

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ANDREA KUHNL**

**DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA DE  
RATOS WISTAR EM CÉLULAS ENDOTELIAIS.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

CURITIBA

2010

ANDREA KUHNL

**DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA DE  
RATOS WISTAR EM CÉLULAS ENDOTELIAIS.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman.  
Co-orientadora: Dra. Alexandra Cristina Senegaglia.

CURITIBA

2010

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Andrea Kuhl.

DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA DE RATOS WISTAR EM CÉLULAS ENDOTELIAIS.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

BANCA EXAMINADORA:

---

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman.

---

Co-orientadora: Dra. Alexandra Cristina Senegaglia.

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Mayora Aita.

---

Dr. Alejandro Correa Dominguez.

Aprovada em: xx/xx/2010.

A vocês pais, **Evaldo e Regina**, que nunca desistiram de mim,  
compartilho a busca desta conquista que não será só minha,  
pois sem seus apoios eu não teria conseguido.

## AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus, que nunca me abandonou e que sempre me manteve no caminho da luz mesmo nos momentos de dificuldade.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado, colaborando para meu desenvolvimento profissional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman, por seu comprometimento e apoio no desenvolvimento desta dissertação de Mestrado.

À minha co-orientadora Dra. Alexandra Cristina Senegaglia, por toda sua paciência e atenção. Obrigada por seus conselhos, por suas correções, pois assim meu desenvolvimento profissional teve muito mais valor.

À equipe do Laboratório Experimental de Cultivo Celular, nas pessoas de Paula Hassen e Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto, por todo auxílio e atenção. Em especial à Fabiane Barchiki, por sua coragem no trabalho com os animais envolvidos neste estudo, pois sem seus apoios eu não teria realizados meus experimentos. Aos novos integrantes, Tamara Borgonovo, Valderez Ravaglio Jamur, Lidiane Maria Boldrini e Luis Francisco de Vasconcelos Beja, por seu incentivo.

À Profa. Márcia Olandoski pela análise estatística dos dados.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mayora Aita, por sua colaboração na interpretação de dados.

Ao Instituto Carlos Chagas e seus pesquisadores, pela parceria na utilização de recurso, possibilitando assim a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste, mas principalmente às estagiárias Sheyla Trefflich, Flavia Christina dos Santos, Letícia

Fracaro e Manuela Mazalli e ao técnico Rafael Zotz pelo pronto atendimento no biotério.

Agradeço o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ (552233/2005-6) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (PROSUP modalidade II).

A todos os meus amigos e familiares, que pacientemente participaram dos momentos pelos que passei no período deste trabalho agradeço pelo incentivo, paciência e carinho. E principalmente agradeço por não me deixarem desistir.

## RESUMO

**Introdução:** As células progenitoras endoteliais possuem potencial de diferenciação em células endoteliais e são importantes no reparo vascular. O número destas células, independente da fonte, é muito pequeno; possivelmente não sendo suficiente para a reparação natural. Em humanos o principal marcador para caracterização destas células é o CD133, sendo em roedores conhecido como prominina. Análises filogenéticas deste marcador demonstram que ele faz parte de um grupo de genes ortólogos entre humanos e roedores. Apesar desta homologia o anticorpo anti-CD133 humano não reage com o antígeno CD133 de ratos. Por não existir um anticorpo comercial para rato deste marcador sugere-se então, uma seleção de células progenitoras endoteliais de ratos por meio da utilização conjunta do meio de cultivo com fatores de crescimento indutores para essa linhagem específica. Os fatores de crescimento atuam na estimulação da angiogênese e da divisão celular, na modulação da diferenciação e na indução da síntese de proteínas. **Objetivos:** Expandir e diferenciar células mononucleares da medula óssea de ratos Wistar em células semelhantes às endoteliais, utilizando meio de cultivo com fatores de crescimento. **Método:** A medula óssea foi primeiramente isolada para a obtenção das células mononucleares. Na seqüência, foi tentado realizar a purificação com micropérolas magnéticas acopladas ao anticorpo anti CD133<sup>+</sup> da suspensão celular obtida da medula óssea dos ratos. Foram feitas análises por citometria de fluxo das células pré e pós-purificação. Posteriormente, novas amostras de medula óssea foram coletadas dos membros inferiores de 15 ratos Wistar machos. As células mononucleares foram isoladas por gradiente de densidade e cultivadas em dois grupos. Grupo 1 com meio DMEM suplementado com fatores de crescimento (b-FGF, IGF-I e VEGF) e soro bovino fetal, e grupo 2 apenas com meio DMEM e soro bovino fetal. As células foram caracterizadas por citometria de fluxo pré e pós-cultivo. **Resultados:** Os marcadores utilizados para caracterizar as células provenientes da medula óssea de ratos Wistar, exceto o CD105, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas pré e pós-purificação. As análises dos marcadores CD14, CD34, CD45, CD90, CD31 e CD144, foram respectivamente para o grupo de células mononucleares; 0,46; 57,44; 73,82; 1,10; 0,07 e 0,69; e para o grupo de células cultivada com fatores; 0,80; 15,68; 10,86; 1,64; 0,09 e 1,18. Ao final de 32 dias de cultivo a média de células obtidas foi de  $0,25 \times 10^6$  em ambos os grupos estudos. **Conclusão:** Foi possível isolar as células mononucleares obtidas da medula óssea de ratos Wistar. Utilizando fatores de crescimento uma pequena parcela destas células foi diferenciada em células semelhantes às endoteliais. As células mononucleares isoladas e as expandidas e diferenciadas da medula óssea de ratos puderam ser caracterizadas imunofenotipicamente por citometria de fluxo. O fator de von Willebrand não foi evidenciado nas células isoladas e nas expandidas e diferenciadas. Não houve formação de túbulos capilares *in vitro* nas células isoladas e nas expandidas e diferenciadas. Assim uma pequena porcentagem das células mononucleares diferenciaram-se em células semelhantes às endoteliais sugerindo que existe uma tendência, não significativa estatisticamente, da influência dos fatores de crescimento neste processo.

Palavras-chave: Células progenitoras endoteliais. Células endoteliais. Fatores de crescimento. Diferenciação. Proliferação.

**ABSTRACT**

Keywords: Endothelial progenitor cells. Endothelial Cells. Growth factors. Differentiation. Proliferation.

## SUMÁRIO

<b>LISTAS DE FIGURAS</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTAS DE TABELAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1 TERAPIA CELULAR.....	21
2.2 NEOVASCULARIZAÇÃO.....	24
2.3 CÉLULA-TRONCO.....	26
2.4 CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS.....	29
2.4.1 Antígeno CD14.....	33
2.4.2 Antígeno CD31.....	33
2.4.3 Antígeno CD34.....	34
2.4.4 Antígeno CD45.....	34
2.4.5 Antígeno CD90.....	34
2.4.6 Antígeno CD105.....	34
2.4.7 Antígeno CD133.....	35
2.4.8 Antígeno CD144.....	35
2.4.9 Fator de von Willebrand – fvW.....	35
2.5 FATORES DE CRESCIMENTO.....	35
2.5.1 Fator de Crescimento Endotelial Vascular – VEGF.....	36
2.5.2 Fator de Crescimento de Fibroblasto Básico – b-FGF.....	38
2.5.3 Fator de Crescimento Semelhante à Insulina – tipo I – IGF-I.....	38
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>42</b>
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	43
4.2 COLETA DA MEDULA ÓSSEA DE RATOS WISTAR.....	43
4.3 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA.....	44
4.4 SELEÇÃO POSITIVA DAS CÉLULAS CD133 <sup>+</sup> .....	44
4.5 SELEÇÃO NEGATIVA DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS EXCLUINDO AS CÉLULAS CD14 <sup>+</sup> E CD45 <sup>+</sup> .....	45
4.5.1 Acoplamento do anticorpo CD45 de rato.....	46
4.5.2 Seleção negativa.....	46

4.6	EXPANSÃO CELULAR.....	47
4.7	CITOMETRIA DE FLUXO.....	48
4.8	IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	50
4.9	ENSAIO DE FORMAÇÃO DE TÚBULOS CAPILARES.....	52
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>54</b>
5.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE CÉLULAS MONONUCLEARES.....	55
5.2	VIABILIDADE CELULAR.....	55
5.3	SELEÇÃO POSITIVA DAS CÉLULAS CD133 <sup>+</sup> .....	56
5.4	SELEÇÃO NEGATIVA DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS EXCLUINDO AS CÉLULAS CD14 <sup>+</sup> E CD45 <sup>+</sup> .....	58
5.5	EXPANSÃO CELULAR.....	59
5.5.1	Cultivo grupo fatores.....	60
5.5.2	Cultivo grupo controle.....	60
5.6	CITOMETRIA DE FLUXO.....	62
5.7	IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	64
5.8	ENSAIO DE FORMAÇÃO DE TÚBULOS CAPILARES.....	65
5.9	ANÁLISE DOS GRUPOS ESTUDADOS.....	66
5.9.1	Pré-cultivo (grupo mononuclear) x pós-cultivo (grupo fator):.....	66
5.9.2	Pré-cultivo (grupo mononuclear) x pós-cultivo (grupo controle):.....	67
5.9.3	Pós-cultivo (grupo fator) x pós-cultivo (grupo controle):.....	68
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>80</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>101</b>
	<b>ANEXO 01 – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>102</b>
	<b>ANEXO 02 – ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>104</b>
	<b>ANEXO 03 – EXPRESSÃO CELULAR, FUNÇÃO OUTRO NOME E FAMÍLIA RELACIONADA DOS ANTICORPOS DE SUPERFÍCIE AVALIADOS .....</b>	<b>106</b>

**LISTAS DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS CRITÉRIOS PARA DEFINIR CÉLULAS-TRONCO .....</b>	<b>20</b>
<b>FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DESENVOLVIMENTO TECIDUAL, DESTACANDO O PROVAVÉL DESENVOLVIMENTO DAS CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS.....</b>	<b>21</b>
<b>FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA IDENTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS .....</b>	<b>24</b>
<b>FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA MOSTRANDO A FORMAÇÃO VASCULAR .....</b>	<b>29</b>
<b>FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PURIFICAÇÃO DAS CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS PARA O MARCADOR CD133.....</b>	<b>41</b>
<b>FIGURA 6 – GRÁFICO DA SELEÇÃO POSITIVA DO CD133 NO CONJUNTO TOTAL DE CÉLULAS E APÓS A SELEÇÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>FIGURA 7 – GRÁFICOS COMPARATIVOS DA PORCENTAGEM DE CÉLULAS POSITIVAS PARA OS MARCADORES UTILIZADOS EM AMOSTRAS DE MEDULA ÓSSEA DE RATOS WISTAR PRÉ E PÓS-PURIFICAÇÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>FIGURA 8 – GRÁFICO DA SELEÇÃO NEGATIVA CD14 E CD45.....</b>	<b>53</b>
<b>FIGURA 9 – PAINEL REPRESENTATIVO DOS CULTIVOS REALIZADOS.....</b>	<b>55</b>
<b>FIGURA 10 – CULTIVOS REALIZADOS MOSTRANDO AS CÉLULAS JÁ EM COLÔNIAS .....</b>	<b>56</b>
<b>FIGURA 11 – GRÁFICO COMPARATIVO DA PORCENTAGEM DE CÉLULAS POSITIVAS PARA O MARCADOR CD34 UTILIZADO EM AMOSTRAS DE MO DE RATOS WISTAR PRÉ (GRUPO MONONUCLEAR) E PÓS-CULTIVO (GRUPO FATOR).....</b>	<b>58</b>

- FIGURA 12 – GRÁFICO COMPARATIVO DA PORCENTAGEM DE CÉLULAS POSITIVAS PARA O MARCADOR CD45 UTILIZADO EM AMOSTRAS DE MO DE RATOS WISTAR PRÉ (GRUPO MONONUCLEAR) E PÓS-CULTIVO (GRUPO FATOR).....58**
- FIGURA 13 – GRÁFICO COMPARATIVO DA PORCENTAGEM DA VIABILIDADE DAS AMOSTRAS DE MO DE RATOS WISTAR PRÉ (GRUPO MONONUCLEAR) E PÓS-CULTIVO (GRUPO FATOR).....59**
- FIGURA 14 – GRÁFICO COMPARATIVO DA PORCENTAGEM DE CÉLULAS POSITIVAS PARA O MARCADOR CD34 UTILIZADO EM AMOSTRAS DE MO DE RATOS WISTAR PRÉ (GRUPO MONONUCLEAR) E PÓS-CULTIVO (GRUPO CONTROLE).....60**
- FIGURA 15 – GRÁFICO COMPARATIVO DA PORCENTAGEM DE CÉLULAS POSITIVAS PARA O MARCADOR CD45 UTILIZADO EM AMOSTRAS DE MO DE RATOS WISTAR PRÉ (GRUPO MONONUCLEAR) E PÓS-CULTIVO (GRUPO CONTROLE).....61**
- FIGURA 16 – GRÁFICO COMPARATIVO DA PORCENTAGEM DE CÉLULAS POSITIVAS PARA O MARCADOR CD34 UTILIZADO EM AMOSTRAS DE MO DE RATOS WISTAR PÓS-CULTIVO (GRUPO FATOR) E PÓS-CULTIVO (GRUPO CONTROLE) .....62**
- FIGURA 17 – GRÁFICO COMPARATIVO DA PORCENTAGEM DE CÉLULAS POSITIVAS PARA O MARCADOR CD45 UTILIZADO EM AMOSTRAS DE MO DE RATOS WISTAR PÓS-CULTIVO (GRUPO FATOR) E PÓS-CULTIVO (GRUPO CONTROLE) .....63**
- FIGURA 18 – GRÁFICO COMPARATIVO DA PORCENTAGEM DA VIABILIDADE DAS AMOSTRAS DE MO DE RATOS WISTAR PÓS-CULTIVO (GRUPO FATOR) E PÓS-CULTIVO (GRUPO CONTROLE).....63**

**LISTAS DE TABELAS**

<b>TABELA 1 – PAINEL DE ANTICORPOS MONOCLONAIS UTILIZADOS PARA ANÁLISES DAS CÉLULAS PRÉ E PÓS-CULTIVO .....</b>	<b>45</b>
<b>TABELA 2 – NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES OBTIDAS EM CADA RATO SUBMETIDO AO ESTUDO .....</b>	<b>50</b>
<b>TABELA 3 – MÉDIA DOS VALORES OBTIDOS PARA CADA UM DOS ANTICORPOS UTILIZADOS PRÉ-PURIFICAÇÃO (PRÉ-P) E PÓS-PURIFICAÇÃO (PÓS-P) EM MEDULA ÓSSEA DE RATOS WISTAR .....</b>	<b>51</b>
<b>TABELA 4 – COMPARATIVO DOS MARCADORES PARA OS GRUPOS PRÉ-CULTIVO (GRUPO MONONUCLEAR) E PÓS-CULTIVO (GRUPO FATOR) .....</b>	<b>57</b>
<b>TABELA 5 – COMPARATIVO DOS MARCADORES PARA OS GRUPOS PRÉ-CULTIVO (GRUPO MONONUCLEAR) E PÓS-CULTIVO (GRUPO CONTROLE).....</b>	<b>60</b>
<b>TABELA 6 – COMPARATIVO DOS MARCADORES PARA OS GRUPOS PÓS-CULTIVO (GRUPO FATOR) E PÓS-CULTIVO (GRUPO CONTROLE) .....</b>	<b>62</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

7AAD	7-amino - actinomicina D
AcMo	Anticorpo monoclonal
APC	Aloficocianina
ATB	Antibiótico
b-FGF	Fator de crescimento de fibroblasto básico
BL-CFC	Células formadoras de colônias blastóides
BOOST	Transferência de medula óssea para melhorar a regeneração do infarto em pacientes com segmento ST elevado
BSA	Soro albumina bovina
CD	Cluster de diferenciação
CE	Célula endotelial
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CM	Célula mononuclear
CPE	Célula progenitora endotelial
CT	Célula-tronco
DAPI	4'6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EHS	Sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm
FE	Fração de ejeção
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FH	Ficoll-hypaque
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLUOR-18	F-fluoro-deoxi-D-glicose
fvW	Fator de von Willebrand
G-CSF	Fator de estimulação de colônias de granulócitos
GH	Hormônio de crescimento
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I
kDa	Quilodalton
MO	Medula óssea

PBS	Tampão salina-fosfato
PE	Ficoeritrina
PECAM-1	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária
PE-Cy5	Complexo de proteína clorofilada peridinina
Pós-P	Pós-purificação
Pré-P	Pré-purificação
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
SBF	Soro bovino fetal
SCUP	Sangue de cordão umbilical e placentário
TC	Terapia celular
TOCARE-AMI	Transplante de células progenitoras e o aumento da regeneração no infarto agudo do miocárdio
t-PA	Ativador do plasminogênio tecidual
VE	Ventrículo esquerdo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR-2	Receptor dois do fator de crescimento endotelial vascular
$\beta$ -TGF	Fator de crescimento transformador $\beta$

## **1 INTRODUÇÃO**

As doenças do aparelho circulatório são a principal causa de mortalidade no Brasil e representam 48,5% dos óbitos registrados em 2006, destacando-se a doença coronariana (DATASUS, 2006). A extensão do infarto é o maior determinante de morbidade e mortalidade. Nos Estados Unidos a doença coronariana é a causa de 50% de todas as mortes por doenças cardiovasculares (COUFFIHNAL, 1999) e as doenças vasculares periféricas, em 2007, afetaram 8 milhões de pessoas neste país (ROSAMOND, 2007).

Nas próximas décadas é previsto que os países menos desenvolvidos sofrerão com as doenças cardiovasculares devido ao resultado do aumento de fatores de risco decorrente de melhores condições sócio-econômicas e do aumento na expectativa de vida (HUSTEN, 1998). Na tentativa de solucionar este problema estão sendo propostas novas pesquisas no tratamento da insuficiência cardíaca que abordem sua causa principal, que é a perda de cardiomiócitos, por meio da administração de fatores angiogênicos, para aumentar o leito vascular e do transplante celular, para aumentar a massa muscular contrátil ou a angiogênese (BROFMAN, 2004). Uma parte dos pacientes com lesão cardíaca desenvolve insuficiência cardíaca o que acarreta em altos custos hospitalares e de atendimento em salas de emergência; isto resulta em aposentadorias precoces e conseqüentemente em custos para o país. Atualmente o tratamento médico utilizado tem melhorado drasticamente o prognóstico destas doenças. Porém, estes tratamentos são simplesmente paliativos e apenas retardam a evolução da doença, com exceção do transplante cardíaco, gerando altos custos e ainda elevada mortalidade.

