes maior (130 vs. 43 mg/dl plasma – Figura 10B).

Análise da quantidade de células progenitoras endoteliais na medula óssea e sangue periférico por citometria de fluxo

As células progenitoras endoteliais podem ser reconhecidas pela expressão de marcadores de superfície como CD34 e FLK-1 (VEGFR2 ou KDR). Um subtipo imaturo dessa população expressa também o marcador CD133, o qual é mais abundante em células derivadas da medula óssea. As MNC isoladas da medula óssea de camundongos foram analisadas em citômetro de fluxo (Tabela 1). As MNC contêm 1% de células CD34⁺, 0.26% de células CD133⁺, 0.03% de células CD34⁺/CD133⁺, 0.001% de células VEGFR2⁺ e 0.001% de células CD34⁺/VEGFR2⁺. As células CD34⁺ são consideradas as principais células capazes de diferenciarem em células progenitoras endoteliais, que podem auxiliar na recuperação de lesões arteriais.

Determinou-se também a porcentagem de células CD34⁺, VEGFR2⁺ e CD34⁺/VEGFR2⁺ no sangue periférico de camundongos não lesionados (controle), camundongos lesionados não injetados com MNC e camundongos injetados com MNC 72 horas após a injúria (Figura 11). Observou-se um aumento no número de células CD34⁺ nos animais lesionados 72 horas (0,46 vs. 0,2% de células em 100.000 eventos; p = 0,003, n = 6 em duplicata) e nos animais lesionados injetados com MNC (1,2 vs. 0,2% de células em 100.000 eventos; p = 0,0002, n = 6 em duplicata).

As células VEGFR2⁺ sofreram um aumento significativo apenas nos animais que foram lesionados e injetados com MNC (0,2 vs. 0,05% de células em 100.000 eventos; p = 0,0001, n = 6 em duplicata). Entretanto, as células CD34⁺/VEGFR2⁺ sofreram uma diminuição nos dois grupos (lesionados e lesionados injetados com MNC) quando comparados com o controle. Essa diminuição pode estar relacionada à mobilização dessas células para o local da injúria ou diferenciação das mesmas em fenótipo mais maduro. Análise para a presença de células progenitoras endoteliais mais maduras expressando VEGFR2/CD31 ou VEGFR2/VWF ainda deverá ser realizada.

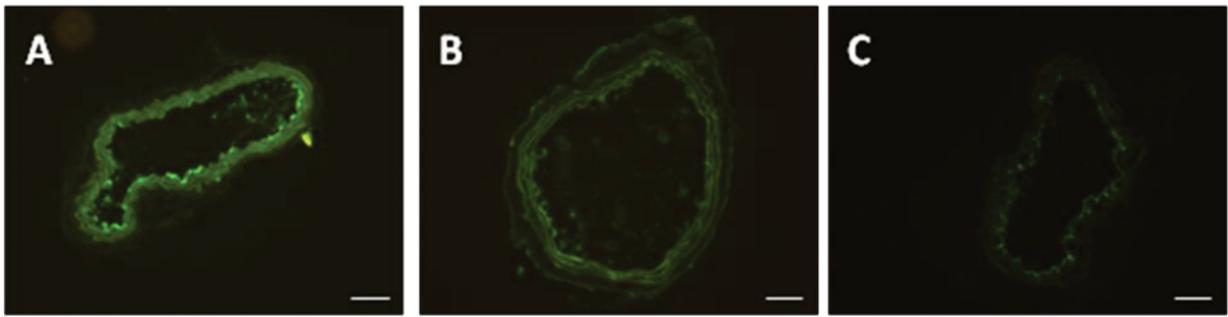
Migração de MNC nos animais normais tratados ou não com DS

A determinação da influência do DS na migração de MNC injetadas em animais normais foi realizada com a marcação das células com PKH-26 GL, um componente fluorescente de ligação às células, o qual é incorporado à membrana celular. PKH-26 GL tem sido usado para marcar células “*in vitro*” e para analisar o tráfego celular “*in vivo*”. Os animais receberam 2 injeções de 100µl cada com um total de 2×10^6 MNC marcadas, e as lâminas das artérias lesionadas foram analisadas para a detecção de células fluorescentes. Observamos que, 7 dias após a lesão, os animais que receberam as MNC e foram tratados com DS acumularam 2 vezes mais células marcadas na parede arterial dos que os que não receberam DS (Figura 12). Esse resultado indica que o DS pode estar criando um micro ambiente favorável para a migração dessas células e, talvez, favorecendo a re-endotelização do vaso lesionado ao invés da proliferação de células musculares lisas e formação de neointima.

TABELA 1 – Quantificação das células progenitoras endoteliais presentes na população de células mononucleares obtidas da medula óssea.

Marcador	% células positivas/100.000 células contadas
CD34	1.0 ± 0.39
CD133	0.26 ± 0.22
CD34/CD133	0.033 ± 0.008
VEGFR2	0.001 ± 0
CD34/VEGFR2	0.001 ± 0

Resultados expressas como valores médios ± desvio padrão. n = 6 em duplicata.



D

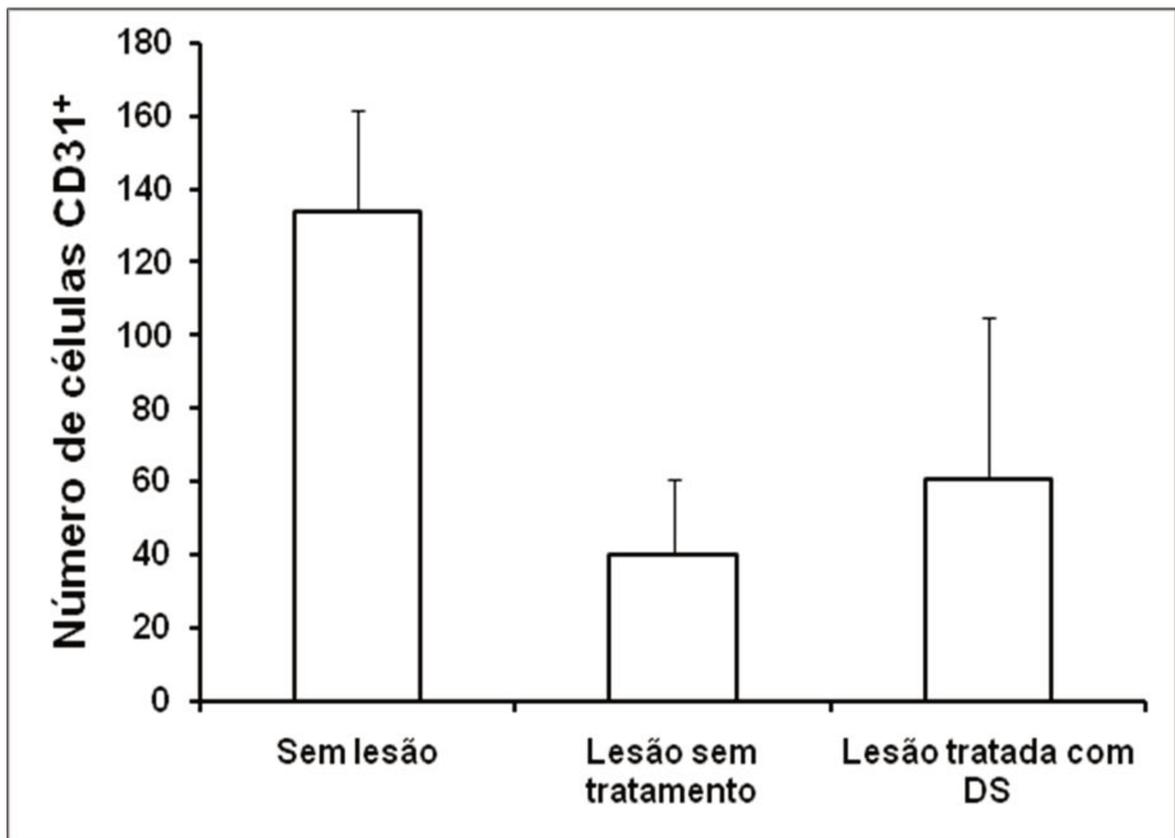


Figura 1 – Extensão da lesão arterial provocada por sonda metálica. Imunofluorescência da artéria carótida usando anticorpo anti-CD31 conjugado com FITC 24 horas após a lesão. (A) Artéria não lesionada. (B) Artéria lesionada de animais sem tratamento. (C) Artéria lesionada de

animais tratados com DS. (D) A quantidade de células CD31 foi determinada através da contagem das mesmas. Resultados expressão como valores médios \pm desvio padrão.