O impacto epidemiológico das doenças cardiovasculares é impressionante, sendo a principal causa de morte mundial desde meados da última década até as projeções para 2030. Assim, o investimento em novas linhas de pesquisa e ensaios clínicos com células-tronco (CT) é considerado estratégico por entidades públicas e privadas de diversos países (SCHETTERT, 2008).

O paradigma de que o coração é um órgão pós-mitótico diferenciado, incapaz de auto-regeneração tem sido questionado (CARVALHO, 2009; XU, 2002; BELTRAMI, 2001). Estudos recentes mostram evidências de diferenciação de cardiomiócitos por meio de células precursoras musculares quiescentes que são ativadas, proliferam, diferenciam-se em cardiomiócitos jovens (GROUNDS, 2002; QU-PETERSEN, 2002), e estes quando maduros, formam fibras musculares

funcionais. Porém, esta capacidade regenerativa é limitada para repovoar a área lesada (GROUNDS, 2002). Também a angiogênese natural é insuficiente para suprir a grande demanda por oxigênio e nutrientes e para prevenir a apoptose de cardiomiócitos hipertrofiados e o remodelamento ventricular (GROUNDS, 2002; KOCHER, 2001).

Nos últimos anos, o interesse no uso das CT como ferramenta para terapia celular (TC) tem aumentado de forma considerável. Isto está sendo impulsionado por inúmeras descobertas, mas em especial, a de que estas células são capazes de se diferenciar em células de linhagem diferente da de origem (LEMISCHKA, 2005).

CT provenientes da medula óssea (MO) são as mais freqüentemente utilizadas. Embora as CT adultas sejam consideradas menos versáteis que as CT embrionárias, um número cada vez maior de cientistas considera a existência de uma plasticidade promissora das CT adultas, as quais teriam um potencial de transformação para terapia multitecidual ainda não explorado totalmente (WAGERS, 2004).

Entre as CT, as células progenitoras endoteliais (CPE) têm tido grande importância nos estudos para TC, pois secretam uma variedade de fatores de crescimento, participam da formação de capilares e contribuem no crescimento de vasos sanguíneos em tecidos isquêmicos (ASAHARA, 1997). Assim uma nova linha de estudo que se apresenta bastante promissora é de que o transplante de CPE possa melhorar a perfusão na área da cicatriz do miocárdio por meio da neoangiogênese (KIM, 2001). Estudos experimentais com células mononucleares (CM) da MO revolucionaram o paradigma de que na vida adulta, novos vasos e capilares eram gerados apenas por divisão de células endoteliais (CE) maduras (ASAHARA, 1997; MURASAWA, 2005). Asahara e colaboradores, em 1997, observaram que grande parte das células envolvidas no processo de neovascularização tinham origem na MO e possibilitaram a descoberta de que a vasculogênese persiste na vida adulta.

Com respeito ao desenvolvimento das células sanguíneas e endoteliais, ambas têm o mesmo precursor: o hemoangioblasto, que aparece precocemente no embrião e desaparece rapidamente com o desenvolvimento celular (RIBATTI, 2000). Os hemoangioblastos *in vitro* têm o potencial de formar tanto CE como hematopoiéticas (CHOI, 1998).

Vários estudos com modelos animais de pequeno e grande porte foram realizados para avaliar os diferentes tipos celulares e modos de injeção das células, a maior parte deles induzindo isquemia miocárdica por congelamento ou oclusão coronariana (MULLER-EHMSEN, 2002; ETZION, 2001).

Um estudo experimental em porcos com isquemia miocárdica crônica utilizando a injeção transendocárdica de células derivadas da MO ou CPE demonstraram o aumento do fluxo colateral, da densidade capilar e da contratilidade regional (KAWAMOTO, 2003). Tem sido proposto que as CPE aumentam a perfusão tecidual pela diferenciação em CE nos sítios de neovascularização (ASAHARA, 1999a).

Fukuda e colaboradores, em 2001, desenvolveram um estudo pré-clínico sugerindo que a transferência de CT aumentou a regeneração miocárdica e a neovascularização pós-infarto do miocárdio. As CM da MO, que contém, além de outras células, progenitores mesenquimais, endoteliais e hematopoiéticos, quando injetadas no coração de camundongos enfartados, podem expressar proteínas cardíacas, como troponina e miosina, induzir à angiogênese, limitar o tamanho da área enfartada e melhorar a fração de ejeção (FE) (WOLLERT, 2004; CHEN, 2004; STRAUER, 2002).

Inspirados em resultados experimentais, vários estudos clínicos foram iniciados para testar a segurança e aplicabilidade da terapia com CT. Estes estudos incluíram pacientes com infarto agudo do miocárdio que foram submetidos à angioplastia coronariana e implante de *stent* para abrir a artéria relacionada ao infarto e, na maioria dos estudos, as células foram infundidas por via intracoronariana usando cateter balão para possibilitar a interrupção de fluxo. Neste aspecto, estes estudos diferem dos experimentais, em que a artéria relacionada ao infarto não foi reperfundida e as células foram injetadas direto no miocárdio (BOCCHI, 2005).

O conceito de medicina regenerativa associado ao uso de CT e fatores de crescimento para reparar tecidos está se tornando realidade. Os estudos envolvendo o uso de CT têm aumentado e apresentam resultados promissores na recuperação de tecidos lesados, incluindo os cardíacos (SCHWARTZ, 2003). Uma estratégia para reparar o miocárdio enfartado é a implantação de CT multipotentes, as quais têm potencial de multiplicação e diferenciação em células contráteis e CE (SCHWARTZ, 2003; HAMANO, 2002; ORLIC, 2001b).

Desta forma as CT representam uma das grandes promessas da medicina regenerativa, com propostas de tratamento de diferentes doenças consideradas sem opção terapêutica. Seu principal papel seria a regeneração de tecidos e órgãos com função comprometida, por processos de diferentes etiologias, como inflamatórios, traumáticos e degenerativos. Com base em recentes estudos, este possível potencial proporcionará no futuro os tratamentos de doenças neurológicas, cardiovasculares, dos tecidos músculo-esqueléticos (JACOB, 2007; JIANG, 2002) e de doenças auto-imunes (VOLTARELLI, 2004).

A forma mais objetiva de tratamento para as doenças cardíacas com as CT é de completar e de estimular de forma positiva os mecanismos naturais de reparo do coração, por meio de administração ou do recrutamento de células capazes de promoverem angiogênese e ou miogênese (HASSINK, 2003).

As CT usualmente não são disponíveis em quantidades adequadas para utilização na TC de revascularização de áreas isquêmicas em pacientes (EGGERMANN, 2003), sendo assim, é necessário a utilização de técnicas de isolamento, purificação e expansão de células progenitoras *ex vivo* para que estas possam propiciar resultados mais significativos.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

## 2.1 TERAPIA CELULAR.

A TC compreende um conjunto de técnicas ou métodos que visam substituir as células doentes ou disfuncionais por células saudáveis. Campo emergente da medicina regenerativa, a TC baseia-se no tratamento de uma variedade de doenças degenerativas ou relacionadas com a idade, para as quais ainda não existe tratamento específico ou efetivo (FERNANDES, 2007). A habilidade de purificar, cultivar e manipular CT somáticas fornece aos pesquisadores, células de valor inestimável, que podem servir para o estudo e o desenvolvimento do reparo tissular com o objetivo de corrigir lesões provocadas por doenças congênitas ou degenerativas (PRATA, 2006).

Após a ocorrência do infarto do miocárdio, o coração não consegue atender a todas às necessidades da lesão e dos cardiomiócitos hipertrofiados, resultando em apoptose e expansão da área infartada inicial (SCHUSTER, 2004; KOCHER, 2001). Enquanto o coração tem, até certo ponto, a capacidade de regenerar cardiomiócitos, seja por causa da mobilização das células progenitoras vindas da MO, migrando para o coração isquêmico, seja por efeitos indiretos da angiogênese induzida por citocinas pós-infarto, os resultados são insuficientes para alterar o processo de remodelamento (LINKE, 2005). Portanto, propõe-se que, a administração exógena de CT progenitoras pode ser capaz de ultrapassar esse limiar e, junto com a resposta endógena pós-infarto, possa reparar os cardiomiócitos danificados (SCHUSTER, 2008).

O alvo do transplante celular cardíaco é repovoar o miocárdio doente com células que poderiam restaurar a contratilidade (MENASCHÉ, 2003, SCHWARTZ, 2003). O transplante celular tem gerado um interesse crescente como um novo método em potencial para melhorar o prognóstico de pacientes com falhas cardíacas. E está baseado em dois conceitos amplos: a insuficiência cardíaca desenvolve-se quando um número crítico de cardiomiócitos está irreversivelmente lesado e, a função pode ser melhorada por repovoamento destas áreas do miocárdio com um novo *pool* de células contráteis (MENASCHÉ, 2003).

No estudo TOPCARE-AMI (Transplante de Células Progenitoras e o Aumento da Regeneração no Infarto Agudo do Miocárdio, ASSMUS, 2002), o uso de CM da MO (n=9) e CPE selecionadas do sangue periférico (n=11), foram infundidas por via intracoronariana quatro dias após o infarto agudo do miocárdio, em pacientes

tratados por angioplastia primária e sugeriu redução da área de necrose miocárdica ao final de quatro meses no grupo que utilizou as CPE selecionadas do sangue periférico.

Bartunek e colaboradores, publicaram em 2005 os resultados de um estudo randomizado, aberto, do transplante intracoronariano de  $12,6 \pm 2,2$  milhões de células CD133<sup>+</sup>, cerca de 12 dias após o diagnóstico de infarto agudo do miocárdio. Este estudo demonstrou que este procedimento é exequível e pode estar relacionado à melhora da contratilidade ventricular e da perfusão miocárdica no grupo tratado. Entretanto, houve elevada incidência de reestenose coronariana no grupo submetido à injeção de células em relação ao grupo controle.

O estudo BOOST (Transferência de MO para melhorar a regeneração do infarto em pacientes com segmento ST elevado) randomizou 60 pacientes após infarto agudo do miocárdio com elevação do segmento ST submetidos a angioplastia coronariana para tratamento convencional somente (n=30) ou associado com TC de CT da MO (n=30). Após seis meses a FE do ventrículo esquerdo (VE) mostrou elevação de 0,7% no grupo controle versus 6,7% no grupo CT (p=0,0026). No seguimento tardio de 18 meses mostrou manutenção da FE do VE, mas sem diferença com grupo placebo (WOLLERT, 2004; MEYER, 2004).

As células CD133<sup>+</sup> foram utilizadas em um estudo com 12 pacientes tratados com estas células e 10 controles. Houve melhora da FE do VE, da perfusão e da contração segmentar (VANDERHEYDEN, 2004). Em outro estudo, células CD133<sup>+</sup> foram injetadas por via transepicárdica na borda da região infartada em 12 pacientes submetidos à revascularização miocárdica de regiões não injetadas. Em contraste com os estudos que utilizaram mioblasto esquelético, essas regiões infartadas eram mais recentes. Não foram detectadas complicações durante o procedimento e nenhuma arritmia ventricular grave foi observada em 14 meses de seguimento. Após seis a oito meses, a perfusão das áreas injetadas e a FE do VE melhoraram (STAMM, 2004).

Uma análise recente avaliou a combinação de CT mesenquimais e CPE em pacientes com infarto agudo do miocárdio. Foram incluídos 11 pacientes com infarto agudo do miocárdio antero-septal submetidos à infusão intracoronariana de um conjunto de CT mesenquimais e CPE. Houve melhora da contratilidade miocárdica em um ou mais segmentos miocárdicos avaliados pelo ecocardiograma com estresse em cinco dos 11 pacientes estudados (p=0,01) (KATRITSIS, 2005).

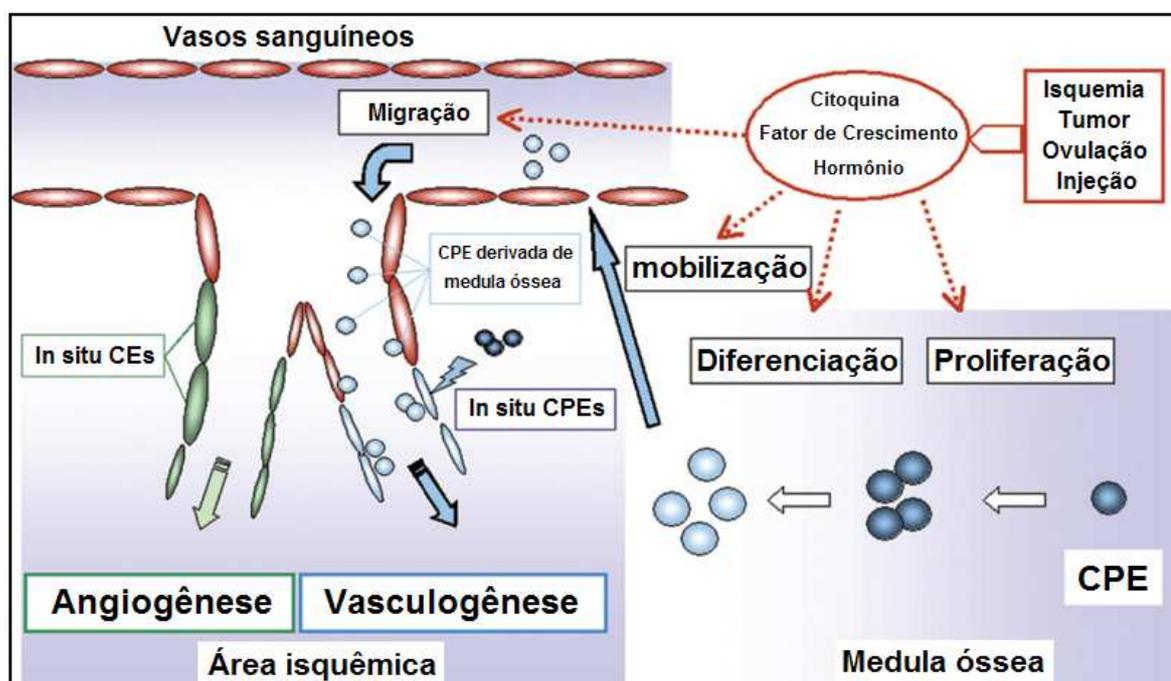
Em 2005, teve início no Brasil um teste clínico em larga escala, financiado pelo Ministério da Saúde, onde 1200 pacientes com diferentes cardiopatias receberam ou receberão injeções locais de CM derivadas da própria MO. Este estudo pretende avaliar a segurança e eficácia do tratamento com estas células para eventualmente oferecê-lo à população como uma alternativa ao transplante cardíaco (PEREIRA, 2008).

Em um trabalho realizado por Senegaglia e colaboradores, em 2010, cujo objetivo foi purificar células CD133<sup>+</sup> derivadas de sangue de cordão umbilical humano, expandi-las *in vitro* com fatores de crescimento (VEGF, b-FGF e IGF-I) e avaliar a eficácia tanto das células purificadas quanto das células expandidas e diferenciadas em cultivo no tratamento do infarto agudo do miocárdio em ratos Wistar. Para tanto os ratos foram divididos em três grupos: A (injeção de células CD133<sup>+</sup> purificadas), B (injeção de células CD133<sup>+</sup> expandidas e diferenciadas em cultivo com fatores de crescimento) e C (injeção de solução salina). Foi observado uma melhora significativa na FE do VE para os grupos A e B. O que permitiu concluir que as células CD133<sup>+</sup> podem ser purificadas a partir de sangue de cordão umbilical humano, expandidas e diferenciadas *in vitro*, sem perderem sua atividade biológica e ambas as células, purificadas e expandidas e diferenciadas, mostraram resultados promissores para uso em cardiomioplastia celular.

Até o momento existem poucos estudos clínicos com o uso de CPE para o tratamento de isquemia miocárdica, o que impede uma aferição mais profunda a respeito do seu possível papel terapêutico (FERNANDES, 2007). A infusão intracoronária após recanalização de oclusão crônica mostrou resultados positivos, com melhora de microcirculação distal e redução de área de miocárdio hibernado, quando comparada à simples recanalização (ERBS, 2005). Estudo pré-clínico realizado por Kawamoto e colaboradores, em 2003, com injeções intramiocárdicas com uso do sistema NOGA, revelou espessamento da densidade capilar e aumento do fluxo colateral em modelo suíno de isquemia crônica, encorajando a realização de trabalhos clínicos no futuro.

## 2.2 NEOVASCULARIZAÇÃO.

A neovascularização (FIGURA 1) pode acontecer diante de dois tipos de mecanismos: a vasculogênese, caracterizada pelo recrutamento de células endoteliais oriundas da medula óssea a locais de neoformação vascular com subsequente diferenciação em células endoteliais maduras com intensa capacidade de proliferação local (RUMPOLD, 2004; LAHAM, 2000), e por outro lado, através da angiogênese, que é definida como a formação de novos vasos sanguíneos por um processo de germinação de brotos endoteliais a partir de vasos capilares preexistentes (CHACHQUES, 2003; FOLKMANN, 1985).



**Figura 1:** A neovascularização pós-natal em eventos fisiológicos ou patológicos é consistente com a formação de novos vasos contribuídos pela angiogênese e vasculogênese por meio de diferentes taxas entre os dois mecanismos. Angiogênese e vasculogênese são derivados da ativação de CE *in situ* e de CPE derivadas da medula óssea ou *in situ*, respectivamente. Reproduzido de: Iwami Y, Masuda H, Asahara, T. Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future. J Cell Mol Med. 8, 488-497, 2004.

Ao longo da última década, houve um crescimento considerável no campo da biologia do desenvolvimento e da biologia vascular levando à descoberta de múltiplos tipos celulares, com potencial de ajudar na angiogênese, na vasculogênese ou em ambas (SCHUSTER, 2008).

A vasculogênese tem sido definida como a formação de novos vasos sanguíneos *in situ*, em local onde não há vasos, através de estímulo de proliferação dos hemoangioblastos, ou seja, das células precursoras do endotélio (CONWAY, 2001). Desta forma, os hemoangioblastos organizam-se em agregados celulares ou ilhotas sanguíneas, diferenciando-se em uma rede vascular primordial, onde os canais endoteliais apresentam tamanho relativamente uniforme (JONES, 2001).

A vasculogênese começa com a formação de aglomerados de células ou ilhas de sangue no processo embrionário. O crescimento e fusão de várias dessas ilhas de sangue acabam por dar origem à estrutura da rede capilar (RISAU, 1995). As CPE estão localizadas na periferia das ilhas de sangue, enquanto as CT hematopoiéticas estão localizadas no centro destas durante os primeiros estágios embrionários. As CPE irão dar origem as CE, enquanto as CT hematopoiéticas se desenvolvem em células sanguíneas maduras após a fusão nas ilhas de sangue.