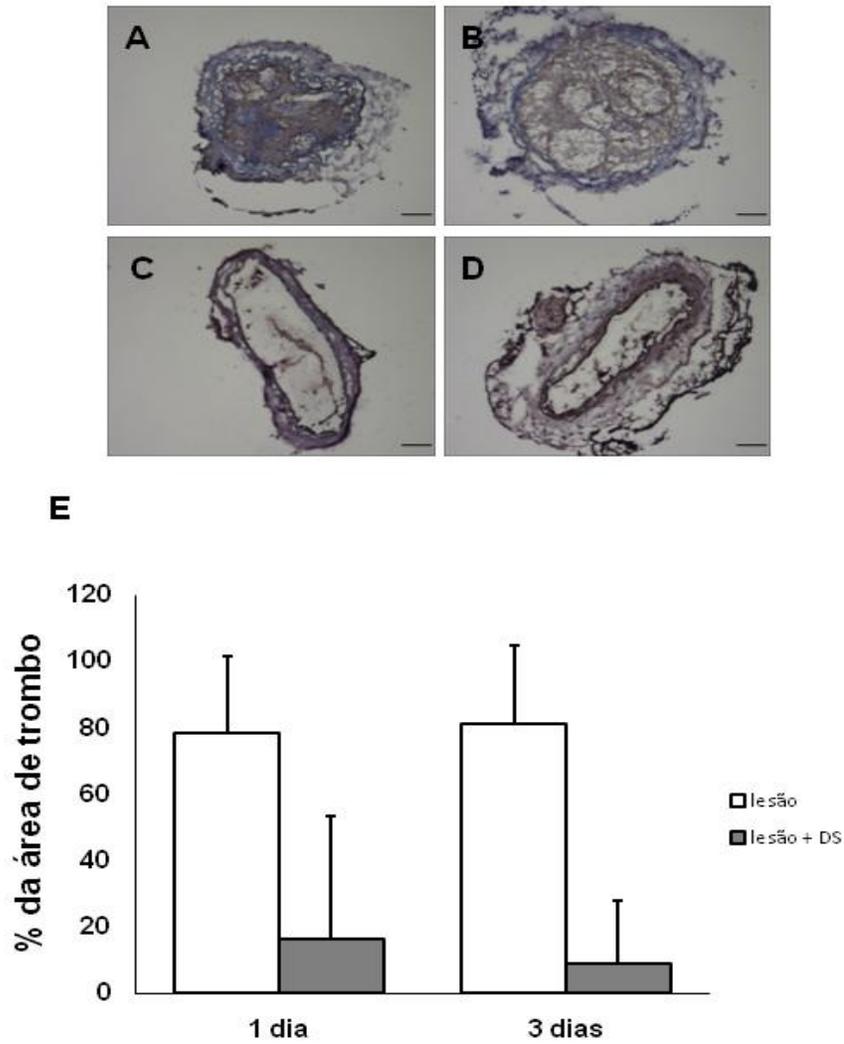


Figura 2 – Formação de trombo 1 ou 3 dias após lesão arterial. Animais normais foram submetidos à lesão arterial, e a formação de trombo analisada 1 ou 3 dias mais tarde usando

anticorpo anti-VWF. (A) Animal não tratado 1 dia após a lesão. (B) Animal não tratado 3 dias após a lesão. (C) Animal tratado com DS 1 dia após a lesão. (D) Animal tratado com DS 3 dias após a lesão. (E) Área do lúmen ocupada pelo trombo expressa como uma porcentagem da área total do lúmen. Áreas expressas como valores médios \pm desvio padrão.

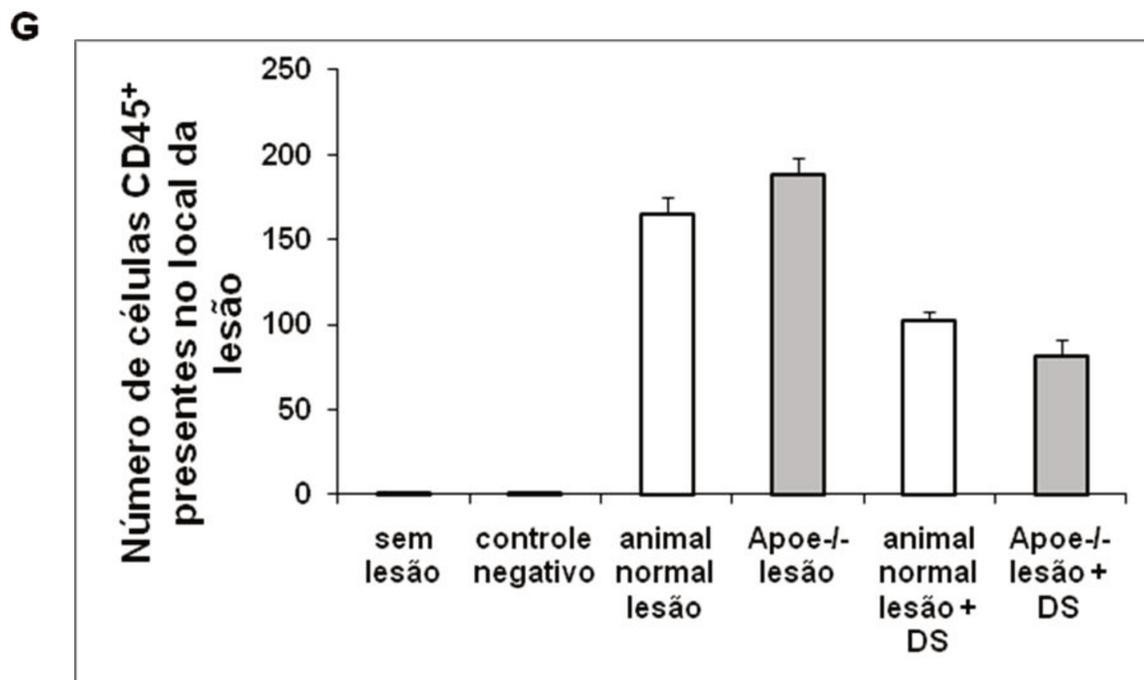
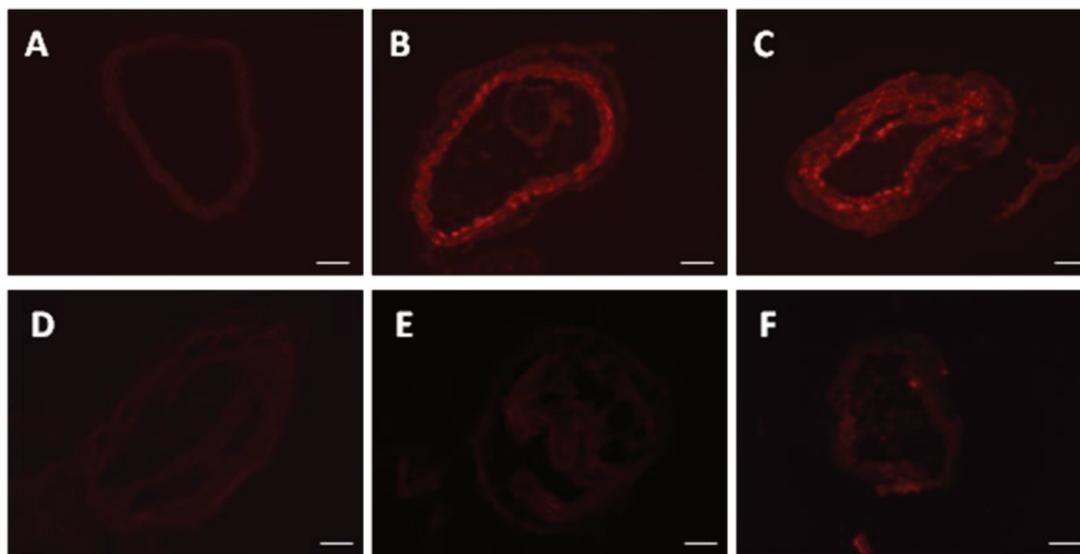


Figura 3 - Migração das células CD45⁺ para o local da lesão arterial em camundongos normais. Os cortes foram preparados a partir da artéria carótida 3 dias após a lesão arterial e incubados com anticorpo anti – CD45, detectado com anticorpo secundário conjugado com PE. (A) Artéria não lesionada. (B) Artéria lesionada sem tratamento. (C) Artéria lesionada tratada com DS. (D)

Artéria não incubada com anticorpo primário – controle negativo. (E) Artéria lesionada ApoE^{-/-} sem tratamento. (F) Artéria lesionada ApoE^{-/-} tratada com DS. (G) Número de células CD45⁺ é expressa em valores médios \pm desvio padrão. Número de células CD45⁺ é expressa em valores médios \pm desvio padrão.