Até recentemente, a vasculogênese era considerada restrita ao embrião, 16 enquanto que a formação neovascular nos adultos era conseqüência da angiogênese sozinha (MUROHARA, 2003). No entanto, recentemente se descobriu que o sangue periférico contém CPE que são predominantemente derivados de CM positivas para o marcador CD34 localizadas na óssea marrow (ASAHARA, 1997), *in vitro*, estas células se diferenciam em células endoteliais maduras. Estes resultados sugerem que as CPE não só circulam naturalmente, como exogenamente são transportadas para contribuir com a formação neovascular, provando então a existência da vasculogênese pós-natal (MUROHARA, 2003).

A angiogênese terapêutica ou a vasculogênese podem ter um papel importante em pacientes que tiveram exaurido todas as opções de tratamento disponíveis, restaurando o fluxo sanguíneo para a região isquêmica do miocárdio e repovoando elementos contráteis do miocárdio (LAHAM, 2001). O desenvolvimento dos vasos sanguíneos em resposta a isquemia tecidual constitui numa defesa natural do hospedeiro com intenção de manter a perfusão do tecido, necessária para a função fisiológica do órgão (RIVARD, 1999a; COUFFINHAL, 1999; VAN BELLE, 1997).

O estudo sistemático da angiogênese teve início com Judah Folkman, e progressivamente foram desenvolvidos vários modelos *in vitro* e *in vivo* para a compreensão de seus mecanismos moleculares, modulação e a sua importância nos processos fisiológicos e patológicos (FOLKMAN, 1992).

Atualmente o termo angiogênese tem sido empregado para descrever o crescimento de brotos endoteliais a partir de vênulas pós-capilares pré-existentes e para demonstrar os processos de crescimento e remodelamento de uma rede vascular primitiva em uma complexa (CARMELIET, 2000; BENJAMIN, 1998).

As etapas da angiogênese envolvem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular em resposta ao óxido nítrico e VEGF, degradação da membrana basal por metaloproteinases, perda das junções entre as CE pela ação do ativador do plasminogênio, migração e proliferação das CE, formação de cordões endoteliais, formação de membrana basal, maturação e remodelamento (JAIN, 2003).

Já o estudo de Kocher e colaboradores, em 2001, usando CPE por administração intravenosa, demonstraram a neovascularização e a angiogênese endógena de CPE após infarto do miocárdio.

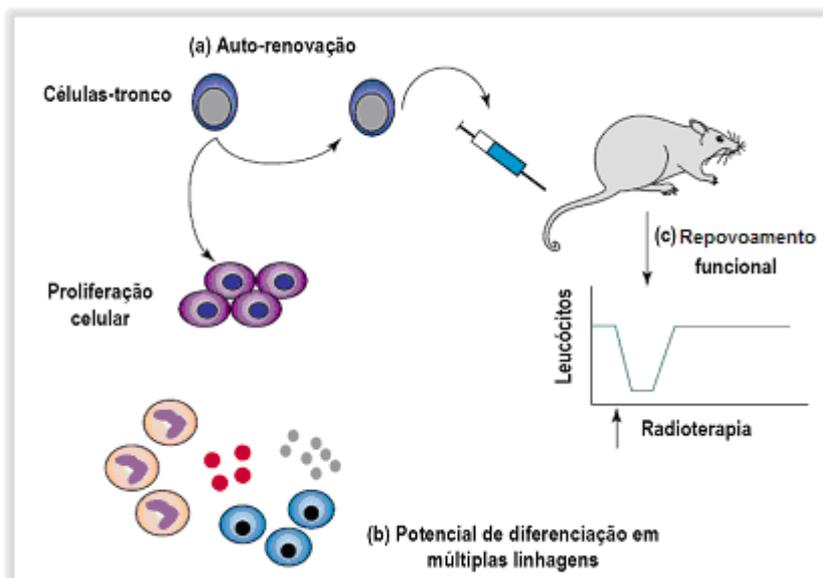
Ainda que as pesquisas recentes sobre angiogênese tenham sido meramente descritivas, muitas moléculas capazes de estimular ou inibir CE têm sido descobertas. Os complexos mecanismos celular e molecular pelos quais as CE e as células da musculatura lisa interagem uns com os outros para formação de veias sanguíneas agora são melhor entendidos (CARMELIET, 2000).

### 2.3 CÉLULA-TRONCO.

Classicamente, as CT são definidas com base em três de suas principais características, conforme Verfaillie (2002):

- a) capacidade de auto-renovação, ou a habilidade de gerar no mínimo uma célula-filha com características similares às da célula-mãe;
- b) capacidade de uma única célula diferenciar-se em múltiplas linhagens celulares;
- c) capacidade de reconstituir funcionalmente, *in vivo*, um tecido lesado.

A Figura 2 ilustra estes critérios.



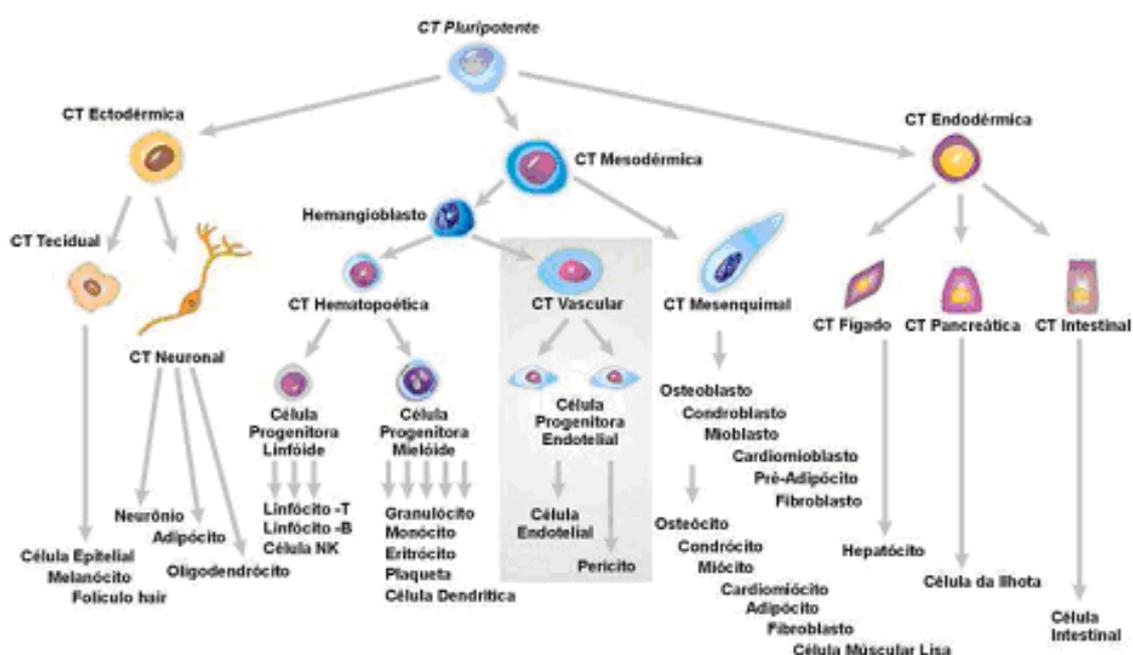
**Figura 2:** Esquema representativo dos critérios para definir células-tronco. (Adaptado de VERFAILLIE, 2002).

Já para Weissman e colaboradores (2000), as CT são definidas como células que tem capacidade clonogênica e de auto-renovação e que podem diferenciar-se em múltiplas linhagens.

Para Cai e colaboradores (2004), as CT se definem como populações de células que se auto-renovam por divisão simétrica ou assimétrica e são capazes de se diferenciar em múltiplos tipos de células especializadas.

As CT podem ser subclassificadas de acordo com o seu potencial de diferenciação e/ou origem (FIGURA 3). Assim podem ser divididas funcionalmente em, conforme Angelini (2007) e Verfaillie (2002):

- totipotentes, com capacidade de produzir os três tecidos embrionários primitivos, ectoderma, endoderma e mesoderma;
- multipotentes, que podem originar mais de uma linhagem celular, e
- unipotente, que originam uma linhagem celular.



**Figura 3:** Representação esquemática do desenvolvimento tecidual, destacando o provável desenvolvimento das células progenitoras endoteliais (Reproduzido de: <http://www.fipase.org.br/biotecnologia/palestras/Dimas%20Tadeu%20Covas.pdf>).

O desenvolvimento de um organismo multicelular está acompanhado de uma série de eventos pré-programados pelo genoma. Estes eventos englobam a proliferação celular, o comprometimento celular, a expressão e inibição de genes relacionados com as linhagens celulares e a regulação da apoptose (BOCCHI, 2005). A progressão seqüencial por estes eventos resulta na formação das diferentes células, tecidos e órgãos que constituem o indivíduo. Apesar de, a maioria das células seguir esta seqüência durante o desenvolvimento, um pequeno número não o faz, tornando-se assim um reservatório de células indiferenciadas que permanecem no indivíduo adulto e que estão diretamente envolvidas na manutenção da integridade e no reparo dos órgãos e tecidos por toda a vida (YOUNG, 2004).

Até o momento, CT embrionárias, mioblastos de músculo esquelético e CM tanto de sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) como de MO já foram utilizadas em diferentes doenças cardíacas na tentativa de melhorar a função do órgão afetado (MURRY, 2005).

Os mecanismos através dos quais as CT derivadas da MO produzem uma melhora em órgãos não-hematopoéticos podem ser atribuídos à vasculogênese promovida por progenitores endoteliais contidos na fração mononuclear dessas

células, ou ainda a fatores específicos liberados pelas CT que atuam sobre as outras células levando à diferenciação (ação parácrina). Esses podem ser fatores de crescimento, anti-apoptóticos, angiogênicos, moduladores do sistema imune ou ativadores da função celular por meio da remodelação tecidual (MURRY, 2005; PEREIRA, 2008).

Até o presente momento, os mecanismos pelos quais as CT utilizadas na TC estariam promovendo melhora da função em corações lesados ainda são controversos, mas três mecanismos gerais são propostos:

- a) transdiferenciação (KAWADA, 2004, ORLIC, 2001a);
- b) fusão celular (ALVAREZ-DOLADO, 2003, YING, 2002) e;
- c) um mecanismo parácrino de secreção de fatores (UEMURA, 2006; GNECCHI, 2005).

Dados de alguns estudos indicam que as CT da MO também têm o poder de gerar células não hematopoiéticas incluindo células epiteliais, células musculares esqueléticas e CE (KRAUSE, 2001; KOCHER, 2001). Esta capacidade das CT que dá origem a células de um tecido não relacionado é chamada de plasticidade (ORLIC, 2003). Outros trabalhos indicam essa grande plasticidade das CT da MO, incluindo também a capacidade destas se diferenciarem em neurônios e hepatócitos (WEISSMAN, 2000), porém não está claro se de fato as células que são transplantadas estão se transformando em outros tecidos ou se estão se fundindo com células dos tecidos em questão.

## **2.4 CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS.**

A definição de CPE tem sido complexa pela carência de um único marcador específico (WANG, 2008). Sua identificação pode ser feita tanto a partir de marcadores celulares como o VEGFR-2 (receptor dois do fator de crescimento endotelial vascular), o CD (cluster de diferenciação) 34 e o CD133, e funcionalmente, pela capacidade de incorporação de LDL acetilado (HRISTOV, 2008; PEICHEV, 2000).

CPE podem também ser definidas como células aderentes derivadas de sangue periférico ou derivadas de células mononucleares da MO (LIEW, 2006). E ainda as CPE são CD133+ e, a maioria, co-expressam o CD34+, somente uma

pequena porcentagem é CD34-. Assim, as células CD133+ representam um subgrupo das CT CD34+, e são uma população ideal para gerar CE (CHACHQUES, 2003).

Um estudo prévio de Choi e colaboradores, em 1998, demonstrou que as células das linhagens hematopoética e endotelial têm um precursor comum: as células formadoras de colônias blastóides (BL-CFC) que poderiam representar o equivalente aos hemoangioblastos *in vitro* tem o potencial de formar tanto CE como hematopoiéticas. Sendo assim, quando o foco da TC é a indução da vasculogênese, existe a necessidade de induzirmos a diferenciação *in vitro* dos progenitores CD133+ antes do transplante.

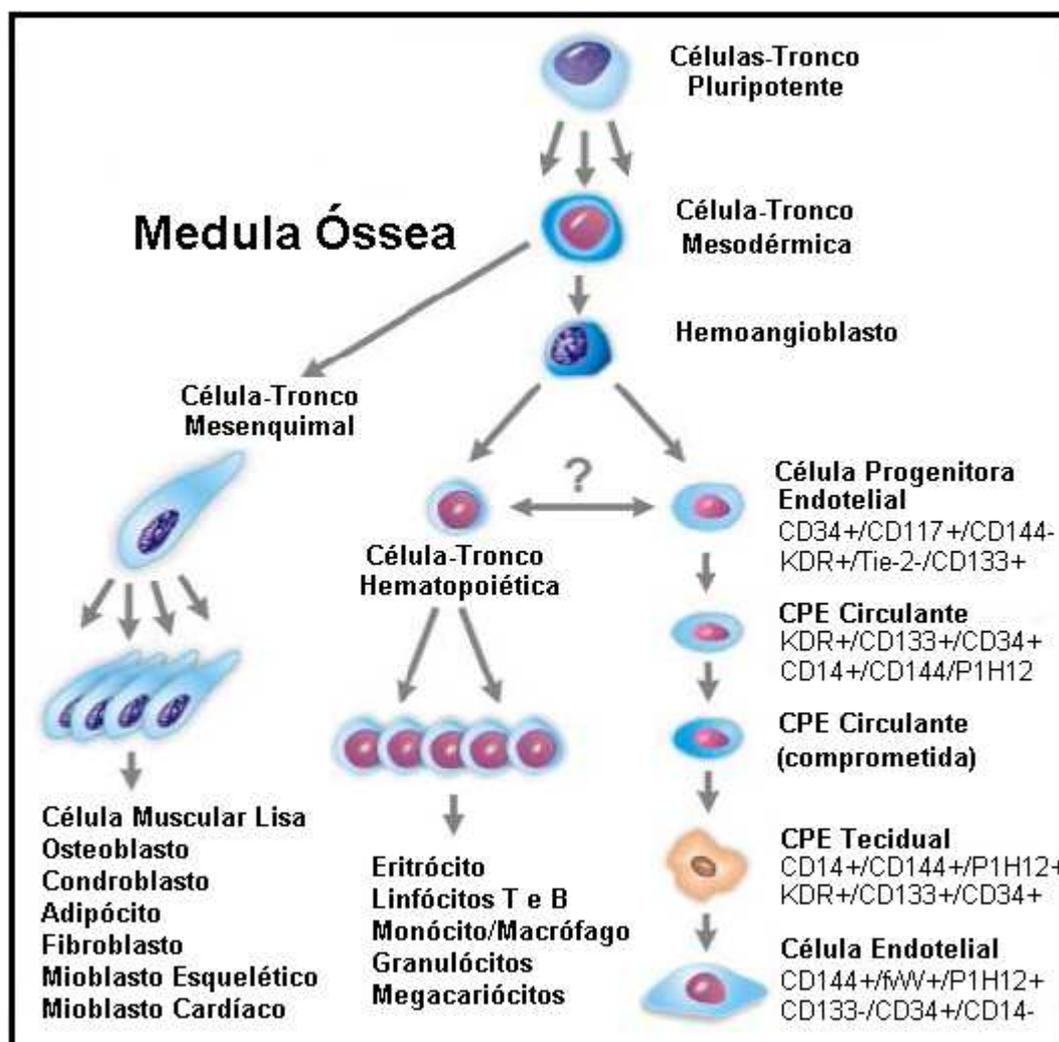
Em 1997, as células do sangue circulante que apresentavam uma variedade de proteínas de superfície celular de forma mais específica os marcadores endoteliais sobre o cultivo *in vitro* e a habilidade de localizar e promover a regeneração vascular nos locais de isquemia após o transplante, foram identificadas e chamadas células progenitoras endoteliais (CPE) (ASAHARA, 1997).

Mais de 10 anos após o primeiro relatório, o termo CPE é usado para se referir a uma série de células circulantes que apresentam algumas ou todas as qualidades já descritas, no entanto, todas estas células são conhecidas por fazerem parte da linhagem hematopoiética. A exceção é um tipo raro de células endoteliais circulantes viáveis que apresentam um potencial de proliferação clonal que exibe a capacidade de espontaneamente formar vasos sanguíneos humanos sobre a implantação em tecidos lesados de hospedeiros (RICHARDSON, 2010).

Assim o termo CPE pode, portanto, englobar um grupo de células que existe em uma variedade de estágios, desde o hemoangioblasto até as CE totalmente diferenciadas (IWAMI, 2004). Desta forma, tornou-se evidente ao longo dos últimos 3 ou 4 anos, que toda uma quantidade de diferentes tipos de células sanguíneas e endoteliais são, de forma ambígua incluídas em um único grupo chamado pelo termo CPE (STEINMETZ, 2010; YODER, 2009). Assim, Richardson e Yoder (2010), sugerem que o termo CPE seja revisto a fim de que cada uma das subpopulações de células circulantes se refira de acordo com as condições de seu envolvimento celular em cada população.

Apesar destas controvérsias, a identificação das CPE, derivadas da MO, foi importante para o estudo das CT no campo da biologia vascular (FIGURA 4). Essa população celular única, existente no sangue periférico e originada da MO, partilha

características semelhantes às CT hematopoiéticas e é incorporada em locais de neovascularização fisiológicas ou patológicas em resposta a vários fatores de crescimento angiogênicos.



**Figura 4:** Representação esquemática da identificação das células progenitoras endoteliais (Reproduzido de: <http://www.fipase.org.br/biotecnologia/palestras/Dimas%20Tadeu%20Covas.pdf>).

O estabelecimento de ilhas sanguíneas no saco vitelínico marca o início da hematopoiese e da vasculogênese no desenvolvimento embrionário de camundongos. Estas ilhas sanguíneas derivam de agregados de células mesodermiais que colonizam o saco vitelínico pós-fecundação (CHOI, 1998). As células centrais no interior destes agregados originam as células hematopoiéticas embrionárias, enquanto a população periférica se diferencia nas CE que formam as primeiras estruturas vasculares que revestem o interior das células sanguíneas

(ASAHARA, 1997). Este desenvolvimento próximo das linhagens hematopoiéticas que originam as células do sistema sanguíneo e endotelial demonstram participação na neovascularização tanto fisiológica como patológica no interior das ilhas sanguíneas e tem levado a hipótese de que elas derivam de um precursor ancestral comum, o hemoangioblasto (CHOI, 1998; ASAHARA, 1999a).

A injeção de células progenitoras diretamente na região enfartada promove um tratamento de sucesso para grandes infartos do miocárdio depois da morte celular isquêmica. Esta intervenção terapêutica reduz a área enfartada e melhora a hemodinâmica cardíaca (COUFFINHAL, 1999). As CPE têm sido amplamente estudadas para transplante porque secretam uma grande variedade de fatores de crescimento endoteliais, distribuem agentes anti ou pró-angiogênicos aos sítios patológicos, participam da formação de capilares e aumentam o crescimento colateral de vasos sanguíneos em tecidos isquêmicos (ASAHARA, 1997). Uma hipótese bastante promissora é de que o transplante de CPE possa restabelecer a perfusão na cicatriz do miocárdio (KIM, 2001).

A utilização de células progenitoras adultas para geração de uma população celular diferenciada com fenótipo de CE adultas e em número adequado, poderia permitir a sua utilização como fonte autóloga para o transplante celular. Esta população diferenciada *in vitro* resultaria em uma regeneração vascular mais rápida e efetiva em casos de cardiopatias isquêmicas (FUCHS, 2006).

Segundo Chachques e colaboradores, em 2003, os progenitores que se diferenciam em CE *in vitro* podem ser incorporados *in vivo* em locais de neovascularização. Outros estudos fornecem fortes evidências que células apresentando o marcador de membrana CD133<sup>+</sup> isoladas da MO humana, do SCUP e do sangue periférico estimulado pelo fator de estimulação de colônias de granulócitos (G-CSF) contêm progenitores endoteliais (CHACHQUES, 2003, GEHLING, 2000).

Alguns estudos têm provado o potencial das células CD133<sup>+</sup> adultas no papel da formação dos vasos sanguíneos pós-natal (SENEGAGLIA, 2008; TATEISHI-YUYAMA, 2002). A maioria das células CD133<sup>+</sup> co-expressam o CD34<sup>+</sup>. A maioria das CPE co-expressam marcadores como o CD133<sup>+</sup>, porém este é extremamente raro no sangue periférico, representado aproximadamente 0,02%, sendo que seu número pode ser aumentado depois do tratamento com citocinas de mobilização (REHMAN, 2003). Esta baixa concentração de células resulta na necessidade da

expansão destes progenitores *in vitro* para obtermos um número de células adequado e assim ter um resultado efetivo com este tipo de transplante celular. Se a indução da angiogênese ou da arteriogênese é necessária, então células progenitoras derivadas da MO são a melhor escolha (SCHAWRTZ, 2003).

Embora seja uma característica das CT e progenitoras, a habilidade de proliferar e originar células funcionais, a definição primária das CPE é dada pela expressão de seus antígenos de superfície (INGRAM, 2004). As CPE expressam, com diferentes intensidades, uma variedade de marcadores que são típicos para a linhagem endotelial (IWAMI, 2004). A expressão dos marcadores CD34 e CD133, nas CPE, diminui com a maturação e diferenciação dessas células em células semelhantes às CE (MIRAGLIA, 1997).

Baseado na expressão ou não de alguns marcadores celulares para caracterizar as CPE, utilizamos os antígenos abaixo (ANEXO 3):

#### 2.4.1 Antígeno CD14.

A molécula CD14, também é conhecida como receptor LPS, possui atividade bioquímica como receptor de endotoxinas. Sua estrutura molecular é composta por 356 aminoácidos, sendo seu peso molecular de aproximadamente 48 kDa. O CD14 é expresso fortemente pelos monócitos do sangue periférico e fracamente pelos neutrófilos e não pelos linfócitos, plaquetas ou eritrócitos normais (PROW, 1999a).

#### 2.4.2 Antígeno CD31.

A molécula CD31 é conhecida como molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1), sua atividade bioquímica está direcionada a adesão molecular, sendo uma proteína transmembranar com massa molecular entre 130 e 140 kDa. O CD31 é normalmente expresso nas CE adultas, plaquetas, leucócitos e seus precursores, nas junções célula-célula *in vitro* em diferentes níveis, em monócitos, neutrófilos e células natural-killer (PROW, 1999f).

#### 2.4.3 Antígeno CD34.

É uma glicoproteína de superfície celular e funciona como um fator de adesão célula-célula. Ela também pode mediar a inserção da CT à matriz extracelular da MO ou diretamente com as células do estroma. A molécula CD34 possui peso molecular de aproximadamente 116 kDa. É expressa em CT, CE de pequenos vasos, fibroblastos e algumas células de tecido nervoso. Também é expressa em células progenitoras hematopoiéticas (PROW, 1999b).

#### 2.4.4 Antígeno CD45.

É uma proteína transmembrana, com peso molecular entre 180 e 220 kDa, e que está de várias formas presente em todas as células diferenciadas hematopoiéticas. A família CD45 é constituída por vários membros que são todos produtos de um único gene complexo. Suas várias isoformas são: CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RAB, CD45RAC, CD45RBC, CD45RO, CD45R. É expresso em todas as células hematopoiéticas adultas, linfócitos e está presente como maior componente do glicocálix (PROW, 1999e).

#### 2.4.5 Antígeno CD90.

É conhecido também como Thy-1, pertence à família das imunoglobolinas, e seu peso molecular está entre 25 e 35 kDa. É expresso em células hematopoiéticas, neurônios, fibroblastos e células mesenquimais (PROW, 1999c).

#### 2.4.6 Antígeno CD105.

O CD105 é expresso na superfície celular como uma proteína transmembrana de 180 kDa, sendo conhecido também pelo nome de endoglina. É principalmente expresso em CE de pequenos e grandes vasos, monócitos e macrófagos (PROW, 1999d).

#### 2.4.7 Antígeno CD133.

O antígeno CD133 é uma glicoproteína transmembranar com 120 kDa de peso molecular, expressa em populações celulares progenitoras, como as hematopoiéticas e endoteliais. Também é conhecido como PROML 1 e no rato é chamado de prominina. É utilizado como marcador característico de CPE e tronco hematopoiéticas (PROW, 2001).

#### 2.4.8 Antígeno CD144.

Pertence a superfamília da caderina e está localizado no cromossomo 16. Também é conhecido como caderina-VE. Apresenta peso molecular de 130 kDa. Desempenha papel importante na biologia das CE através do controle da coesão e organização das junções intercelulares (KIM, 2005).

#### 2.4.9 Fator de von Willebrand – fvW.

É uma glicoproteína de estrutura multimérica, sintetizada exclusivamente por CE e megacariócitos. Além de atuar na adesão e agregação plaquetária, como molécula de adesão, participa como transportador do fator VIII da coagulação (de origem hepática). O fvW possui subunidades idênticas, com migração eletroforética de 225 kDa. Essas subunidades se interligam para formar multímeros de tamanhos variados, chegando a 20.000 kDa (LOPES, 1998).

### **2.5 FATORES DE CRESCIMENTO.**

A secreção de fatores de crescimento pelas células de MO poderia induzir células progenitoras cardíacas residentes a entrar em ciclo celular, multiplicando e diferenciando-se nos três tipos celulares necessários à regeneração cardíaca: cardiomíocitos, células musculares lisas e endoteliais (CARVALHO, 2009).

Senegaglia e colaboradores, em 2010, mostraram a concentração ideal dos fatores de crescimento, VEGF, b-FGF e IGF-I, para o uso na expansão celular das CPE.

### 2.5.1 Fator de Crescimento Endotelial Vascular – VEGF.

O VEGF é membro de uma família de citocinas que exercem funções críticas na angiogênese fisiológica e patológica e na linfangiogênese (DVORAK, 2002). No final da década de 80, o VEGF foi caracterizado como um fator potente para a proliferação vascular, difusível e específico para células do endotélio. Essas definições conduziram à hipótese de que esta molécula desempenharia um papel ímpar na regulação do crescimento vascular, fisiológico ou patológico (FERRARA, 2002).

O VEGF pertence a um grupo de glicoproteínas diméricas e é subdividido em: VEGFA, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E VEGFF (YAMAZAKI, 2005; FERRARA, 2003). Possuem uma estrutura comum de oito resíduos de cisteína no domínio de homologia do VEGF. Destes, o VEGFA, ou apenas VEGF, é o fator mais bem estudado e compreendido (ROY, 2006). Essa glicoproteína é expressa em diversas isoformas a partir de *splicing* alternativo VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189, e VEGF206. Entre essas, as principais são VEGF121 e VEGF165 (KERBEL, 2008).

A ativação do VEGF desencadeia diversas rotas de sinalização intracelular que resultam em proliferação, sobrevivência, mitogênese, migração e diferenciação das células endoteliais, assim como sua atuação no aumento da permeabilidade vascular (HICKLIN, 2005).

O VEGF induz a angiogênese atuando diretamente nas células endoteliais ao se ligar e ativar receptores de membrana pertencentes à família de receptores tirosina quinase. Eles são conhecidos como VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase 1 ou Flt-1) (SHIBUYA, 2006), VEGFR-2 (fetal liver kinase, Flk-1 ou KDR) e VEGFR-3 (fms-like tyrosine kinase 4, Flt4) (POURGHOLAMI, 2008). VEGFR-1 e VEGFR- 2 são expressos nas células do endotélio vascular. VEGFR-2 e VEGFR-3 são os principais receptores da sinalização nas células endoteliais dos vasos sanguíneos e linfáticos, respectivamente.

A noção de que o VEGF é um regulador importante do desenvolvimento dos vasos sanguíneos no embrião e no adulto é ilustrada pela observação de que a primeira molécula conhecida, expressa na população de células mesodermiais, originando os hemoangioblastos, foi o VEGFR-2 (RISAU, 1995).

O VEGF é um potente mitógeno para as CE que promove a proliferação e migração dessas células, remodelamento da matriz extracelular, formação de túbulos capilares e rede vascular (SHEN, 2001). O VEGF estimula o nascimento de vasos sanguíneos e produz sinais cruciais para o recrutamento de células progenitoras circulantes para auxiliar nos mecanismos de reparo no enfarte do miocárdio. Segundo Flame e colaboradores, em 1995, o VEGF é um regulador da vasculogênese e da angiogênese e está envolvido nos primeiros passos da diferenciação do hemoangioblasto.

O VEGF potencializa o aumento de permeabilidade microvascular que pode preceder ou acompanhar a angiogênese (HOEBEN, 2004). Este fator possui atividade mitogênica em CE com grande afinidade por seus sítios de ligação, os receptores nas CE flk-1 e flt-1 (LEUNG, 1989; DeVRIES, 1992). O VEGF pode ser expresso por diferentes tecidos, incluindo cérebro, rim, fígado e baço, além de muitos tipos celulares (HOEBEN, 2004).

Durante a embriogênese, o VEGF também está presente promovendo a diferenciação e proliferação de CE e a formação de vasos imaturos (DVORAK, 1995).

Além de sua função durante a angiogênese, o VEGF possui papel crucial em algumas condições fisiológicas do organismo. O VEGF é detectável em áreas onde as CE permanecem quiescentes, tais como pulmão, coração e cérebro, desta forma este fator está envolvido no papel de sobrevivência destes tecidos (LIEKENS, 2001).

Segundo Asahara e colaboradores, em 1995, a indução do VEGF e do b-FGF (fator de crescimento de fibroblasto básico) na mobilização de CPE resultou em aumento do número destas células diferenciadas *in vitro*, e da neovascularização da córnea em modelos animais *in vivo*. O sinergismo desses dois mitógenos angiogênicos pode ter implicações para o tratamento de pacientes que necessitam de revascularização.

Em nosso estudo usamos o VEGF modelo V7259 da empresa Sigma, Estados Unidos.

### 2.5.2 Fator de Crescimento de Fibroblasto Básico – b-FGF.

Os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) são parte de uma família de fatores de crescimento, ligados à heparina e a oncogenes, com, pelo menos, 18 membros estruturalmente relacionados (ESCH, 1985).

Os FGFs, como o VEGF, também estimulam as CE para síntese de protease, incluindo o ativador de plasminogênio, metaloproteinases importante para a digestão da matriz extracelular em processos de angiogênese (CARMELIET, 2000).

O b-FGF é um importante regulador da proliferação, migração e produção de proteases das células progenitoras, tendo um papel importante em vários processos fisiológicos e patológicos (MASON, 1994). Culturas *in vitro* de CE privadas de b-FGF são levadas a apoptose (HARTNETT, 1999), e o estudo de Risau e colaboradores, em 1995 demonstra que o b-FGF é um dos principais fatores para o desenvolvimento do hemoangioblasto.

### 2.5.3 Fator de Crescimento Semelhante à Insulina – tipo I – IGF-I.

Os IGFs são fatores de promoção do crescimento com estrutura molecular homóloga à da insulina, encontrados na forma de IGF-I e IGF-II. Estes fatores são sintetizados pelo fígado e pela maioria das células orgânicas (GOMES, 2003), em resposta à ativação promovida pelo hormônio de crescimento (GH) ou de forma GH-independente (COOPER, 1994).

Os IGFs podem influenciar o crescimento, diferenciação e metabolismo celulares e encontram-se ligados a proteínas carreadoras. Por ser um polipeptídeo que pode atuar de forma endócrina, parácrina e autócrina, influenciando a proliferação celular em diversos tecidos, o IGF-I tem sido muito estudado (CLIFFORD, 1999).

O IGF-I é um mitógeno para várias células, dentre as quais estão os fibroblastos, os osteoblastos, as células da musculatura lisa, as células fetais do cérebro, as células neurogliais e as progenitoras eritróides. O IGF-I regula eventos específicos na fase G1, do ciclo celular animal, controlando a proliferação e a diferenciação celular (ZUMSTEIN, 1987).

Por estar amplamente distribuído nos tecidos animais, o IGF-I tem inúmeras atividades biológicas, entre elas o aumento do crescimento e do desenvolvimento tecidual (LI, 2003).

### **3 OBJETIVOS**

### 3.1 OBJETIVO GERAL.

Expandir e diferenciar CT presentes na população de CM obtidas de MO de ratos Wistar em células semelhantes às endoteliais.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Isolar CT presentes na população de CM, expandi-las e diferenciá-las *in vitro* utilizando fatores de crescimento específicos para CE.
- Caracterizar imunofenotipicamente, por citometria de fluxo, as células isoladas e expandidas / diferenciadas.
- Avaliar por microscopia de fluorescência a presença do fvW nas células isoladas e expandidas / diferenciadas.
- Avaliar funcionalmente as células expandidas / diferenciadas por meio de ensaios de formação de túbulos capilares *in vitro*.

## **4 METODOLOGIA**

#### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS.

O presente projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CEUA PUCPR) com registro número 298 e parecer número 222/07 CEUA PUCPR com o parecer APROVADO (ANEXO 1).

Todos os animais receberam cuidados profissionais em concordância com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal e o Manual sobre Cuidados e Uso de Animais em Laboratório”, formulado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, em 1999.

#### 4.2 COLETA DA MEDULA ÓSSEA DE RATOS WISTAR.

Para obtenção da MO foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus albinus. Rodentia Mammalia*), da linhagem Wistar, adultos e com peso médio de 200 gramas (aproximadamente dois meses de idade).

A coleta da MO dos ratos Wistar foi realizada de acordo com Rebelatto e colaboradores (2004). A eutanásia do animal foi realizada através do deslocamento da cervical, precedida de anestesia, administrando-se de forma intramuscular ketamina (50 mg/kg – Vetanarcol 5%, König, Argentina) e Xylazina (10 mg/kg – Syntec, Brasil). Utilizando-se material cirúrgico adequado, o fêmur e a tíbia foram retirados, limpos e colocados sobre uma placa de Petri contendo PBS (Tampão salino-fosfato, 7,2, sem cloreto de cálcio e sem cloreto de magnésio, Gibco, Estados Unidos) com 1% de antibiótico (ATB): solução pronta com penicilina 200 U/mL - e estreptomicina 100 µg/mL (Gibco, Estados Unidos). Para a retirada da MO foi utilizada seringa contendo meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, Estados Unidos) e heparina sódica (liquemine 5.000 UI/mL, Cristália, Brasil).

### 4.3 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA.

As CM foram isoladas de acordo com a técnica de Boyum (1968), baseada no princípio de centrifugação em barreira de densidade, utilizando-se solução de Ficoll-Hypaque (FH - Sigma, Estados Unidos) de densidade  $1,077 \text{ g/m}^3$ , porém com algumas modificações.

A amostra total obtida na coleta da MO foi diluída na proporção de 1:2 em meio de trabalho<sup>1</sup>. Posteriormente a amostra foi cuidadosamente colocada sobre o gradiente de densidade FH, sendo que a razão entre o gradiente e a amostra não fosse menor que 3:1. Em seguida, as células foram centrifugadas por 30 minutos a  $650g$  sem freio (Eppendorf 5810R). Após a centrifugação, formou-se um anel de CM na interfase entre o plasma diluído e o gradiente de densidade, o qual foi retirado com o auxílio de pipeta graduada. Esta suspensão foi transferida para um novo tubo cônico, acrescentou-se cerca de 20 mL de meio de trabalho e centrifugou-se a  $450g$  por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o botão de células foi ressuspensionado em meio de trabalho. Quando necessário, antes de descartar o sobrenadante, este foi passado por um filtro de  $100 \mu\text{m}$  (Falcon, Estados Unidos) para retirar o excesso de coágulos. Realizou-se a contagem de células, com auxílio de Câmara de Neubauer (Loptik Labor) e avaliação da viabilidade celular com o corante Azul de Trypan (Sigma, Estados Unidos).

### 4.4 SELEÇÃO POSITIVA DAS CÉLULAS CD133<sup>+</sup>.

As células CD133<sup>+</sup> foram selecionadas utilizando-se o conjunto de micropérolas (MACS Micropérolas, Miltenyi Biotec, Alemanha) acopladas ao anticorpo anti- CD133, seguindo as instruções do fabricante (FIGURA 5).