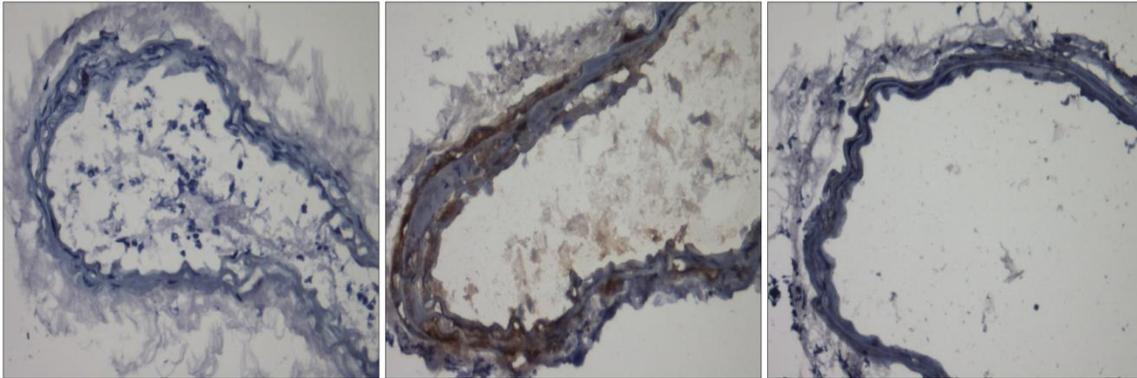


Figura 4 – Expressão da P-selectina em artérias lesionadas. Cortes congelados foram preparados a partir da artéria carótida de animais 1 dia após a injúria. (A) Artéria não incubada com anticorpo primário – controle negativo. (B) Artéria não tratada. (C) Artéria tratada com DS.

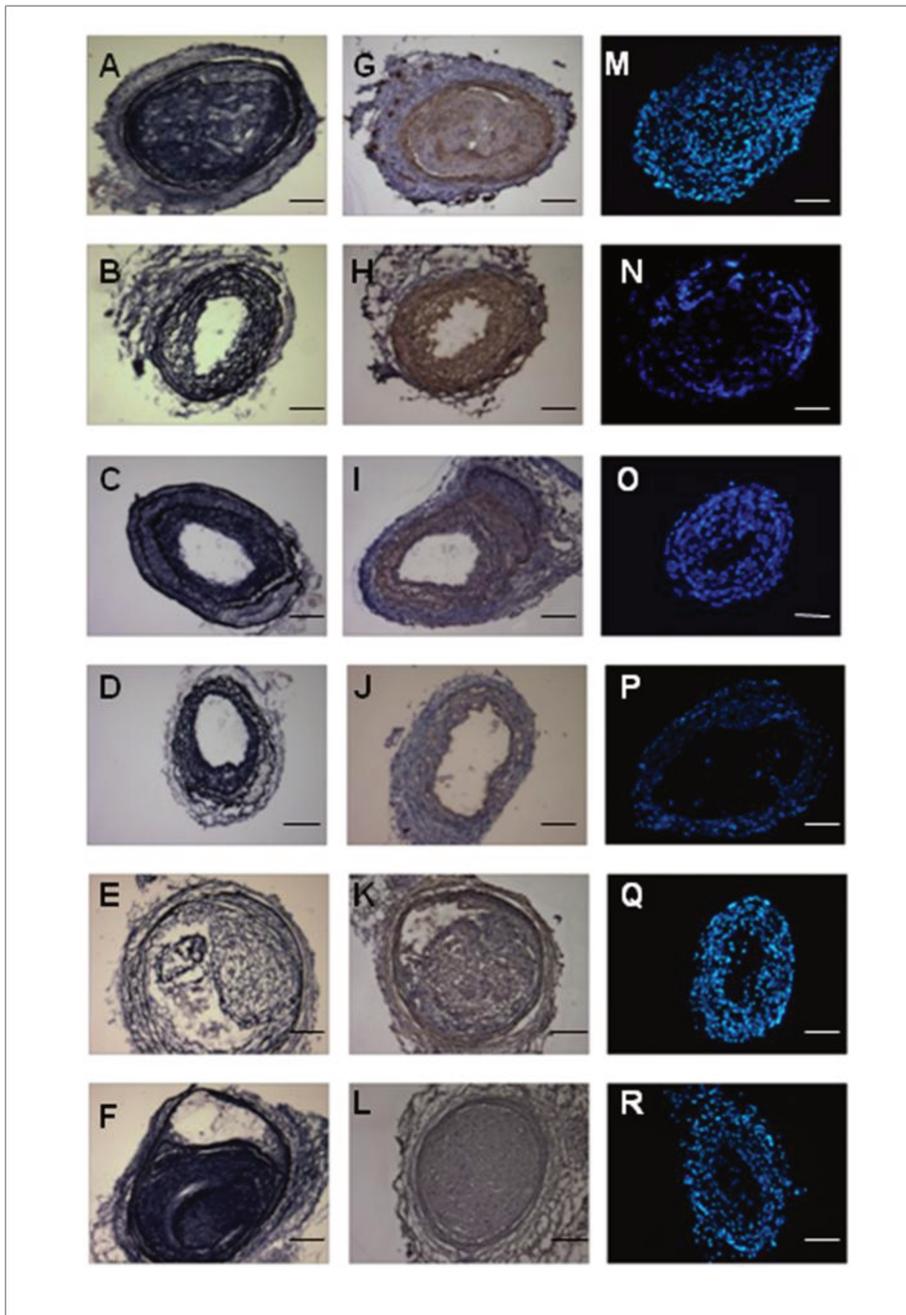


Figura 5– Artérias carótidas de camundongos normais e HCII^{-/-} 21 dias após lesão arterial provocada por sonda metálica. (A-F) Cortes corados com VVG para verificação da lâmina elástica. (G-L) Cortes incubados com anticorpo monoclonal anti- α -actina. (M-R) Cortes corados com DAPI para detecção de núcleos.

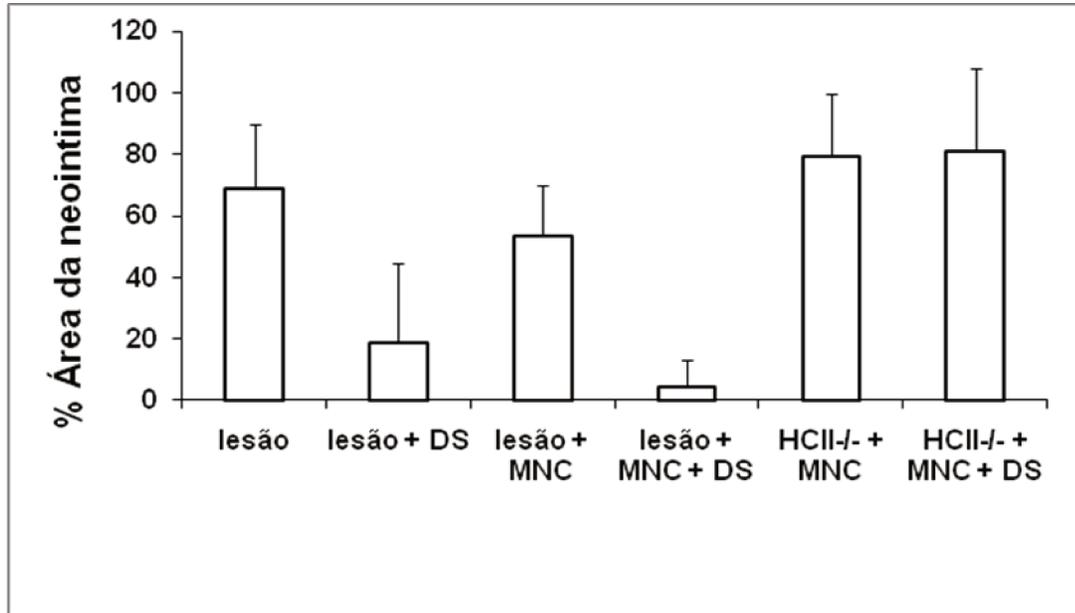
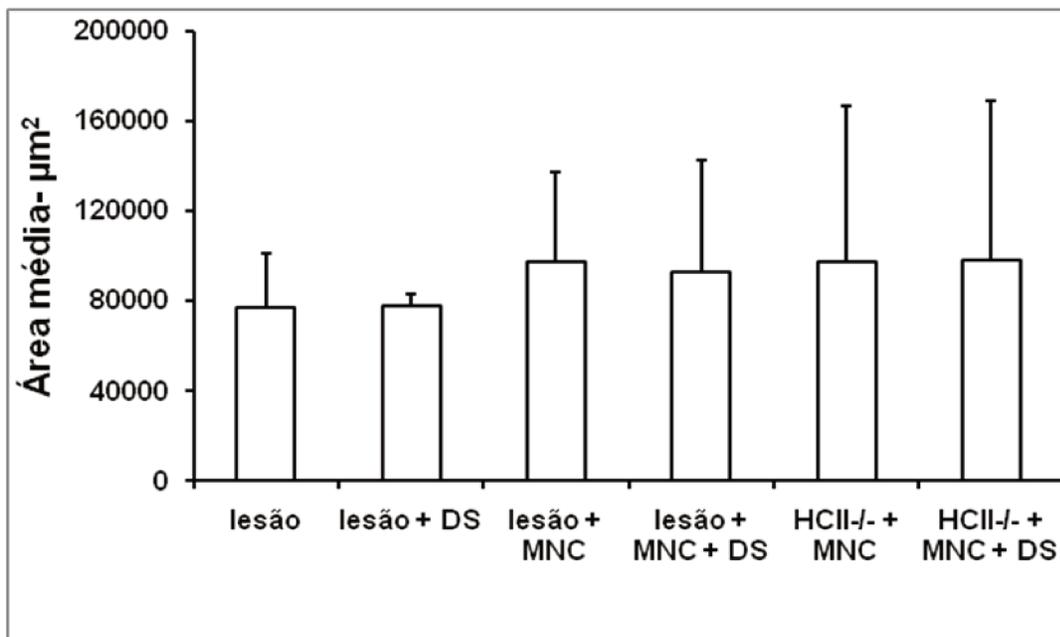
A**B**