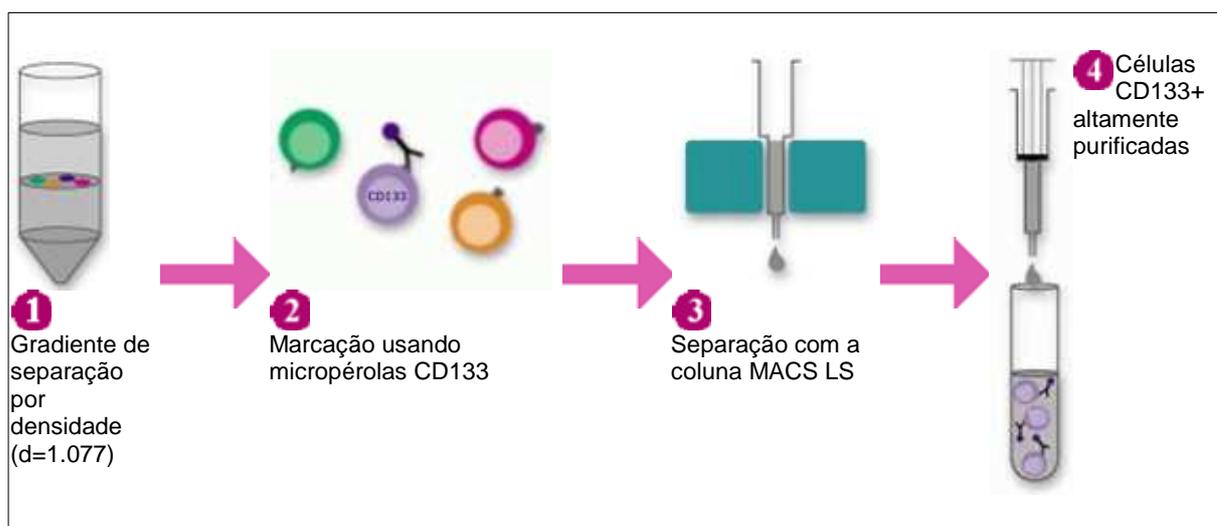
Resumidamente o meio contendo as CM foi incubado com o anticorpo anti CD133 humano, que estava previamente associado à micropérola e foi transferido para uma coluna (Colum LS, Miltenyi Biotec, Alemanha) acoplada a um campo magnético. As células ligadas ao anticorpo anti CD133 foram atraídas pelo campo

---

<sup>1</sup> MEIO DE TRABALHO – meio de cultura DMEM previamente acrescido de penicilina 200 U/mL (Gibco, Estados Unidos), estreptomicina 100  $\mu\text{g/mL}$  (Gibco, Estados Unidos) e 0,00038g de HEPES (Sigma, Estados Unidos).

magnético e as demais células (negativas para CD133) passavam livremente pela coluna, sendo desprezadas no decorrer de duas lavagens.

Ao fim do processo a coluna foi retirada da ação do campo magnético e as células CD133<sup>+</sup> resultantes foram lavadas com PBS e centrifugadas formando no fundo do tubo um botão concentrando de células purificadas, que foram ressuspensas em meio de trabalho. As células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi avaliada com o corante Azul de Trypan.



**Figura 5:** Representação esquemática da purificação das células progenitoras endoteliais para o marcador CD133 (Adaptado de [http://www.miltenyibiotec.com/en/PG\\_623\\_1\\_CD133\\_MicroBead\\_Kit.aspx](http://www.miltenyibiotec.com/en/PG_623_1_CD133_MicroBead_Kit.aspx)).

#### 4.5 SELEÇÃO NEGATIVA DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS EXCLUINDO AS CÉLULAS CD14<sup>+</sup> E CD45<sup>+</sup>.

Por essa metodologia, a purificação das CPE foi obtida por seleção negativa utilizando as micropérolas metálicas (MACS Micropérolas, Miltenyi Biotec, Alemanha) ligadas aos anticorpos anti CD14 e CD45 de rato. Para tanto, primeiramente foi necessário conjugar as micropérolas aos respectivos anticorpos.

#### 4.5.1 Acoplamento do anticorpo CD45 de rato.

O acoplamento foi realizado a partir de 1 mL de micropérolas (Dynabeads M-450 Epoxy, Invitrogen, Noruega) que foram misturadas a 1 mL do tampão 1<sup>2</sup> e foram colocadas no campo magnético. Após duas lavagens as micropérolas foram ressuspensas em 200 µL do tampão 1 e foram adicionados 800 µL do anticorpo anti CD45 (purified Mouse Anti-rat CD45, BD, Estados Unidos). A mistura foi incubada por 15 minutos e depois foi adicionado 0,1% de soro albumina humana (Sigma, Estados Unidos). Uma nova incubação em temperatura de 21°C por um tempo 18 horas foi realizada para que o acoplamento entre as micropérolas e o anticorpo ocorresse. Após esse período aproximou-se o tubo do campo magnético por 1 minuto e o sobrenadante foi desprezado, sendo adicionado o tampão 2<sup>3</sup> e incubado por 5 minutos com rotação. Este procedimento foi realizado mais 2 vezes e então as micropérolas foram retiradas do campo magnético e ressuspensas com o tampão 2.

O mesmo procedimento foi realizado para o acoplamento do anticorpo anti-CD14 (puro anti-rato TCD14 – T-19, Santa Cruz, Alemanha) às micropérolas.

#### 4.5.2 Seleção negativa.

Foram utilizados 50 µL de micropérolas acopladas ao anticorpo anti-CD14 e incubados por 30 minutos em temperatura entre 2 e 8°C com  $5 \times 10^6$ /mL de CM obtidas da MO dos ratos. Ao final da incubação foram adicionados 50 µL do tampão 2, o tubo foi colocado no campo magnético por 2 minutos. O sobrenadante foi retirado para um novo tubo e foram acrescentados 100 µL de micropérolas acopladas ao CD45, novamente a amostra foi incubada por 30 minutos em temperatura entre 2 e 8°C. Ao final da incubação foram adicionados 100 µL do tampão 2 e o tubo foi colocado no campo magnético por 2 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, pois o mesmo possuía agora as células não marcadas metalicamente, que são as células de interesse. As células foram retiradas da coluna e esta suspensão foi transferida para um tubo cônico, onde acrescentou-se 20 mL de meio de trabalho e centrifugou-se a 450g por 10 minutos.

---

<sup>2</sup> Tampão 1 - PBS e fosfato de sódio 0,1M (Sigma, Estados Unidos).

O sobrenadante foi descartado e o botão de células foi ressuscitado em 1 mL de meio de trabalho. Verificou-se a concentração das células em câmara de Neubauer e avaliou-se a viabilidade celular com o corante Azul de Trypan.

#### **4.6 EXPANSÃO CELULAR.**

As células foram distribuídas em frascos estéreis de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (TTP) com 5 mL de meio de trabalho na concentração de 2 x 10<sup>6</sup> células por cada mL de meio, sendo distribuídas em grupos com meio acrescentado para o início do cultivo celular conforme:

**GRUPO FATORES:** foi utilizado o meio de trabalho suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco, Estados Unidos) e fatores de crescimento; 1 ng/mL b-FGF (Invitrogen, Estados Unidos), 2 ng/mL IGF-I (Sigma, Estados Unidos) e 12,5 ng/mL VEGF (Sigma, Estados Unidos).

**GRUPO CONTROLE:** o meio utilizado foi o meio de trabalho suplementado apenas com 10% de SBF.

O meio foi trocado regularmente e quando as células estavam confluentes foram dissociadas dos frascos utilizando a enzima Tripsina / EDTA 0,25% (Gibco, Estados Unidos). Para realizar o processo de dissociação foi retirado o meio do frasco de cultivo e o mesmo foi lavado 2 vezes com PBS. Em seguida foi acrescentado 2 mL da enzima tripsina, o frasco foi homogeneizado e colocado em estufa umidificada com tensão de 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37° C (Thermo Electron Corporation) por um período de 5 minutos. Após a incubação o frasco foi agitado para soltar as células que ainda estavam aderidas ao mesmo. As células foram observadas em microscópio invertido (Olympus CK40) para verificar se estavam todas soltas. Foi então aplicado 2,5 mL de meio de trabalho e 0,5 mL de SBF. Esta suspensão foi transferida para um tubo cônico e centrifugada a 450g por 10 minutos. As células foram contadas em câmara de Neubauer e replaqueadas em frascos estéreis de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, sendo que a quantidade referente a 1 frasco seria replaqueada em 2 novos frascos.

---

<sup>3</sup> Tampão 2 - PBS com 0,1% de soro albumina humana (Sigma, Estados Unidos).

No trigésimo primeiro dia o cultivo celular foi interrompido, sendo as células retiradas dos frascos através do processo de dissociação enzimática, e realizou-se a contagem em câmara de Neubauer e as células foram divididas para os procedimentos de citometria, imunocitoquímica e para o ensaio de formação de túbulos capilares *in vitro*.

#### 4.7 CITOMETRIA DE FLUXO.

As células foram analisadas, em todos os momentos do estudo, para os seguintes marcadores característicos e com um corante vital, onde destacamos a expressão celular que pretendíamos destacar:

- CD14 – **monócitos**, granulócitos e macrófagos;
- CD31 – **CE adultas**, plaquetas, leucócitos e seus precursores;
- CD34 – **CT, CE de pequenos vasos**, fibroblastos e algumas células de tecido nervoso;
- CD45 – **células hematopoiéticas adultas** e linfócitos;
- CD90 – **células mesenquimais**, células hematopoiéticas, neurônios e fibroblastos;
- CD105 – **CE adultas** e células mesenquimais;
- CD133 – **CPE** e tronco hematopoiéticas;
- CD144 – **CE adultas**;
- 7AAD (7-amino-actinomicina D – BD, Estados Unidos) – corante vital que permite a análise da viabilidade celular.

Os tubos para a análise de citometria de fluxo foram compostos por amostras na concentração de  $1 \times 10^6$  e cada tubo foi incubado com até 4 anticorpos diferentes acoplados aos fluorocromos (TABELA 1). Os controles isotípicos utilizados como controle negativo da reação foram: FITC mouse IgG<sub>2a</sub> (isotiocianato de fluoresceína - BD, Estados Unidos), PE mouse IgG (ficoeritrina - BD, Estados Unidos), PE-Cy5 mouse IgG<sub>1</sub> (complexo de proteína clorofilada peridina - BD, Estados Unidos) e APC mouse IgG<sub>1</sub> (aloficocianina - BD, Estados Unidos).

**Tabela 1:** Painel de anticorpos monoclonais (AcMo) utilizados para análise das células pré e pós-cultivo. Legenda: - representa ausência de fluorocromo.

TUBO	FITC	PE	PE-Cy5	APC
1	Controle isotípico	Controle isotípico	Controle isotípico	Controle isotípico
2	CD14	CD90	CD45	CD34
3	CD31	-	7AAD	-
4	CD144	-	-	-
5	CD105	CD133	-	-

Para os anticorpos puros sem marcação de fluorocromos CD14 (puro anti-rato – TCD14 – T-19, Santa Cruz, Alemanha), CD105 (anti-CD105 humano, BD, Estados Unidos), e CD144 (puro anti-humano CD144, VE-Caderina, BD, Estados Unidos) (TABELA 2), a amostra foi incubada por 30 minutos para o anticorpo correspondente, CD14, CD105 ou CD144. Depois da incubação, a amostra foi lavada com 500  $\mu$ L de PBS e centrifugada a 450g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, sendo então acrescentado 5  $\mu$ L do anticorpo secundário ligado ao fluorocromo (FITC conjugate goat F anti-human IgG, Caltag, Estados Unidos) e incubou-se por 30 minutos no escuro. Novamente a amostra foi lavada com 500  $\mu$ L de PBS e centrifugada a 450g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, nos tubos 2 e 5 procedeu-se a incubação com os demais anticorpos já marcados e no tubo 4 foi acrescentado 500  $\mu$ L de PBS com 1% de paraformaldeído (Sigma, Estados Unidos).

Nos anticorpos já marcados comercialmente com seus respectivos fluorocromos CD31 (CD31 FITC anti-humano, BD, Estados Unidos), CD 34 (APC anti-humano CD34, BD, Estados Unidos), CD45 (PE-Cy5 anti-rato CD45 – OX-1, BD, Estados Unidos), CD90 (PE anti-humano CD90, BD, Estados Unidos), e CD133 (CD133/2 (AC141) – PE anti-humano, Miltenyi Biotec, Alemanha) (TABELA 2) a incubação foi realizada por 30 minutos no escuro. Ao fim da incubação foram acrescentado 500  $\mu$ L de PBS e a amostra foi centrifugada a 450g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se 500  $\mu$ L de PBS com 1% de paraformaldeído.

**Tabela 2:** Representação da marcação dos AcMo utilizados.

AcMo	Característica		Concentração utilizada (µg/mL)	Marca
Controle isotípico	Anti-camundongo	Conjugado FITC		BD
Controle isotípico	Anti-camundongo	Conjugado PE		BD
Controle isotípico	Anti-camundongo	Conjugado PE-Cy5		BD
Controle isotípico	Anti-camundongo	Conjugado APC		BD
CD14	Anti-rato	Puro	40	Santa Cruz
CD31	Anti-humano	Conjugado FITC		BD
CD34	Anti-humano	Conjugado APC		BD
CD45	Anti-rato	Conjugado PE-Cy5	40	BD
CD90	Anti-humano	Conjugado PE	40	BD
CD105	Anti-humano	Puro	100	BD
CD133	Anti-humano	Conjugado PE	10	BD
CD144	Anti-humano	Puro	100	BD
7AAD		Conjugado PerCp		BD

A aquisição dos dados foi feita no citômetro de fluxo FACS Calibur por meio do programa *Cell Quest*. Foram obtidos no mínimo 10.000 eventos por tubo de amostra.

A análise dos dados obtidos foi feita por meio do programa *FlowJo* que apresenta os dados em forma de gráficos, fornecendo a porcentagem de células que reagiram com um determinado anticorpo e permitindo a caracterização e quantificação das populações de células estudadas.

#### 4.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA.

A técnica de imunocitoquímica foi realizada pré e pós-cultivo. Na análise das células pré cultivo, estas foram centrifugadas em citocentrífuga (WESCOR, Cytopro 7620) e posteriormente marcadas com DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole – Invitrogen, Estados Unidos) e fvW (Dako, Dinamarca). Num segundo momento, a análise foi feita com as células pós cultivo, quando estas foram distribuídas numa concentração de 20.000 células por poço da placa de cultivo, onde foram colocadas

para crescer sobre uma lamínula. Posteriormente, estas células foram marcadas para DAPI e fvW.

**Tabela 3:** Representação da marcação dos AcMo utilizados.

<b>AcMo</b>	<b>Característica</b>		<b>Marca</b>
DAPI			Invitrogen
fvW	Anti-humano		Dako
Anticorpo secundário	Anti-coelho	Conjugado FITC	Sigma

Para se fazer a marcação as células foram lavadas 3 vezes com PBS e então fixadas com PBS + paraformaldeído 2% por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a fixação as células foram lavadas por 3 vezes novamente com PBS para se retirar o excesso de fixador e ao final as células foram incubadas por 10 minutos com PBS acrescido de 0,1M de glicina (Sigma, Estados Unidos). Foi retirado o PBS acrescido de glicina 0,1M e adicionado PBS + triton X-100 0,2 % (Sigma, Estados Unidos) para permeabilizar as células durante 10 minutos. O PBS com triton X-100 0,2% foi retirado e então foi usado o PBS + BSA 1% (Soro albumina bovina) para bloquear a reação e as células foram incubadas por 20 minutos. Após esta incubação foram adicionados 100 µL do anticorpo primário fvW diluído em PBS + BSA 0,2%, na concentração de 1:200, e as células foram incubadas por 3 horas em temperatura ambiente. Na sequência, foram realizadas 5 lavagens com PBS e após foi usado o PBS + BSA 0,2 % para bloquear a reação e as células foram incubadas por 20 minutos. Após esta incubação foram adicionados 100 µL do anticorpo secundário (anti-coelho – FITC, Sigma, Estados Unidos) também diluído com PBS + BSA 0,2%, mas agora na concentração de 1:80, e as células foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e no escuro. Novamente foi realizado 5 lavagens com PBS, seguido da adição de 1 mL de DAPI na concentração de 1:5 e incubado por 5 minutos. Foram realizadas mais 2 lavagens com PBS. Colocado 100 µL de água Mili-Q e secado o excesso de água. A lâmina foi montada com meio de montagem (GELMONT – Dako, Estados Unidos) e após 24 horas foram seladas com esmalte incolor.

Depois que as células foram marcadas para DAPI e fvW, as lâminas confeccionadas foram analisadas por meio do microscópio de fluorescência (Nikon

E-600). As imagens digitais foram capturadas utilizando uma câmera (CoolSNAP-PROcf – Media Cybernetics) conectada ao software Image Pro-Plus da Diagnostic Instruments. Para comprovar que a reação entre as células cultivadas e o anticorpo secundário não era inespecífica, realizou-se um experimento controle, onde as células cultivadas foram incubadas somente com o anticorpo secundário, sem a incubação prévia do anticorpo primário.

#### **4.9 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE TÚBULOS CAPILARES.**

O ensaio de formação de túbulos capilares *in vitro* foi realizado para estimular a ligação, migração e diferenciação das células cultivadas em tubos mimetizando a situação que ocorre *in vivo*.

Para realizar este ensaio o frasco de matrigel™ (BD, Estados Unidos) foi deixado em geladeira por 24 horas. No dia do ensaio foi plaqueado 250 µL de matrigel em placas de 24 poços (TTP) e deixado por 30 minutos a 37°C para polimerizar. Após a polimerização do matrigel, este foi recoberto com as células cultivadas com fatores de crescimento em uma densidade de 20.000 células em 250 µL de meio DMEM com os fatores de crescimento e 10% de soro bovino fetal. Iniciou-se a incubação das células em estufa umidificada com tensão de 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C (Thermo Electron Corporation). As células foram observadas e fotografadas com 2, 6, 18 e 24 horas em microscópio invertido (Olympus CK40) para verificar a formação de túbulos capilares. As imagens foram capturadas utilizando filme do tipo ISO100 em uma câmera Olympus (PM-C35DX) e foram posteriormente digitalizadas para sua utilização.

#### **4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.**

Para a fase inicial deste estudo, a análise estatística dos dados, utilizou o software SPSS v.14 (SPSS Inc). Os resultados obtidos no estudo foram expressos por valores mínimos e máximos, médias, medianas e desvios padrões. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilks. A

comparação dos resultados da imunofenotipagem foi realizada usando-se o teste não-paramétrico de Friedman. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística.