Figura 6 – Áreas da neointima e da camada média de artérias carótidas de camundongos normais e HCII^{-/-} 21 dias após lesão arterial. Os cortes foram preparados a partir do experimento 6 e

quantificados como descrito em “Materiais e Métodos”. (A) Porcentagem da área de neointima presente no lúmen. (B) Área da camada média (μm^2). As colunas representam valores médios para cada grupo \pm desvio padrão.

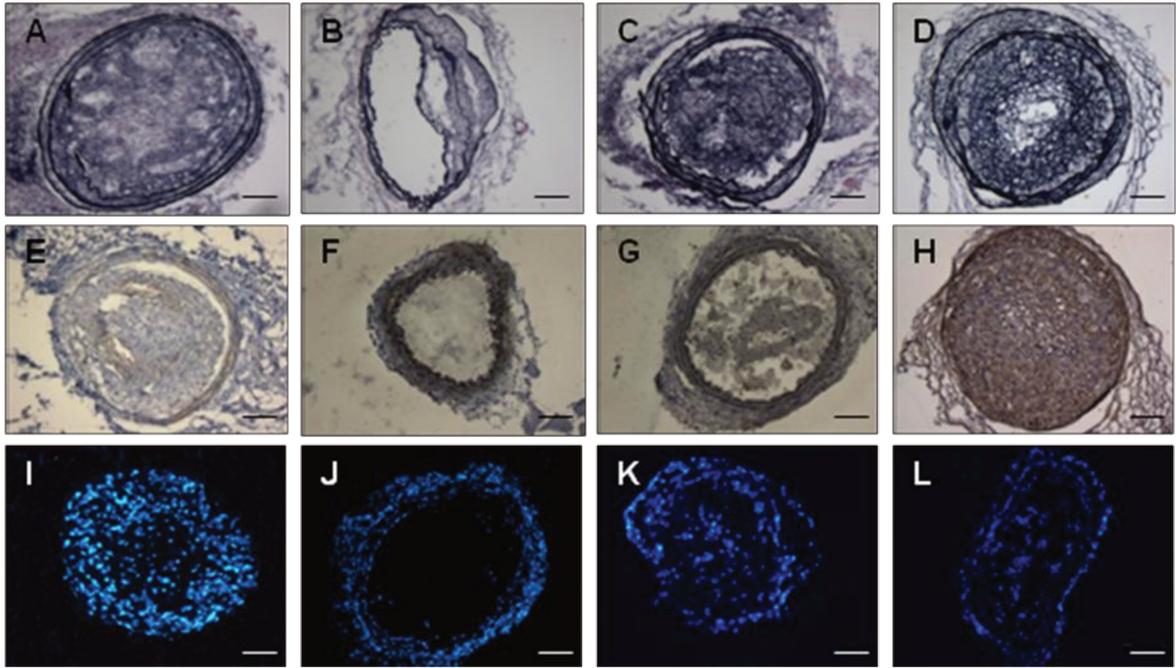


Figura 7 - Artérias carótidas comum de camundongos ApoE^{-/-} 21 dias após lesão endotelial. (A, D) Cortes corados com Verhoeff Van Gieson para lâmina elástica. (E,H) Imunohistoquímica para células musculares lisas utilizando anticorpo anti- α -actina. (I, L) Cortes corados com DAPI para evidenciar os núcleos.

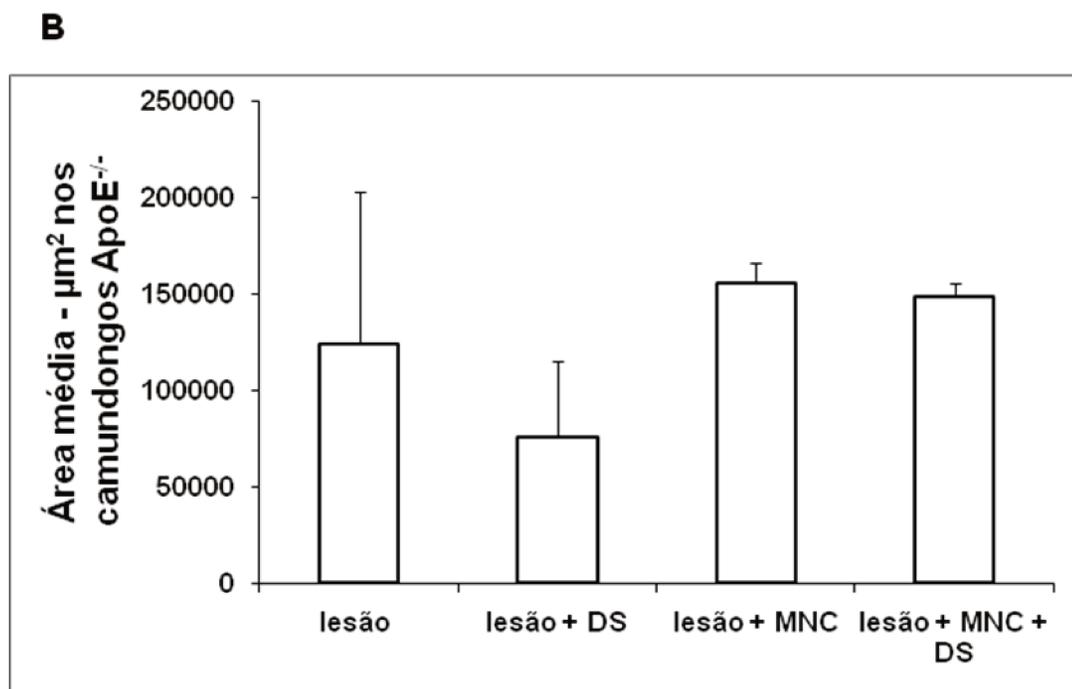
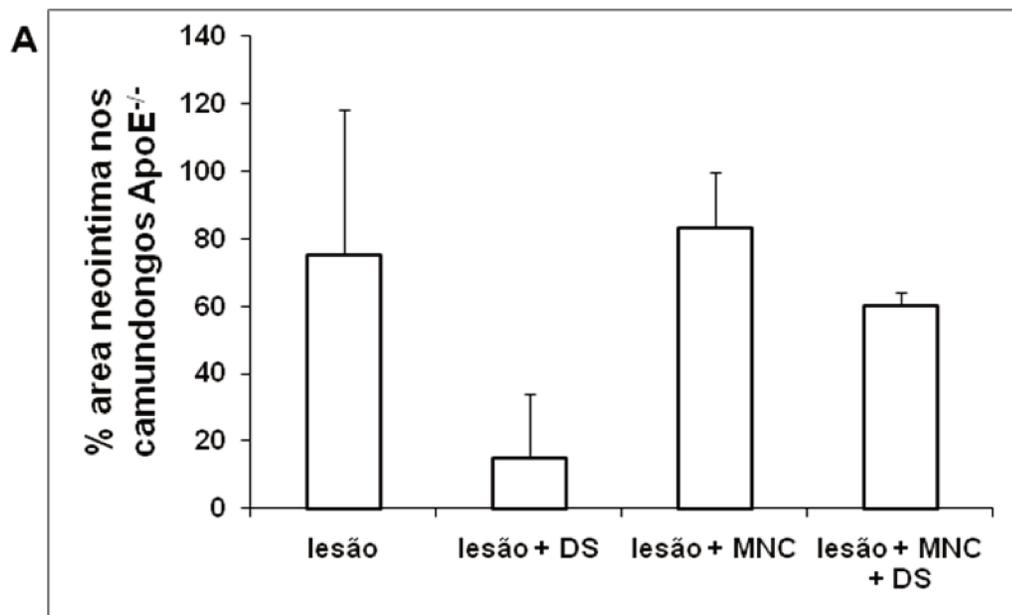


Figura 8 - Áreas de neointima e média de artérias carótidas de camundongos ApoE^{-/-} 21 dias após injúria vascular. (A) Porcentagem de área neointima nos diferentes grupos. (B) Área média. As colunas representam valores médios para cada grupo + Desvio Padrão, n = 6 para cada grupo.

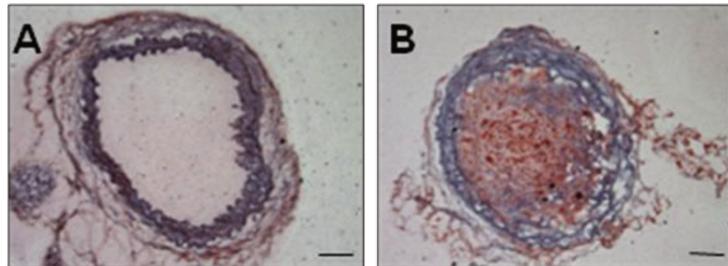


Figura 9 - Artérias carótidas comum coradas com Oil Red O. (A) Artéria de animal normal. (B) Artéria de animal ApoE^{-/-} alimentado com dieta do tipo Western.

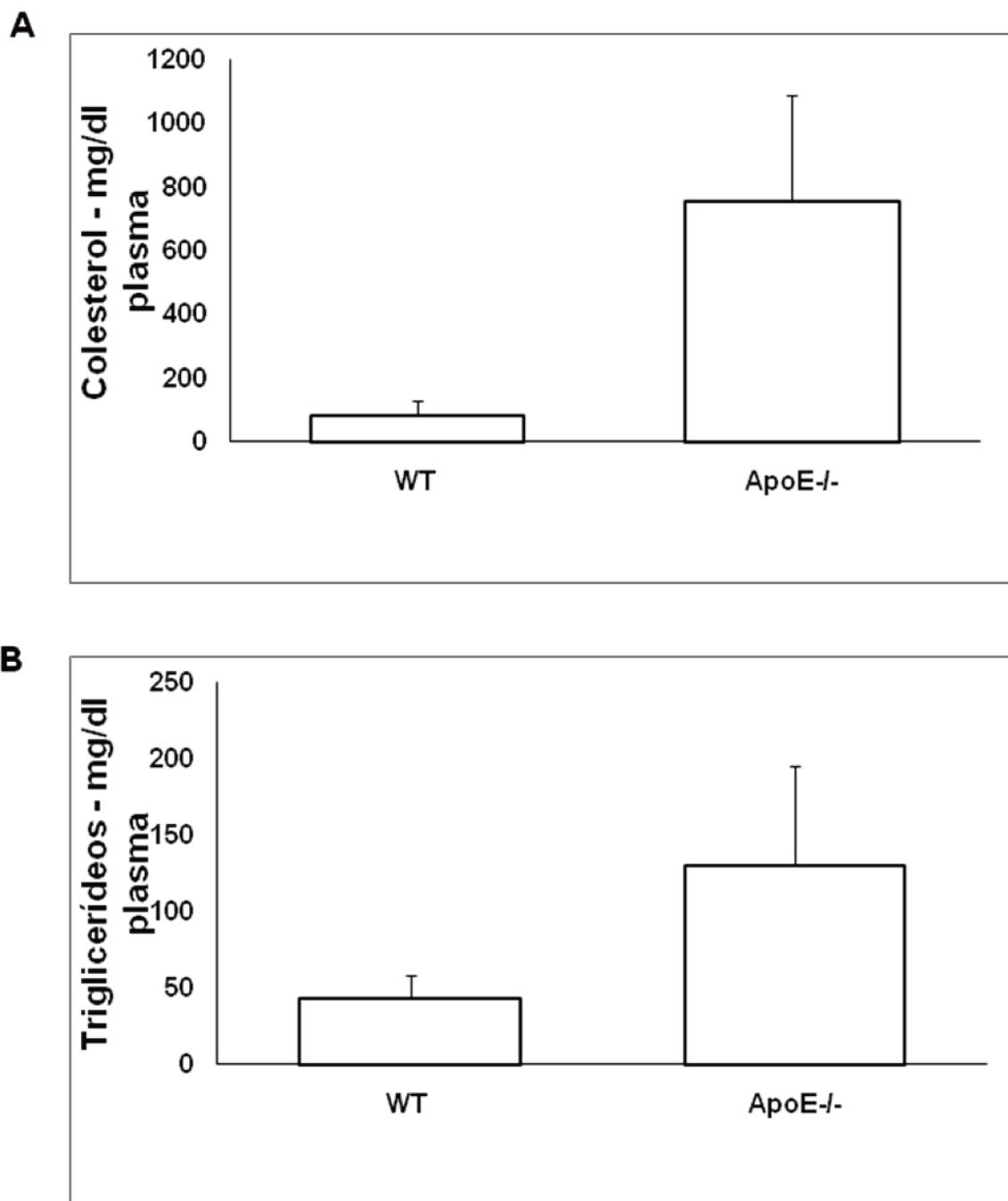


Figura 10 - Quantificação de colesterol total e triglicerídeos por métodos colorimétrico nos animais normais e ApoE^{-/-}. (A) Quantificação de colesterol total (mg/dl plasma). (B) Quantificação de triglicerídeos (mg/dl plasma).

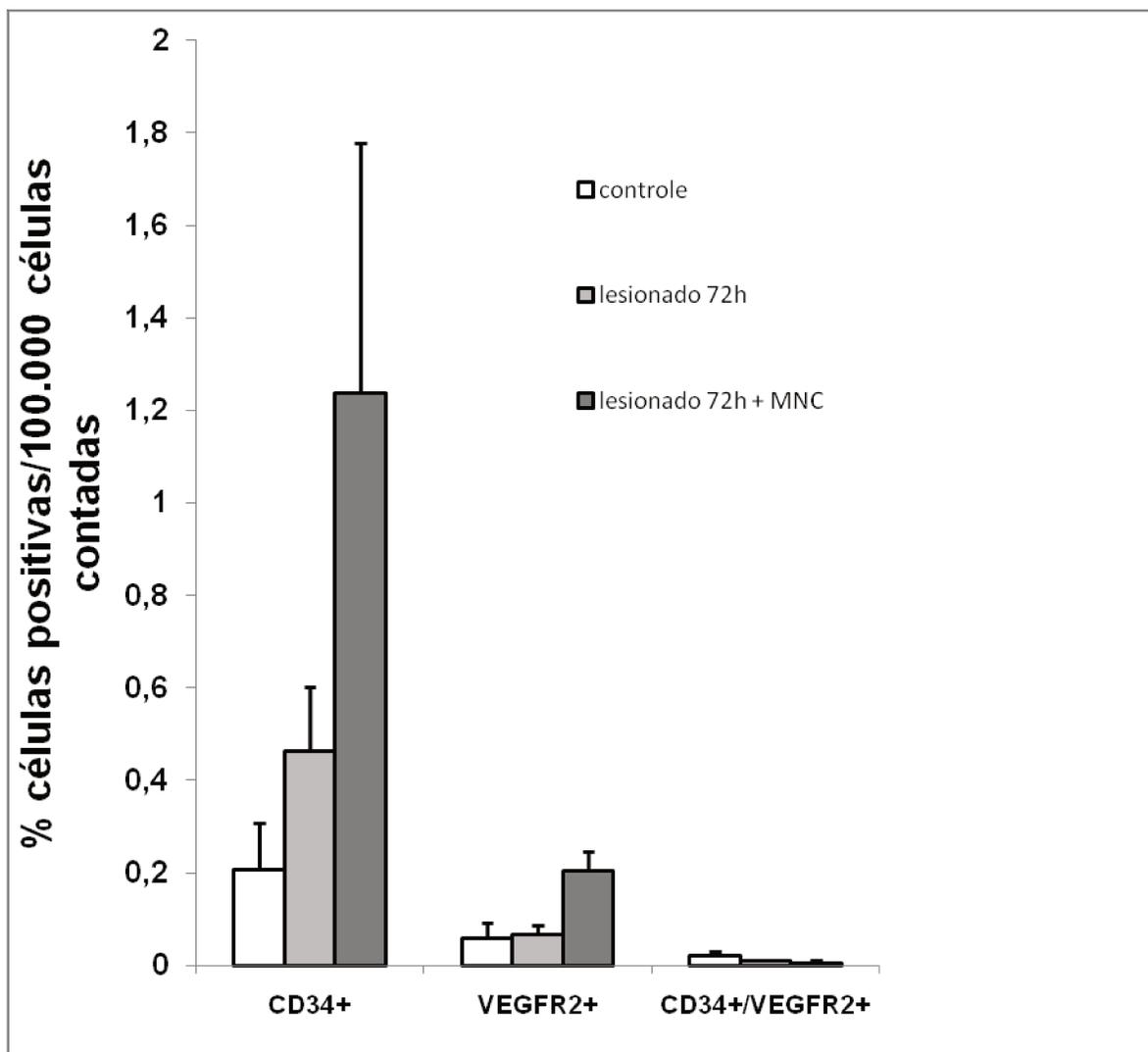


Figura 11 – Citometria de fluxo para quantificação de células CD34⁺, VEGFR2⁺ e CD34⁺/VEGFR2⁺ no sangue periférico. (Controle) Animais não lesionados e não tratados com MNC. (lesionado 72h) Animais lesionados e não tratados com MNC. (lesionado 72h + MNC) Animais lesionados que receberam 2 injeções de MNC. N = 6 em duplicata.