Na fase posterior deste estudo foram incluídos 15 ratos Wistar para avaliar a expansão e diferenciação de CM obtidas de MO de ratos Wistar em células semelhantes às endoteliais. As avaliações de diversos marcadores e da viabilidade foram feitas sobre a mesma unidade experimental (rato) em dois momentos: pré-cultivo e pós-cultivo, sendo que no pós-cultivo foi avaliado também o controle. O objetivo da análise foi comparar os resultados obtidos na avaliação pré-cultivo com os resultados das avaliações pós-cultivo e comparar as duas avaliações no pós-cultivo. Os resultados obtidos no estudo, também, foram expressos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Para a comparação dos resultados de duas avaliações dos marcadores, foi usado o teste não-paramétrico de Wilcoxon. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística.

## **5 RESULTADOS**

## 5.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE CÉLULAS MONONUCLEARES.

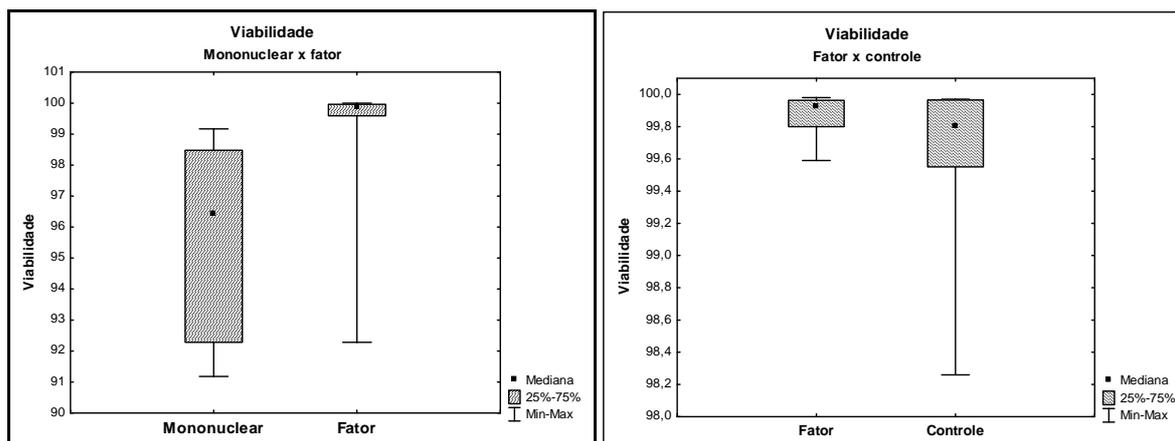
As CM para este estudo foram obtidas da MO de ratos Wistar e representaram em média  $77,25 \times 10^6$  células. A quantidade celular obtida para cada rato está representada na tabela 4. As células foram distribuídas em frascos de cultivo de  $25 \text{ cm}^2$  conforme o grupo de estudo, com fatores de crescimento ou controle.

**Tabela 4:** Número total de células mononucleares obtidas em cada rato utilizado ao estudo.

<b>Rato</b>	<b>Número de CM x10<sup>6</sup></b>
1	34,70
2	33,90
3	12,10
4	59,25
5	59,25
6	28,00
7	194,00
8	91,75
9	48,75
10	198,50
11	32,90
12	32,60
13	48,30
14	60,00
15	224,75
<b>Média</b>	<b>77,25</b>

## 5.2 VIABILIDADE CELULAR.

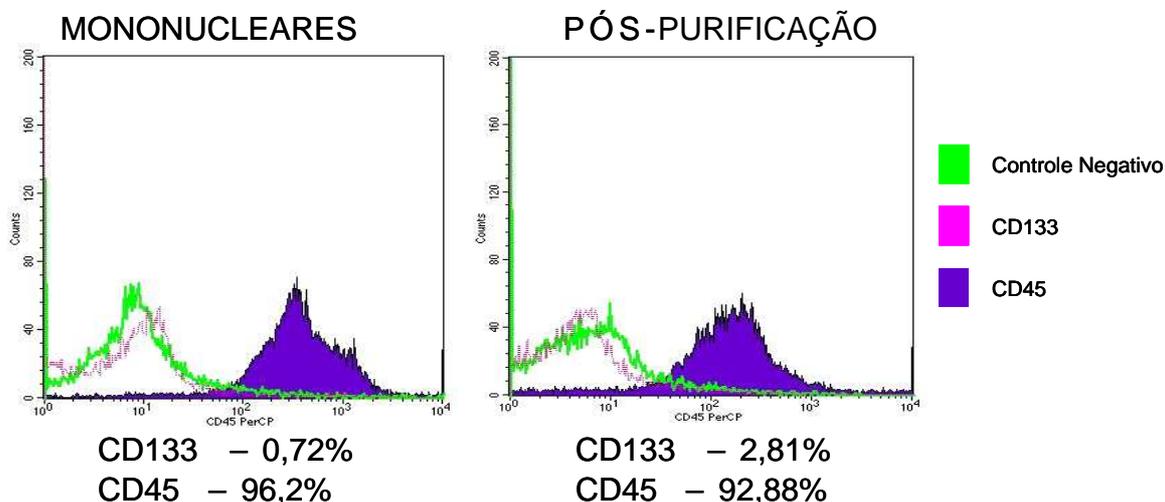
A viabilidade celular foi avaliada nos momentos de pré-cultivo e pós-cultivo, sendo comparados as CM (pré-cultivo) com as células cultivadas com os fatores de crescimento (pós-cultivo) e estas comparadas com as células cultivadas sem fatores (pós-cultivo). Podemos perceber que apesar da manipulação sofrida pelas células a viabilidade se manteve sempre superior a 90% (FIGURA 6). A avaliação das células foi realizada por citometria de fluxo, com o corante vital 7AAD.



**Figura 6:** Gráfico comparativo da porcentagem da viabilidade das amostras de MO de ratos Wistar pré-cultivo (grupo mononuclear) X pós-cultivo (grupo fator); e pós-cultivo (grupo fator) X pós-cultivo (grupo controle).

### 5.3 SELEÇÃO POSITIVA DAS CÉLULAS CD133<sup>+</sup>.

Os primeiros resultados obtidos na análise por citometria de fluxo com as células purificadas a partir de CM da MO de ratos Wistar mostraram um número de células positivas para CD133 extremamente baixo de 2,81%, enquanto que para CD45 foi obtido um número de 92,88% de células positivas (FIGURA 7). Esses dados evidenciam que a purificação para a obtenção das CPE, CD133<sup>+</sup>, da MO de ratos Wistar com a utilização de anticorpos monoclonais humanos foi ineficiente. A diferença entre os valores percentuais obtidos para os demais marcadores não demonstrou haver significância estatística entre as amostras pré-purificação (Pré-P) e pós-purificação (Pós-P).



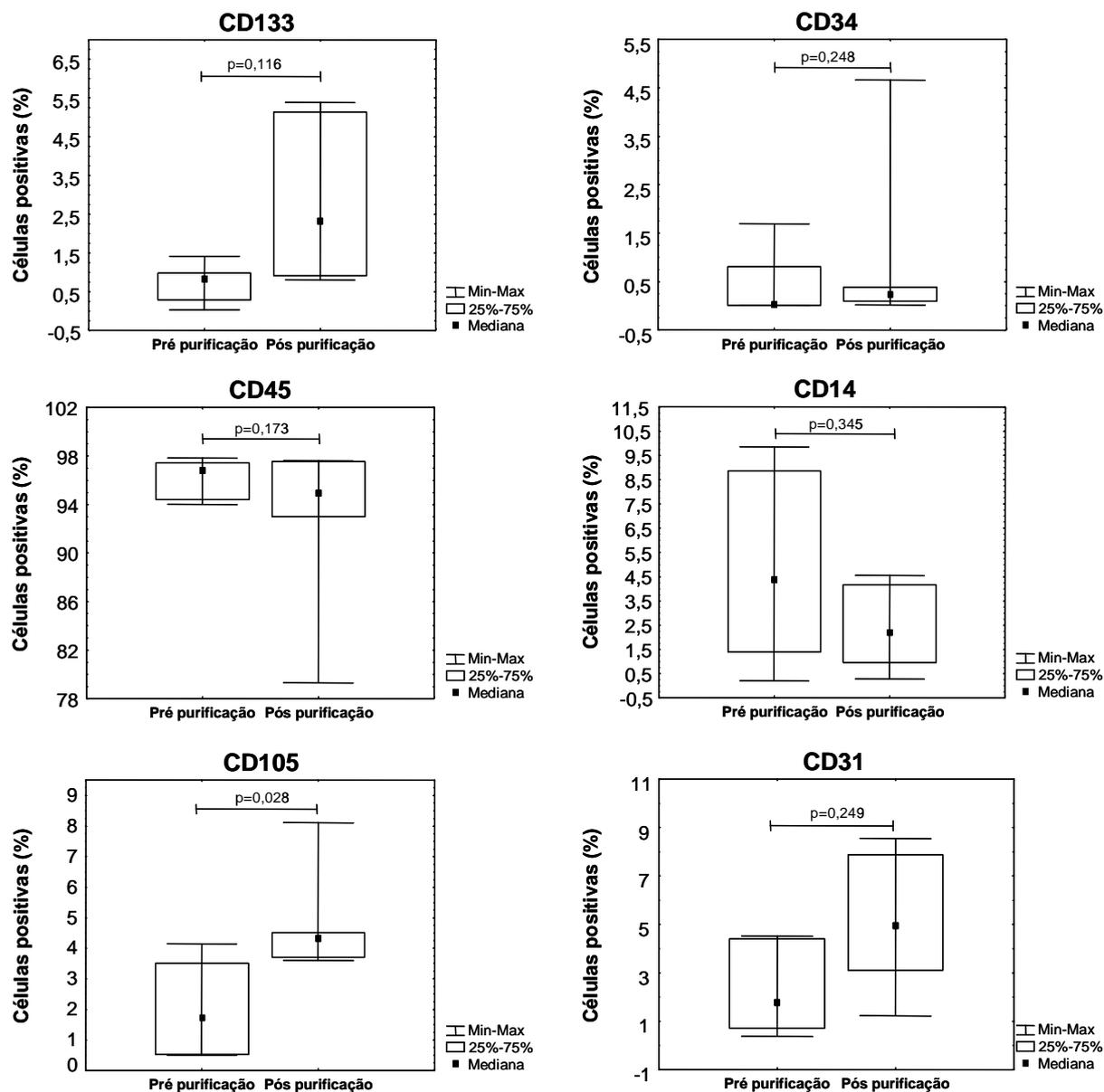
**Figura 7:** Gráfico da seleção positiva do CD133 no conjunto total de células e após a seleção.

As amostras provenientes da MO de ratos Wistar foram analisadas por citometria de fluxo para avaliar a porcentagem de células positivas para todos os anticorpos utilizados, a fim de caracterizar o fenótipo das populações celulares e a viabilidade das células obtidas no decorrer do estudo. Os resultados obtidos estão resumidos na tabela 5 e representados na figura 8.

Após a proliferação, aproximadamente 93% das células foram caracterizadas como CD45<sup>+</sup> o que demonstra uma grande quantidade de células da linhagem hematopoiética presente na população celular que seria submetida ao cultivo; e apenas 2,81% das células eram CD133<sup>+</sup>, o que representava uma pequena população frente ao número de células CD45<sup>+</sup>.

**Tabela 5:** Média dos valores obtidos para cada um dos anticorpos utilizados pré-purificação (Pré-P) e pós-purificação (Pós-P) em medula óssea de ratos Wistar.

CD133		CD34		CD45		CD14		CD105		CD31	
Pré- P	Pós-P	Pré-P	Pós-P	Pré-P	Pós-P	Pré-P	Pós-P	Pré-P	Pós-P	Pré-P	Pós-P
0,72%	2,81%	0,42%	0,94%	96,20%	92,88%	4,84%	2,39%	2,02%	4,76%	2,25%	5,11%
±0,51	± 2,14	± 0,70	± 1,83	±1,62	± 6,90	±3,87	± 1,71	±1,54	± 1,68	± 1,83	± 2,79

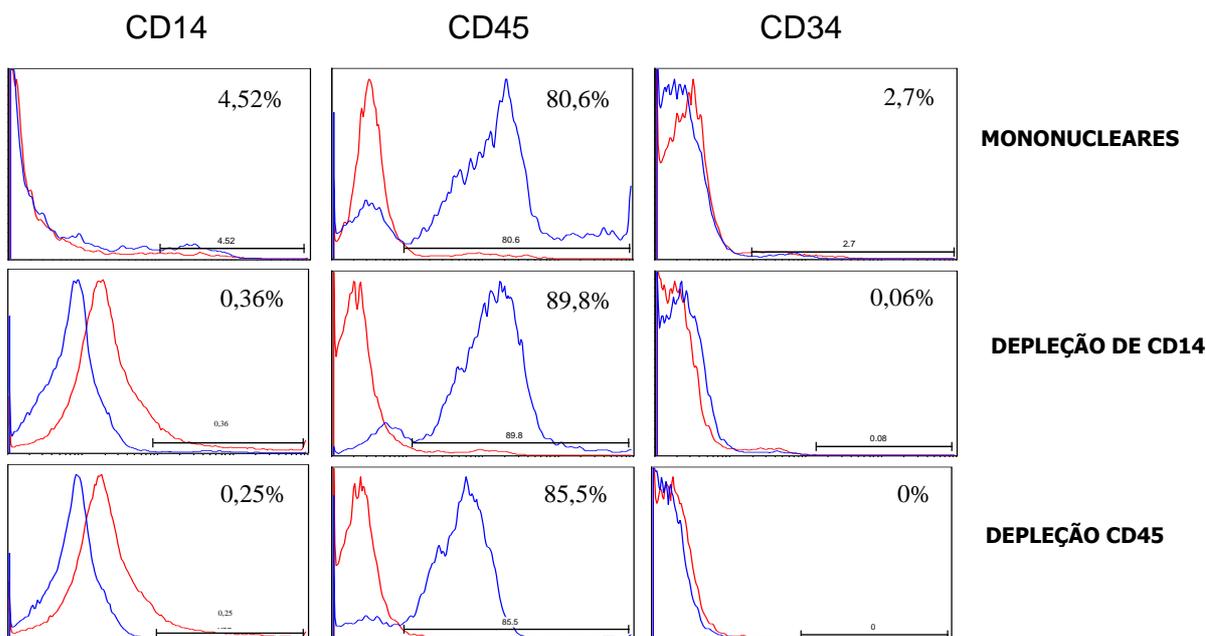


**Figura 8:** Gráficos comparativos de células positivas para os marcadores utilizados em amostras de medula óssea de ratos Wistar Pré-P e Pós-P.

#### 5.4 SELEÇÃO NEGATIVA DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS EXCLUINDO AS CÉLULAS CD14<sup>+</sup> E CD45<sup>+</sup>.

A purificação das CPE foi obtida por seleção negativa utilizando as micropérolas metálicas ligadas aos anticorpos anti CD14 e CD45 de rato. Onde primeiramente as células foram selecionadas negativamente para o CD14 e posteriormente para o CD45, para então se ter a população celular para o estudo.

Após a seleção negativa do CD14 foi verificada uma redução significativa desta população celular (0,36%), porém a população celular CD45 continuava em grande número. E após a seleção negativa do CD45 esta população não apresentava redução significativa (85,5%) (FIGURA 9). Um dado importante verificado foi o fato de que após a realização das duas etapas de seleção negativa a população referente à população celular CD34 foi reduzida a zero.



**Figura 9:** Gráfico da seleção negativa CD14 e CD45. Onde vermelho representa o controle negativo e azul o marcador avaliado.

## 5.5 EXPANSÃO CELULAR.

As células foram distribuídas em 2 grupos de estudos conforme a suplementação de cada meio. As mesmas foram distribuídas na concentração de  $2 \times 10^6$  células por mL de meio de trabalho, sendo este trocado a cada 3 ou 4 dias. Quanto o cultivo apresentava a confluência mínima de 80%, as células eram submetidas ao processo de dissociação enzimática. Em nosso estudo realizamos apenas uma passagem durante o processo de expansão celular.

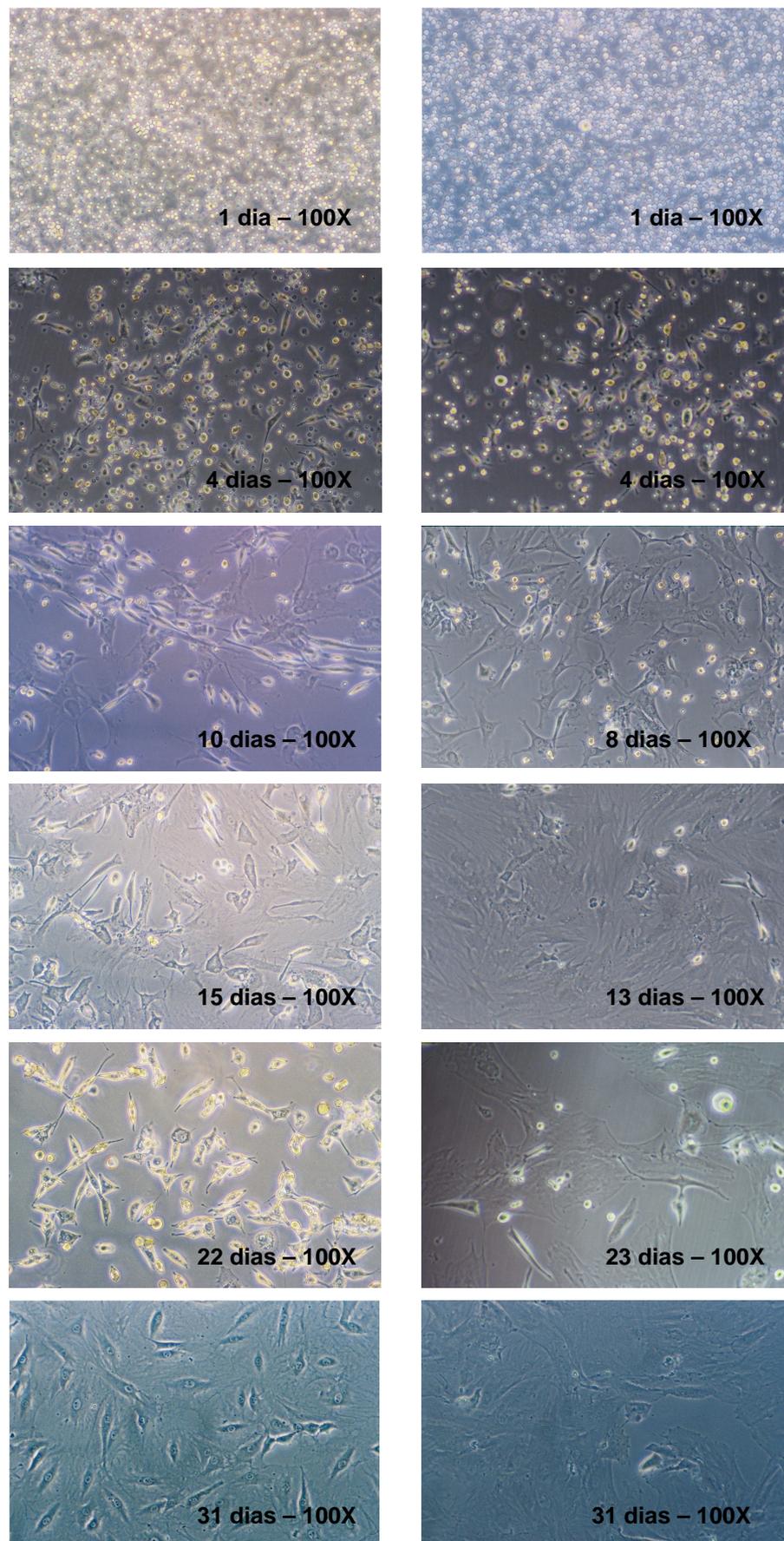
As células apresentavam as características a seguir descritas conforme cada grupo de estudo, e estão representadas na figura 10:

### 5.5.1 Cultivo grupo fatores.

Logo após o plaqueamento das CM com o meio contendo os fatores de crescimento, observaram-se poucas células aderentes, com morfologia arredondada, espalhadas e de baixa proliferação. A partir do 4º dia do cultivo as células já apresentavam aderência ao plástico do frasco de cultivo, com pequenas mudanças morfológicas. Por volta do 10º dia começavam a apresentar estrutura mais alongada e apresentavam uma tendência a formar colônias que também possuíam a forma alongada. Entre o 15º e 22º dia as células começavam a apresentar uma morfologia pavimentosa, com núcleo delimitado e citoplasma com limites imprecisos, as células apresentavam confluência máxima formando uma monocamada com morfologia semelhante a paralelepípedos, semelhante ao de CE. Ao final do 31º dia, após dissociação com a enzima Tripsina, as células foram coletadas e caracterizadas.

### 5.5.2 Cultivo grupo controle.

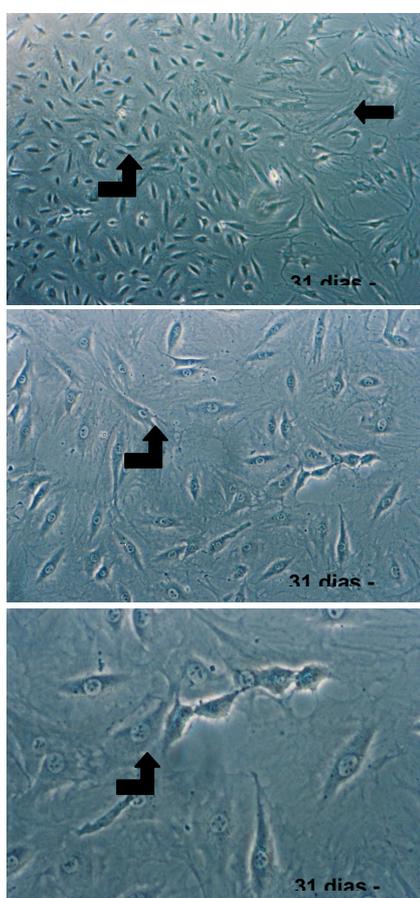
Após o plaqueamento das CM apenas com o meio de trabalho, observaram-se poucas células aderentes e com morfologia arredonda. Semelhante ao cultivo com os fatores de crescimento, a partir do 4º dia do cultivo as células já apresentavam aderência ao plástico do frasco de cultivo, com pequenas mudanças morfológicas. Por volta do 8º dia começavam a apresentar estrutura mais alongada e apresentavam uma tendência a formar colônias que também possuíam a forma alongada, porém era possível perceber uma sutil diminuição na quantidade de células. Entre o 13º e 23º dia as células começavam a apresentar uma morfologia fusiforme, com núcleo delimitado. Por vezes, apresentavam confluência máxima. Ao final do 31º dia as células apresentavam um aspecto disforme, e após dissociação com a enzima Tripsina, as células foram coletadas e caracterizadas.



**Figura 10:** Paineil representativo dos cultivos realizados. Coluna da esquerda representa o cultivo com fatores de crescimento. Coluna da direita representa o cultivo controle.

Resumidamente, as principais diferenças entre os grupos estudados surgiram por volta do 10º dia de cultivo, onde as células cultivadas com os fatores de crescimento começaram a apresentar morfologia semelhante a CE. E por volta do 23º dia, onde as células do grupo controle começaram a diminuir em número.

Os cultivos realizados com os fatores de crescimento, sem purificação prévia das células CD133<sup>+</sup>, demonstraram a possibilidade de seleção de uma pequena população de CE. Em um momento específico do cultivo foi evidenciado a presença de dois tipos celulares com morfologias distintas (FIGURA 11). Uma com morfologia semelhante à CE e a outra semelhante à células mesenquimais.



**Figura 11:** Cultivos realizados mostrando as células já em colônias. As setas  representam as células com morfologia semelhante à células endoteliais. A seta  representa as células com morfologia semelhante à células mesenquimais.

## 5.6 CITOMETRIA DE FLUXO

As análises de citometria de fluxo foram realizadas nos momentos pré-cultivo (grupo de células mononucleares) e pós-cultivo (grupo de células cultivadas com

fatores de crescimento e grupo controle com células cultivadas sem fatores de crescimento).

No pré-cultivo podemos ressaltar os resultados da caracterização obtidos para os marcadores, CD34, CD45 e CD144, onde em média representam 68,40%, 82,67% e 0,98%, respectivamente. Deste modo concluímos que as células utilizadas para o cultivo eram células progenitoras, de linhagem hematopoiética e não apresentavam características de células semelhantes a CE (FIGURA12).

		<b>Pré-cultivo</b>					
		CD14+	CD34+	CD45+	CD90+	CD31+	CD144+
<b>Rato 1</b>	mononuclear	0,73	87,04	93,02	0,73	0,32	
<b>Rato 2</b>	mononuclear	0,40	92,80	94,56	0,74	0,08	
<b>Rato 3</b>	mononuclear	1,00	77,05	94,28	1,16	0,24	
<b>Rato 4</b>	mononuclear	0,39	33,99	68,00	0,80	0,11	
<b>Rato 5</b>	mononuclear	1,31	73,04	84,56	1,64	0,14	
<b>Rato 6</b>	mononuclear	1,05	74,66	90,84	1,28	0,12	
<b>Rato 7</b>	mononuclear	1,27	59,05	72,06	1,16	0,07	2,88
<b>Rato 8</b>	mononuclear	0,33	61,98	77,19	0,83	0,03	0,51
<b>Rato 9</b>	mononuclear	3,60	65,51	75,14	3,89	0,19	0,16
<b>Rato 10</b>	mononuclear	1,16	58,85	77,05	1,71	0,12	0,36
<b>média</b>		<b>1,12</b>	<b>68,40</b>	<b>82,67</b>	<b>1,39</b>	<b>0,14</b>	<b>0,98</b>

**Figura 12:** Comparativo percentual entre as médias obtidas das CM no momento pré-cultivo.

No pós-cultivo ressaltamos os resultados da caracterização das células cultivadas com fatores de crescimento obtidos para os marcadores, CD34, CD45 e CD144, onde em média representam 15,53%, 7,27% e 1,19%, respectivamente. Assim concluímos que as células após o cultivo continuavam células progenitoras, mas já não tão comprometidas com a linhagem hematopoiética e apresentavam discreto aumento do marcador característico para células semelhantes a CE (FIGURA13).

		<b>Pós-cultivo</b>					
		CD14+	CD34+	CD45+	CD90+	CD31+	CD144+
<b>Rato 1</b>	fatores	0,07	17,01	5,17	0,86	0,01	0,62
<b>Rato 4</b>	fatores	0,16	12,73	10,38	5,82	0,00	0,55
<b>Rato 5</b>	fatores		2,32	0,03	0,53		0,21
<b>Rato 7</b>	fatores		2,88	0,36	0,23	0,04	0,05
<b>Rato 8</b>	fatores	5,05	8,86	4,79	1,78	0,58	0,52
<b>Rato 10</b>	fatores		49,39	22,90	5,95		5,19
<b>média</b>		<b>1,76</b>	<b>15,53</b>	<b>7,27</b>	<b>2,53</b>	<b>0,16</b>	<b>1,19</b>

**Figura 13:** Comparativo percentual entre as médias obtidas das células cultivadas com os fatores de crescimento no momento pós-cultivo.

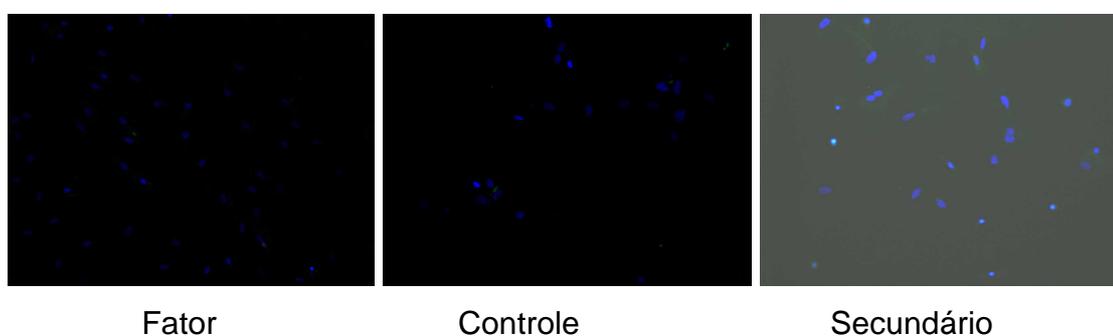
Já no pós-cultivo do grupo de células cultivadas apenas com meio de trabalho, ou seja, grupo controle, ressaltamos os resultados da caracterização obtidos para os marcadores, CD34, CD45 e CD144, onde em média representam 30,12%, 12,29% e 0,62%, respectivamente. Desta forma podemos concluir que as células que foram submetidas ao cultivo sem a utilização de fatores de crescimento continuavam apresentando características de células progenitoras, porém sem um comprometimento específico com alguma linhagem celular (FIGURA 14).

		Pós-cultivo					
		CD14+	CD34+	CD45+	CD90+	CD31+	CD144+
<b>Rato 4</b>	controle	0,89	28,64	20,76	15,44	0,21	0,42
<b>Rato 7</b>	controle		3,16	1,31	1,05		0,06
<b>Rato 8</b>	controle		35,38	3,75	6,19		1,55
<b>Rato 10</b>	controle	12,15	53,30	23,32	2,20	0,22	0,44
<b>média</b>		<b>6,52</b>	<b>30,12</b>	<b>12,29</b>	<b>6,22</b>	<b>0,22</b>	<b>0,62</b>

**Figura 14:** Comparativo percentual entre as médias obtidas das células cultivadas apenas com o meio de trabalho no momento pós-cultivo.

## 5.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA

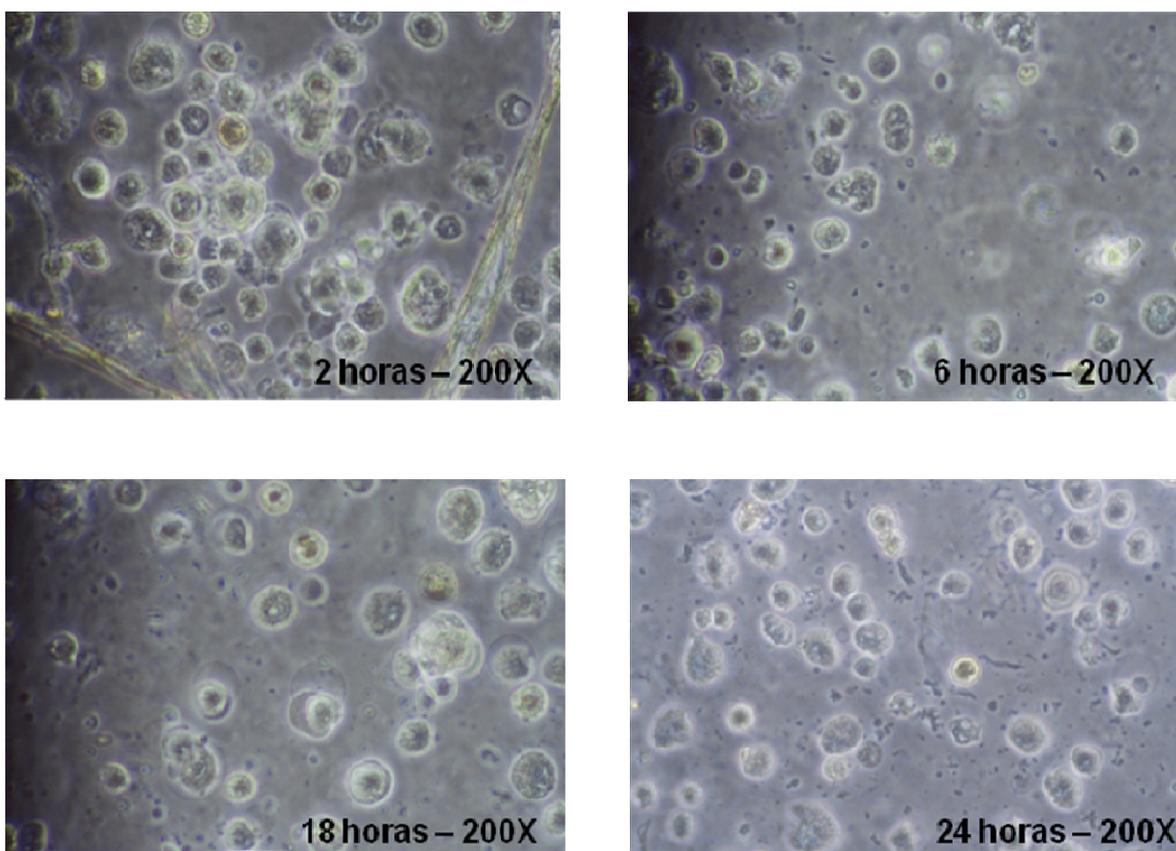
Por meio da análise do experimento controle da imunofluorescência para o fvW foi demonstrado a existência de reação inespecífica para o anticorpo secundário conjugado ao FITC. Sendo assim, não foi possível evidenciar a reação positiva para esta reação (FIGURA 15).



**Figura 15:** Comparativo entre os grupos fator e controle para o Fator de von Willebrand. Em ambos os grupos, fator e controle, foi evidenciado a formação de reação para o anticorpo fvW. Quando realizado o experimento para controle da reação do anticorpo secundário utilizado, foi evidenciado a reação inespecífica para este anticorpo.

## 5.8 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE TÚBULOS CAPILARES

Este ensaio foi proposto para avaliar a função das células cultivadas em sua capacidade, *in vitro*, para formarem túbulos capilares quando plaqueadas sobre o Matrigel™. Após o plaqueamento as células foram analisadas e fotografadas com 2, 6, 18 e 24 horas. A análise das células demonstrou que, imediatamente após o plaqueamento, as células apresentavam morfologia arredondada e encontravam-se espalhadas pela superfície aleatoriamente, sem a formação de túbulos capilares. Ao final deste tempo não foi possível evidenciar a formação dos túbulos capilares (FIGURA 16).



**Figura 16:** Ensaio de formação de túbulos capilares de células cultivadas com os fatores de crescimento. Em 2 horas as células se apresentavam dispersas na matriz, mas sem direcionamento específico. Com 6 horas de experimentos nota-se uma discreta migração das células na intenção de formar espaços entre as mesmas. Porém no decorrer do experimento, tanto com 18 horas como com 24 horas, essa migração não foi mais evidenciada e a formação dos túbulos capilares não ocorreu.

## 5.9 ANÁLISE DOS GRUPOS ESTUDADOS

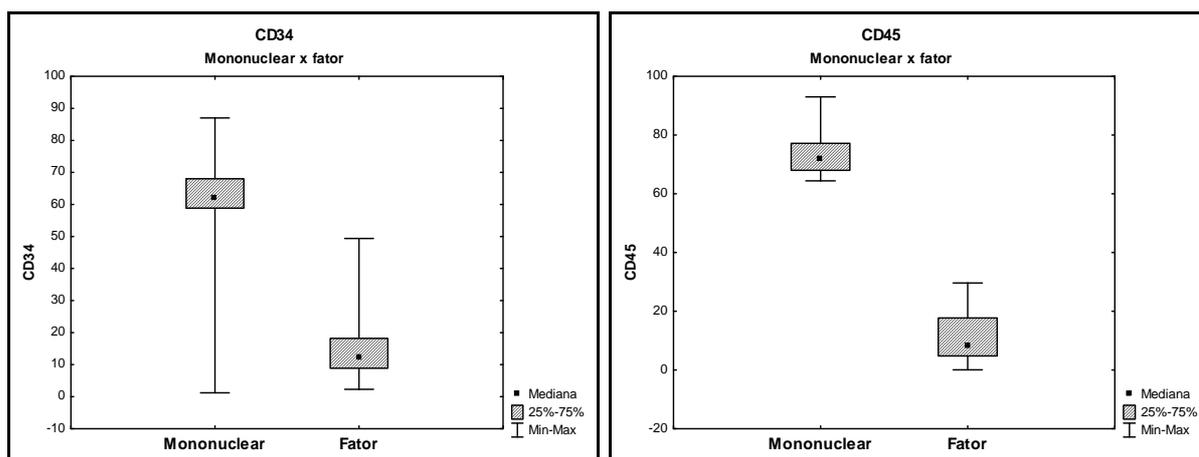
### 5.9.1 Pré-cultivo (grupo mononuclear) x pós-cultivo (grupo fator):

Os marcadores CD34 e CD45 mostraram diferenças para os grupos pré-cultivo (grupo mononuclear) e pós-cultivo (grupo fator), sendo que estes valores não representam diferenças significativas estatisticamente. Podemos verificar uma redução na média destes marcadores do grupo mononuclear para o grupo fator. Isto pode indicar que estas células quando cultivadas na presença dos fatores de crescimento passaram a não expressar mais estes marcadores o que pode ter levado a uma diferenciação. Estes resultados estão representados na tabela 6 e na figura 17.

**Tabela 6:** Comparativo das porcentagens dos marcadores para os grupos pré-cultivo (grupo mononuclear) e pós-cultivo (grupo fator).