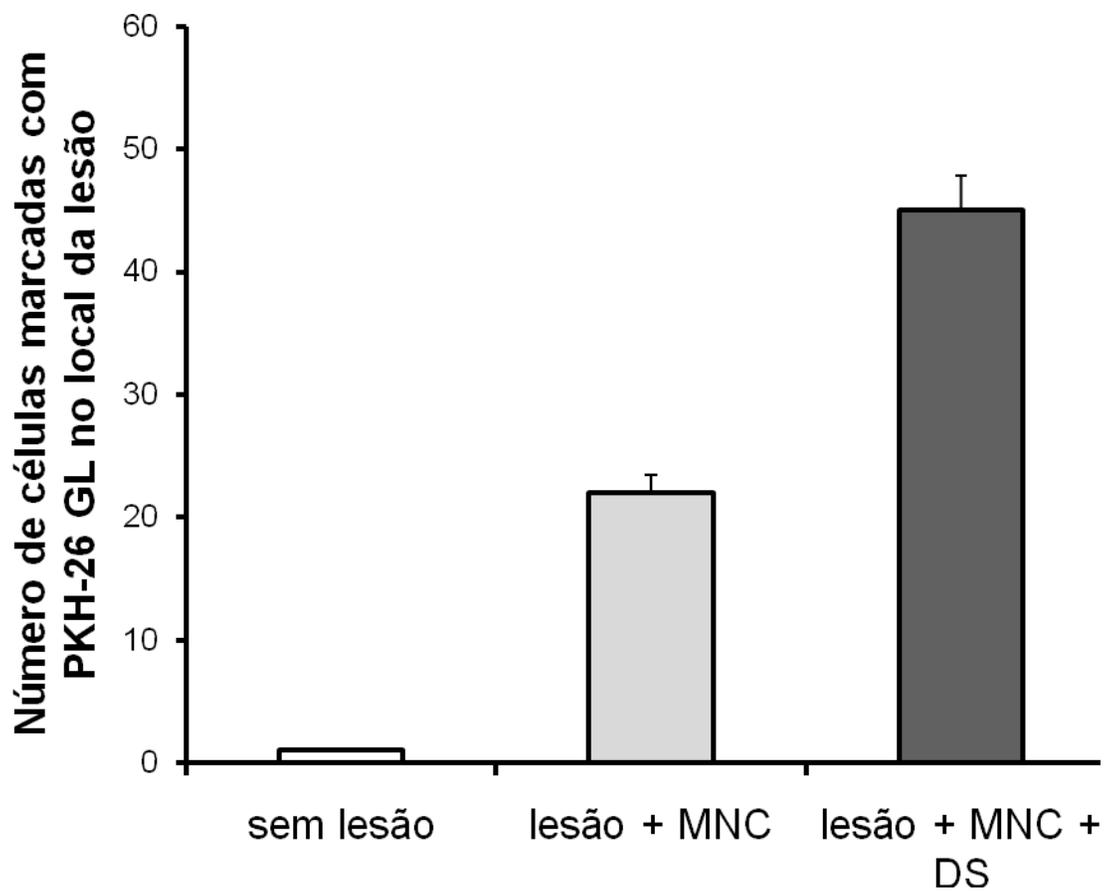


Figura 12 – Migração das MNC marcadas com PKH-26 GL para o local da injúria 7 dias após a lesão. (sem lesão) Animais não lesionados e não tratados com MNC e/ou DS. (lesão + MNC) Animais lesionados que receberam 2 injeções de MNC marcadas. (lesão + MNC + DS) Animais lesionados que receberam 2 injeções de MNC marcadas e 4 injeções de DS.

VIII. DISCUSSÃO

Os mecanismos envolvidos na inibição da inflamação, trombose e formação de neointima pelo DS ainda não estão esclarecidos. Estudos anteriores demonstraram que a administração intravenosa de DS inibe a formação de neointima e que este efeito é dependente da presença de HCII. Também foi observado que a injeção de DS é capaz de inibir a atividade de trombina presente na parede vascular após injúria arterial (Vicente et al., 2007) e que o HCII migra do sangue circulante para a camada adventícia após lesão arterial, onde ele se co-localiza com o DS na parede arterial (He et al., 2008). Além disso, camundongos HCII^{-/-} apresentaram aumento da formação de neointima quando comparados com camundongos normais após injúria arterial.

Asahara et al. (1997) mostraram que apenas as células CD34⁺ e VEGFR2⁺ são capazes de se incorporar à parede vascular de camundongos, ratos e coelhos levando à neovascularização devido à isquemia de patas posteriores. Peichev et al. (Peichev et al., 2000) mostraram que uma pequena população de células CD34⁺ de diferentes fontes também expressam CD133 e VEGFR2. Em nosso trabalho, a injeção de MNC aumentou em 6 vezes a porcentagem de células CD34⁺ circulantes e também em 4 vezes o número de células VEGFR2⁺. Nós não detectamos um aumento no número de células CD34⁺/VEGFR2⁺ no sangue circulante, o que pode ser devido ao tempo de vida dessas células, a viabilidade das mesmas, à migração dessas para o local da injúria ou a diferenciação destas em células mais diferenciadas como CD31⁺/VEGFR2⁺, que não foram inicialmente estudadas em nosso trabalho.

Nesse estudo nós observamos que o tratamento com DS inibiu a formação de trombo nos dias 1 e 3 após injúria nos animais normais e diminuiu a migração de células CD45⁺ para o tecido lesionado 3 dias após a injúria tanto em animais normais como em animais ApoE^{-/-}. Nós também

observamos um redução na expressão de P-selectina nos vasos 1 dia após a lesão nos dois tipos de camundongos estudados. Essa diminuição pode ter ocorrido pela diminuição da ação da trombina sobre o tecido lesionado, devido à um aumento da atividade de HCII estimulado pela presença de DS. DS também pode ter uma ação direta sobre a expressão de P-selectina devido a diminuição da adesão e migração de células inflamatórias no local de injúria.

Estudos recentes demonstraram que a P-selectina tem uma função fundamental na inflamação (Ley, 2003), trombose (Andre, 2004), aterosclerose (Huo et al., 2003) e na formação de neointima após injúria arterial (Manka et al., 2001; Phillips et al., 2003; Manka et al., 2004; Kumar et al., 1997; Smyth et al., 2001). Um estudo com camundongos deficientes em P-selectina demonstrou uma significativa redução na formação de neointima após injúria vascular (Kumar et al., 1997; Smyth et al., 2001), demonstrando uma importante função da P-selectina em resposta à injúria arterial.

A diminuição da resposta inflamatória quando da administração de DS pode estar relacionada com a menor formação de neointima 21 dias após a injúria. A formação de neointima pode ser devida à proliferação de células musculares lisas originadas da camada média, no entanto, observamos em nosso trabalho que em todas as situações estudadas as áreas médias não sofreram mudanças significativas após a injúria arterial. Isso pode indicar que as células musculares lisas que compõe a neointima, provavelmente, se originam da circulação sanguínea.

Um grande número de pesquisas envolvendo a transferência de células da medula óssea e de células progenitoras endoteliais em pacientes com doenças isquêmicas do coração mostraram uma melhora na performance cardíaca (Britten et al., 2003; Kang et al., 2004; Wollert et al., 2004). Entretanto, tanto as células da medula óssea como as células progenitoras endoteliais

apresentam uma origem mononuclear com propriedades pró-inflamatórias, o que pode influenciar no tamanho da neointima.

Estudo prévio (Werner et al., 2003) mostrou que a administração intravenosa de MNC aumentou a reendotelização mas nós observamos apenas uma diminuição discreta na formação de neointima nos animais normais que receberam apenas MNC. Em nosso trabalho observamos que a inibição de formação de neointima quando da injeção de MNC foi maior nos animais normais que receberam concomitantemente DS. Nos animais ApoE^{-/-}, tanto os que receberam apenas MNC como os que receberam MNC junto com DS, não houve diminuição da formação de neointima.

É notável que apesar do grande potencial angiogênico evidenciado por um número significativo de células progenitoras endoteliais quando comparado com células da medula óssea, ambas apresentam propriedades pró-aterogênicas similares “in vivo”. As propriedades pró-inflamatórias expressas pelas células transferidas podem contribuir para o aumento da aterogênese. Nesse contexto, dois estudos merecem atenção: Kang et al. (2004) ao injetar leucócitos contendo aproximadamente 1×10^8 células CD34⁺ em humanos que sofreram infarto do miocárdio, observou que apesar da melhora da perfusão e função cardíacas, houve uma alta taxa de restenose; um outro estudo feito por Yoon et al. (2004) observou calcificação intramiocárdica em ratos que receberam células da medula óssea, sugerindo um envolvimento direto das células injetadas nesse processo. Esses dados são consistentes com as observações de Sata et al. (2002), onde observou-se que um número significativo de células musculares lisas eram derivadas das células da medula óssea injetadas em modelos experimentais.

Uma explicação para a restenose aumentada nos animais ApoE^{-/-} poderia ser a diferenciação de células progenitoras em células musculares lisas no local da lesão (Kang et al., 2004). Como Sata et al (2002) mostrou, as células-tronco poderiam contribuir para a remodelação patológica da artéria através da diferenciação em células musculares lisas. Uma outra explicação seria a angiogênese induzida dentro da lesão aterosclerótica e agregação de células inflamatórias mobilizadas para dentro da placa, como o observado por Kang et al (2004) em uma espécime de arteriotomia de lesão restenótica.

Os animais ApoE^{-/-} tratados com MNC em conjunto com DS também não apresentaram melhora do quadro, com uma não inibição da formação de neointima. Uma explicação para tal fato é que o DS é mais abundante em placas ateroscleróticas do que nas normais, mas sua estrutura é alterada, reduzindo sua habilidade em se ligar ao HCII (Shirk et al., 2000). Um estudo usando ApoE^{-/-} onde se injetou células provenientes da medula óssea mostrou um aumento em tamanho na placa de ateroma (George et al., 2005); com isso, pode-se sugerir que as MNCs utilizadas aqui podem ter contribuído para o aumento das placas de ateroma, o que consequentemente altera a estrutura do DS, reduzindo a eficácia do tratamento.

Nós observamos que nos animais normais onde se injetou MNC junto com a administração de DS, houve o dobro de MNC presentes no local da injúria. Talvez o DS esteja atuando na diminuição da formação de trombo e na reação inflamatória inicial, além de, provavelmente, estar criando um ambiente atrativo para as EPC circulantes, estimulando sua migração e adesão ao local da injúria e promovendo a reendotelização ao invés da restenose.

O efeito inibitório do DS, quando administrado isoladamente, na formação de neointima nos grupos analisados pode indicar que este glicosaminoglicano pode ter aplicações terapêuticas futuras no tratamento de doenças vasculares, prevenindo a restenose após cirurgias vasculares.

A utilização de células progenitoras endoteliais ou células provenientes da medula óssea merece um estudo mais profundo quando da sua utilização em animais com doenças vasculares em estágio mais avançado. É necessário o esclarecimento de processos como mobilização, diferenciação e proliferação dessas células com o objetivo de se evitar conseqüências negativas nesse tipo de procedimento terapêutico.

IX. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS

O dermatan sulfato inibiu a reação inflamatória inicial, seja pela diminuição da presença de células inflamatórias como pela diminuição da presença da proteína (P-selectina). Com isso, o dermatan sulfato pode ser utilizado como um medicamento anti-inflamatório na resposta aguda à lesão.

1- O dermatan sulfato se mostrou também ser um agente antitrombótico, diminuindo a formação de trombo nas primeiras 72 horas após a lesão. Ele também pode ser um substituto à atual terapia com heparina com a vantagem de não provocar possíveis hemorragias.

2- O dermatan sulfato decresceu de maneira significativa a formação de neointima tanto em animais normais como em animais deficientes em ApoE submetidos à lesão endotelial, sugerindo o uso desse agente após cirurgias vasculares.

3- A terapia celular, feita com células provenientes da medula óssea, se mostrou ser efetiva nos camundongos normais (tanto isoladamente como em combinação com o dermatan sulfato), sugerindo que essas células possam estar participando de uma possível recuperação endotelial.

4- O tratamento conjunto de células mononucleares com dermatan sulfato mostrou ser bastante significativo nos animais normais, evidenciando o papel do dermatan sulfato na migração dessas células para o local da injúria.

5- A terapia celular em animais deficientes em ApoE não foi eficaz (tanto isoladas como em conjunto com dermatan sulfato), sugerindo que a presença de placas de ateroma, níveis altos de colesterol total e triglicérides podem influenciar na migração, proliferação e diferenciação dessas células no local da lesão; além disso, esses fatores também induzem a alteração na molécula de dermatan sulfato, reduzindo sua eficácia.

X. CONCLUSÕES

Este estudo forneceu evidências de que o dermatan sulfato pode ser um possível agente anti-trombótico, anti-inflamatório e preventivo da formação de neointima e restenose após a lesão arterial. Observamos também que a terapia celular deve ser melhor analisada antes da aplicação em seres humanos. Devemos analisar quais os mecanismos influenciam na migração, proliferação e diferenciação dessas células, antes de utilizarmos células da medula óssea na terapia celular para o tratamento de lesões arteriais que ocorrem em pacientes com aterosclerose em estado avançado. Já que outros fatores além do baixo número de células progenitoras endoteliais podem estar relacionados com a capacidade de recuperação do endotélio a partir de células captadas da circulação sanguínea como as células progenitoras endoteliais.

XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andre P. P-selectin in haemostasis. **Br J Haematol** 126: 298-306, 2004.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, VanderZee R, Li T, Wittzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor cells for angiogenesis. **Science** 275 (5302): 964-967, 1997.

Belmiro CL, Castelo-Branco MT, Melin LM, Schanaider A, Elia C, Madi K, Pavão MS, de Souza HS. Unfractionated heparin and new heparin analogues from ascidians (chordate-tunicate) ameliorate colitis in rats. **J Biol Chem** 284 (17): 11267-78, 2009.

Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Schächinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. **Circulation** 108 (18): 2212-2218, 2003.

Buchanan MR, Brister SJ. Inhibition of chronic vessel wall intimal hyperplasia following acute anticoagulant treatment: relative effects of heparin and dermatan sulphate. **Thromb. Res.** 91 (4): 157-167, 1998.

Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. **Blood** 91 (10): 3527-3561, 1998.

Coughlin SR. Protease-activated receptors in the cardiovascular system. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** 67: 197-208, 2002.

Curtiss LK, Boisvert WA. Apolipoprotein E and atherosclerosis. **Curr Opin Lipidol** 11 (3): 243-251, 2000.

Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ, Walley VM, Edwards WD, Schwartz RS, Virmani R. Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. **Circulation** 99 (1): 44-52, 1999.

Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Veltri L, Ricci D, Nobuyoshi M, Cleman M, Heuser R, Almond D, Teirstein PS, Fish RD, Colombo A, Brinker J, Moses J, Shakhovich A, Hirshfeld J, Bailey S, Ellis S, Rake R, Goldberg S. A randomized comparison of coronary stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. **New Eng J Med** 331 (8): 496-501, 1994.

Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. **Blood** 95 (10): 3106-3112, 2000.

George J, Afek A, Abashidze A, Schmilovich H, Deustsch V, Kopolovich J, Miller H, Keren G. Transfer of endothelial progenitor and bone marrow cells influence atherosclerotic plaque size and composition in apolipoprotein E knockout mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 25 (12): 2636-2641, 2005.

Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+) AC133 (+) endothelial precursor cells. **Circ Res** 88 (2): 167-174, 2001.

Gotlieb AI. Atherosclerotic and acute coronary syndromes. **Cardiovasc Pathol** 14 (4): 181-184, 2005.

Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 24 (2): e13-e18, 2004.

Havel RJ. Biology of cholesterol, lipoproteins and atherosclerosis. **Clin Exp Hypertens** 11 (5-6): 887-900, 1989.

He L, Giri TK, Vicente CP, Tollefsen DM. Vascular dermatan sulfate regulates the antithrombotic activity of heparin cofactor II. **Blood** 111 (8): 4118-4125, 2008.

Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. **Proc Natl Acad Sci USA** 92 (26): 12240-4, 1995.

Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells – mobilization, differentiation and homing. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 23 (7): 1185-1189, 2003.

Hristov M, Weber C. Progenitor cell trafficking in the vascular wall. **J. Thromb. Haemost.** 7 (Suppl. 1): 31-34, 2009.

Hu Y, Davison F, Zhang Z, Xu Q. Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. **Circulation** 108 (25): 3122-7, 2003.

Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littman DR, Weber C, Ley K. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. **Nat Med** 9: 61-67, 2003.

Insull, W. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. **Am. J. Med.** 122: s3-s14, 2009.

Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, Kim YJ, Soo Lee D, Sohn DW, Han KS, Oh BH, Lee MM, Park YB. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells

mobilized with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomized clinical trial. **Lancet** 363 (9411): 751-756, 2004.

Kumar A, Hoover JL, Simmons CA, Lindner V, Shebuski RJ. Remodeling and neointimal formation in the carotid artery of normal and P-selectin-deficient mice. **Circulation** 96: 4333–4342, 1997.

Lacaud G, Kouskoff V, Trumble A, Schwantz S, Keller G. Haploinsufficiency of Runx1 results in the acceleration of mesodermal development and hemangioblast specification upon in vitro differentiation of ES cells. **Blood** 103 (3): 886-889, 2004.

Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med*, v.9, p.263-268, 2003.

Liaw PC, Becker DL, Stafford AR, Fredenburgh JC, Weitz JI. Molecular basis for the susceptibility of fibrin-bound thrombin to inactivation by heparin cofactor II in the presence of dermatan sulfate but not heparin. **J Biol Chem** 276 (24): 209590-20965, 2001.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature** 420 (6917): 868-874, Dec 26 2002.

Manka D, Collins RG, Ley K, Beaudet AL, Sarembock IJ. Absence of P-selectin, but not intercellular adhesion molecule-1, attenuates neointimal growth after arterial injury in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation** 103: 1000-1005, 2001.

Manka D, Forlow SB, Sanders JM, Hurwitz D, Bennett DK, Green SA, Ley K, Sarembock IJ. Critical role of platelet P-selectin in the response to arterial injury in apolipoprotein-E-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 24: 1124–1129, 2004.

McGuire EA, Tollefsen DM. Activation of heparin cofactor II by fibroblasts and vascular smooth muscle cells. **J Biol Chem** 262 (1): 169-175, 1987.

Miller, NE. Coronary atherosclerosis and plasma lipoproteins: epidemiology and pathophysiology considerations. **J Cardiovasc Pharmacol** 4 (suppl.2): S190-S195, 1982.

Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization and molecular cloning. **Blood** 90 (12): 5013-21, 1997.

Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu ZP, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MAS, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. **Blood** 95 (3): 952-958, 2000.

Pendse AA, Arbones-Mainar JM, Johnson LA, Altenburg MK, Maeda N. Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome and beyond. **J Lipid Res** 50: S178-82, 2009.

Phillips JW, Barringhaus KG, Sanders JM, Hesselbacher SE, Czarnik AC, Manka D, Vestweber D, Ley K, Sarembock IJ. Single injection of P-selectin or P-selectin glycoprotein ligand-1 monoclonal antibody blocks neointima formation after arterial injury in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation** 107: 2244–2249, 2003.

Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell** 71 (2): 343-353, 1992.

Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Delilieri GL. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133 (+) cells. **British J Haematol** 115 (1): 186-194, 2001.

Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, Phippen AM, Annex BH, Dong C, Taylor DA. Aging, progenitor cell exhaustion and atherosclerosis. **Circulation** 108 (4): 457-63, 2003.

Roberts N, Jahangiri M, Xu QB. Progenitor cells in vascular disease. **J Cell Mol Med** 9 (3): 583-591, 2005.

Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. **Nat Med** 8 (4): 403-409, 2002.

Sehayek E, Shefer S, Nguyen LB, Ono JG, Merkel M, Breslow JL. Apolipoprotein E regulates dietary cholesterol absorption and biliary cholesterol excretion: studies in C57BL6 apolipoprotein E knockout mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 97 (7): 3433-3437, 2000.

Serruys PW, Dejaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P, Belardi J, Sigwart U, Colombo A, Goy JJ, Vandenneuvel P, Delcan J, Morel MA. A comparison of balloon expandable stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. **New Eng J Med** 331 (8): 489-495, 1994.

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

Shirk RA, Parthasarathy N, San Antonio JD, Church FC, Wagner WD. Altered dermatan sulfate structure and reduced heparin cofactor II-stimulating activity of biglycan and decorin from human atherosclerotic plaque. **J Biol Chem** 275 (24): 18085-18092, 2000.

Smyth SS, Reis ED, Zhang W, Fallon JT, Gordon RE, Coller BS. Beta(3)-integrin-deficient mice but not P-selectin-deficient mice develop intimal hyperplasia after vascular injury: correlation with leukocyte recruitment to adherent platelets 1 hour after injury. **Circulation** 103: 2501-2507, 2001.

Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis – novel insights into plaque formation and destabilization. **Stroke** 37 (7): 1923-1932, 2006.

Tollefsen DM, Pestka CA. Heparin cofactor II activity in patients with disseminated intravascular coagulation and hepatic failure. **Blood** 66: 769-774, 1985.

Tollefsen DM. Heparin cofactor II modulates the response to vascular injury. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 27 (3): 454-460, 2007.

Tovar AMF, de Mattos DA, Stelling MP, Sarcinelli-Luz BSL, Nazareth RA, Mourão, PAS. Dermatan sulfate is the predominant antothrombotic glycosaminoglycan in vessel walls: implications for a possible physiological function of heparin cofactor II. **Bioch Bioph Acta – Mol Basis Disease** 1740 (1): 45-53, 2005.

Tracy RP. Thrombin, inflammation and cardiovascular disease – an epidemiologic perspective. **Chest** 124 (3): 49S-57S, 2003.

Trowbridge JM, Gallo RL. Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. **Glycobiol** 12 (9): 117R-125R, 2002.

Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells – Characterization and role in vascular biology. **Circ Res** 95 (4): 343-353, 2004.

Vajkoczy P, Blum S, Lamparter M, Mailhammer R, Erber R, Engelhardt B, Vestweber D, Hatzopoulos AK. Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. **J Exp Med** 197 (12): 1755-65, 2003.

Vicente CP, He L, Pavão MS, Tollefsen DM. Antithrombotic activity of dermatan sulfate in heparin cofactor II deficient mice. **Blood** 104 (13): 3965-3970, 2004.

Vicente CP, He L, Tollefsen DM. Accelerated atherogenesis and neointima formation in heparin cofactor II deficient mice. **Blood** 110 (13): 4261-7, 2007.

Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. Statin therapy accelerates reendothelialization – A novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow derived endothelial progenitor cells. **Circulation** 105 (25): 3017-3024, 2002.

Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Bohm M, Dirnagl U, Nickenig G. Bone marrow derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation – Effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 22 (10): 1567-1572, 2002.

Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Bohm M, Nickenig G. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. **Circ Res** 93 (2): E17-E24, 2003.

Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. **N Engl J Med** 353 (10): 999-1007, 2005.

Werner N, Nickenig G. Clinical and therapeutical implications of EPC biology in atherosclerosis. **J Cell Mol Med** 10 (2): 318-332, 2006.

Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breindenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomized controlled clinical trial. **Lancet** 364 (9429): 141-148, 2004.

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature** 407 (6801): 242-248, 2000.

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. **Blood** 90 (12): 5002-12, 1997.

Yoon YS, Park JS, Tkebuchava T, Luedeman C, Losordo DW. Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. **Circulation** 109 (25): 3154-3157, 2004.

Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. **Science** 258 (5081): 468-471, 1992.

Zhu B, Kuhel DG, Witte DP, Hui DY. Apolipoprotein E inhibits neointimal hyperplasia after arterial injury in mice. **Am J Pathol** 157 (6): 1839-1848, 2000.

XII. DECLARAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA

DECLARAÇÃO

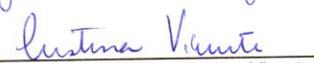
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado intitulada " Efeito do dermatan sulfato na inflamação, trombose, formação da neointima e migração das células da medula óssea após lesão arterial em camundongos":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(x) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*: O Efeito do Dermatan sulfato na mobilização, adesão, e diferenciação de células progenitoras endoteliais: uma alternativa terapêutica para injúria arterial?, sob Protocolo(s) nº __1243-1.

** Caso a Comissão seja externa à 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.*


Aluna: Juliana Aparecida Preto de Godoy


Orientadora: Cristina Pontes Vicente

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido () Indeferido


Nome:
Função:

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/IB - UNICAMP