Marcador	Grupo	n	Média (%)	Mediana (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)	Desvio padrão (%)	Valor de p*
CD14	Mononuclear	8	0,46	0,40	0,15	0,82	0,25	0,401
	Fator	8	0,80	0,14	0,00	5,05	1,73	
CD34	Mononuclear	11	57,44	61,98	1,23	87,04	22,54	<b>0,006</b>
	Fator	11	15,68	12,40	2,32	49,39	13,28	
CD45	Mononuclear	11	73,82	71,80	64,40	93,02	8,61	<b>0,003</b>
	Fator	11	10,86	8,08	0,03	29,60	9,27	
CD90	Mononuclear	11	1,10	1,15	0,59	1,71	0,35	0,722
	Fator	11	1,64	0,86	0,00	5,95	2,15	
CD31	Mononuclear	9	0,07	0,03	0,00	0,32	0,10	0,767
	Fator	9	0,09	0,01	0,00	0,58	0,19	
CD144	Mononuclear	8	0,69	0,42	0,00	2,88	0,91	0,779
	Fator	8	1,18	0,05	0,00	5,19	2,03	
Viabilidade	Mononuclear	9	95,56	96,41	91,18	99,17	3,15	<b>0,008</b>
	Fator	9	98,89	99,89	92,28	100,00	2,52	

\* Teste não-paramétrico de Wilcoxon,  $p < 0,05$



**Figura 17:** Gráfico comparativo da porcentagem de células positivas para o marcador CD34 e CD45 utilizado em amostras de MO de ratos Wistar pré-cultivo (grupo mononuclear) e pós-cultivo (grupo fator).

#### 5.9.2 Pré-cultivo (grupo mononuclear) x pós-cultivo (grupo controle):

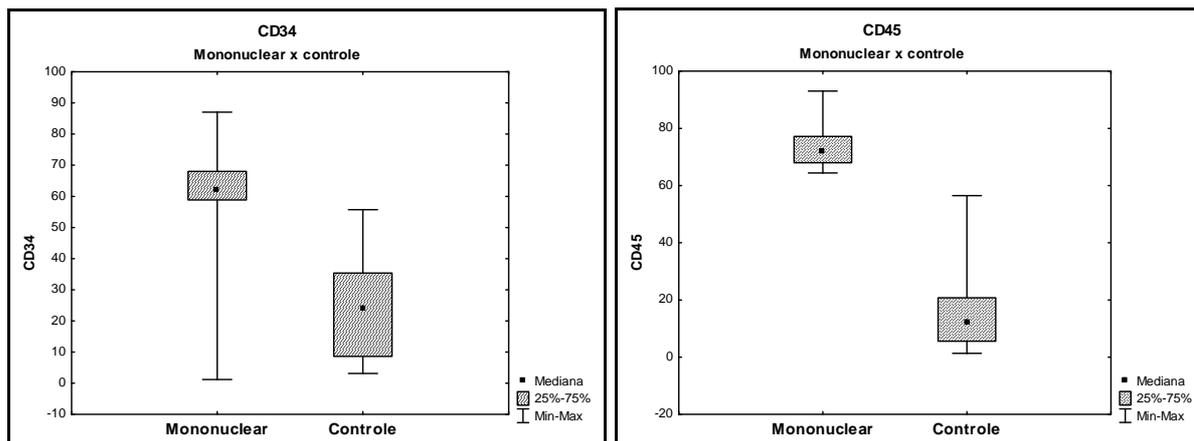
Os marcadores CD34 e CD45 mostraram diferenças para os grupos pré-cultivo (grupo mononuclear) e pós-cultivo (grupo controle), sendo que estes valores representam diferenças significativas estatisticamente. Podemos verificar uma redução na média destes marcadores do grupo mononuclear para o grupo controle. Isto pode indicar que estas células quando cultivadas independente da presença dos fatores de crescimento passaram a não expressar mais estes marcadores o que representa uma diferenciação, pois as células deixaram de ser progenitoras. Estes resultados estão representados na tabela 7 e na figura 18.

**Tabela 7:** Comparativo das porcentagens dos marcadores para os grupos pré-cultivo (grupo mononuclear) e pós-cultivo (grupo controle).

Marcador	Grupo	n	Média (%)	Mediana (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)	Desvio padrão (%)	Valor de p*
CD14	Mononuclear	7	0,54	0,40	0,15	1,16	0,37	0,612
	Controle	7	2,05	0,46	0,00	12,15	4,46	
CD34	Mononuclear	9	52,42	59,40	1,23	68,00	21,61	<b>0,028</b>
	Controle	9	25,44	23,90	3,16	55,70	19,62	
CD45	Mononuclear	9	70,49	68,90	64,40	77,19	4,43	<b>0,008</b>
	Controle	9	16,96	11,90	1,31	56,50	16,67	
CD90	Mononuclear	9	1,08	1,15	0,59	1,71	0,32	<b>0,066</b>
	Controle	9	5,31	2,65	0,08	15,44	5,76	
CD31	Mononuclear	7	0,05	0,03	0,00	0,12	0,05	0,499

	Controle	7	0,10	0,01	0,00	0,28	0,13	
CD144	Mononuclear	8	0,69	0,42	0,00	2,88	0,91	0,674
	Controle	8	0,84	0,09	0,00	4,58	1,60	
Viabilidade	Mononuclear	7	97,49	98,05	94,41	99,17	1,67	0,091
	Controle	7	99,17	99,79	96,81	99,97	1,20	

\* Teste não-paramétrico de Wilcoxon,  $p < 0,05$



**Figura 18:** Gráfico comparativo da porcentagem de células positivas para o marcador CD34 e CD45 utilizado em amostras de MO de ratos Wistar pré-cultivo (grupo mononuclear) e pós-cultivo (grupo controle).

### 5.9.3 Pós-cultivo (grupo fator) x pós-cultivo (grupo controle):

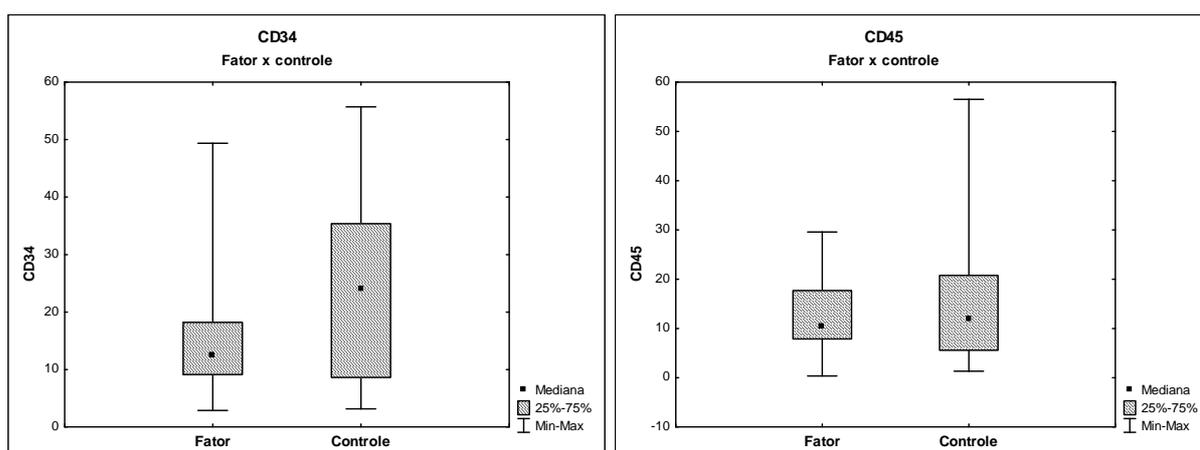
Os marcadores CD34 e CD45 mostraram diferenças para os grupos pós-cultivo (grupo fator) e pós-cultivo (grupo controle), sendo que estes valores não representam diferenças significativas estatisticamente. Podemos verificar um discreto aumento na média destes marcadores do grupo fator para o grupo controle. Isto pode indicar que as células cultivadas na presença dos fatores de crescimento são menos progenitoras que as células cultivadas apenas com o meio de trabalho. Porém o marcador CD90 apresentou um resultado próximo a significância estatística o que nos leva a pensar que as células continuam comprometidas com a linhagem hematopoiética. Estes resultados estão representados na tabela 8 e na figura 19.

**Tabela 8:** Comparativo das porcentagens dos marcadores para os grupos pós-cultivo (grupo fator) e pós-cultivo (grupo controle).

Marcador	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio	Valor de
----------	-------	---	-------	---------	--------	--------	--------	----------

			(%)	(%)	(%)	(%)	padrão (%)	p*
CD14	Fator	6	0,21	0,14	0,00	0,65	0,25	0,345
	Controle	6	0,37	0,35	0,00	0,89	0,34	
CD34	Fator	9	17,02	12,40	2,88	49,39	14,00	0,139
	Controle	9	25,44	23,90	3,16	55,70	19,62	
CD45	Fator	9	12,70	10,38	0,36	29,60	9,22	0,441
	Controle	9	16,96	11,90	1,31	56,50	16,67	
CD90	Fator	9	1,85	0,95	0,00	5,95	2,35	<b>0,066</b>
	Controle	9	5,31	2,65	0,08	15,44	5,76	
CD31	Fator	6	0,02	0,01	0,00	0,10	0,04	0,463
	Controle	6	0,09	0,01	0,00	0,28	0,13	
CD144	Fator	9	1,11	0,05	0,00	5,19	1,91	1,000
	Controle	9	0,80	0,11	0,00	4,58	1,50	
Viabilidade	Fator	6	99,86	99,93	99,59	99,98	0,15	0,249
	Controle	6	99,56	99,80	98,26	99,97	0,65	

\* Teste não-paramétrico de Wilcoxon,  $p < 0,05$



**Figura 19:** Gráfico comparativo da porcentagem de células positivas para o marcador CD34 e CD45 utilizado em amostras de MO de ratos Wistar pós-cultivo (grupo fator) e pós-cultivo (grupo controle).

## 6 DISCUSSÃO

O cultivo e expansão de células precursoras endoteliais para transplante podem ser usados com sucesso para promover a neovascularização de tecidos isquêmicos (KALKA, 2000b). As limitações das estratégias correntes para induzir a angiogênese no miocárdio enfartado ou isquêmico que não pode ser revascularizado por métodos tradicionais levam a exploração do transplante de células para estimular a neovascularização (KIM, 2001). Seguindo esta linha de pesquisa propõe-se a seleção das CPE para serem transplantadas, especulando que estas células participem na criação da estrutura vascular necessária para a neovascularização. Estas células também podem secretar uma variedade de fatores de crescimento que podem estimular a profusão da rede capilar (IWAMI, 2004).

Inicialmente, a proposta deste estudo foi dar base para o transplante celular padronizando o isolamento das CPE (CD133<sup>+</sup>) de ratos Wistar, cultivando e expandindo-as para que aumentassem em número. Desta forma teríamos um modelo fechado usando células provenientes de ratos e sendo transplantadas em ratos. Assim seria possível eliminar a interferência de uma resposta inespecífica ou até mesmo uma possível rejeição no transplante, uma vez que na maioria dos ensaios pré-clínicos já existentes usa-se células humanas transplantadas em ratos.

Independentemente da fonte, CPE são difíceis de isolar porque representam uma população muito pequena, quando comparadas às células hematopoéticas. No sangue periférico, apenas 0,01% das CM são CPE (GROSS, 2004). Na MO, menos que 0,05% das células são CPE (EGGERMANN, 2003).

O número exato de células necessário para induzir a neovascularização com sucesso ainda é uma incógnita (ZAMMARETTI, 2005). A possibilidade de obter um número maior de células poderá abrir a perspectiva de que novos testes sejam realizados, para definir o número de células mais adequado para esse tipo de terapia.

As coletas da MO de ratos Wistar foram realizadas seguidas do isolamento das CM. No processo de purificação, para a obtenção das CPE, foi utilizado um anticorpo monoclonal anti CD133 humano. Esta utilização se deu em razão de não existir comercialmente, até o momento, um anticorpo CD133 de rato. O fato que deu suporte a esta escolha foi que análises filogenéticas estabeleceram claramente que o marcador celular CD133, também chamado de prominina, de humanos e roedores constitui um grupo de genes ortólogos (genes homólogos, em espécies diferentes) (FARGEAS, 2003).

Os valores percentuais para esta purificação foram nas amostras celulares Pré-P de 0,72% para o marcador CD133, 4,84% para o marcador CD14 e 96,20% para o marcador CD45; e nas amostras Pós-P de 2,81% para o marcador CD133, 2,39% para o marcador CD14 e 92,88% para o marcador CD45.

A diferença entre os valores percentuais obtidos para os demais marcadores não demonstrou haver significância estatística entre as amostras Pré-P e Pós-P. Nas amostras celulares Pré-P obteve-se 0,42% para o marcador CD34, 4,84% para CD14, 2,02% para CD105 e 2,25% para CD31. Em amostras Pós-P obteve-se 0,94% para o marcador CD34, 2,39% para CD14, 4,76% para CD105 e 5,11% para CD31. A partir desses resultados pudemos caracterizar o fenótipo celular obtido das amostras provenientes da MO de ratos Wistar Pós-P como majoritariamente da linhagem hematopoiética tanto na amostras Pré-P quanto Pós-P.

Estes resultados mostraram que o número de CPE (CD133<sup>+</sup>) foi baixo frente às células da linhagem hematopoiética (CD45<sup>+</sup>). Por esta razão tentou-se fazer então o isolamento por seleção negativa, ou seja, descartar as células CD45<sup>+</sup> e CD14<sup>+</sup> e deixar no sobrenadante as CPE. Porém após este processo de isolamento das CPE verificamos que o número dessas células continuou extremamente baixo e o número de células CD45<sup>+</sup> ficou praticamente inalterado na população purificada. Isso permitiu concluir que o anticorpo utilizado não foi capaz de isolar as células CD133<sup>+</sup> da MO de ratos Wistar.

Na seleção negativa foi possível fazer o isolamento das células, porém novamente pelo motivo da população de células CD45<sup>+</sup> ser predominante frente ao número de células CD133<sup>+</sup> da população em questão, a purificação por essa metodologia também não se mostrou efetiva.

Diante da falta de sucesso na purificação de células CD133<sup>+</sup> da MO de ratos Wistar propôs-se, cultivar as CM isoladas, sem a purificação prévia, e utilizar fatores de crescimento específicos (b-FGF, IGF-I e VEGF) para expandir e diferenciar as células progenitoras existentes no grupo das CM em células semelhantes às CE adultas.

Na presença dos estímulos corretos, as CPE podem diferenciar-se em CE adultas. Por esse motivo, foi de importância fundamental utilizar fatores de crescimento, para estimular a diferenciação das células mononucleares exclusivamente na linhagem endotelial. Escolheu-se o VEGF por ser um fator de crescimento e sobrevivência (TERRANOVA, 1985), que pode estar envolvido nos

primeiros passos para diferenciar o hemoangioblasto e por estar correlacionado com o rápido crescimento do endotélio (FLAME, 1995). O VEGF pode ser importante na produção de estímulos relacionados à neovascularização. É possível que algumas citocinas sirvam como fatores parácrinos em culturas de alta densidade. O VEGF é considerado um importante mitógeno para as CE (MILLAUER, 1993).

O FGF influencia no crescimento e diferenciação celular tanto *in vivo* como *in vitro* e é um regulador da proliferação e migração das CE. Na ausência do b-FGF, as células entram em apoptose (HARTNETT, 1999). O fator IGF-I foi escolhido, por ser um mitógeno que controla a proliferação e diferenciação celular, fato que poderia auxiliar na expansão dessas células (ZUMSTEIN, 1987).

Após o cultivo com os fatores de crescimento, o número de células que diferenciaram-se em células com marcadores de superfície característicos de CE não foi estatisticamente significativo, porém, foi maior nas células cultivadas no grupo com fatores do que no grupo controle. Este dado não pode ser comprovado estatisticamente, mas pode indicar que os fatores de crescimento influenciaram na diferenciação.

As células tiveram seu fenótipo caracterizado por citometria de fluxo. Em torno do 31º dia de cultivo, quando as células alcançaram a confluência mínima de 80%, as células cultivadas com os fatores de crescimento apresentaram-se semelhantes ao fenótipo típico de CE, tendo aumentada a positividade para marcadores característicos destas células, como o CD144. Notou-se um decréscimo das células CD34+, porém algumas ainda continuaram presentes, em concordância com estudos de Gross e Herbrig (2004).

O estudo de Ladhoff e colaboradores (2010) demonstrou que a purificação das células através de micropérolas magnéticas e a utilização de fatores de crescimento durante o cultivo celular foi possível e influenciou a diferenciação destas células, porém verificamos algumas diferenças entre este estudo e o nosso, como por exemplo: a espécie animal para obtenção das células foi diferente (ratos machos das espécies Wistar-Kyoto e Wistar-Furth); as células utilizadas foram isoladas da aorta dos ratos; a purificação das células isoladas foi realizada pela seleção negativa do CD45 e estas foram mantidas em cultivo com fatores de crescimento, após 15-22 dias de cultivo, foi realizado a tripsinização das células e estas foram novamente selecionadas magneticamente para o CD31 e assim foram mantidas em cultivo até a 25ª passagem.

A presença do fvW é conhecida por ser um marcador importante para a identificação das CE (JAFFE, 1973 e 1974). Em nosso estudo a marcação para o fvW apresentou reações inespecíficas e não foi possível evidenciar sua presença nas células estudadas. Este fato pode ser corroborado pelas evidências apresentadas no estudo de Reidy e colaboradores, em 1989, que demonstrou que o fvW não foi detectável por coloração da membrana basal, quando o anticorpo humano foi adicionado à superfície luminal dos vasos dos ratos. Este resultado negativo pode refletir a incapacidade do anticorpo de penetrar através do endotélio para a matriz. Neste estudo foi possível observar uma ligeira mancha localizada na face apical da membrana basal, sem aumentar a coloração evidente na matriz do endotélio recém-regenerada. Esta constatação implica que muito pouco fvW está presente no endotélio das células nativas da matriz. Outro aspecto interessante do estudo foi a localização subcelular do fvW dentro de CE. O armazenamento deste fator seria feito pelos corpos de Weibel-Palade. Os resultados mostraram, no entanto, a julgar pela imunocitoquímica, que o fvW do rato esteve presente no retículo endoplasmático. Existem várias explicações possíveis para este fato. Uma delas é que as CE de rato não armazenam proteínas do fvW e assim o fator é secretado diretamente sem armazenamento. Apóia-se esta proposta no estudo de Lynch e colaboradores, em 1983, que descobriram que as CE de bovinos podem secretar o fvW sem qualquer acumulação líquida significativa intracelular de produto precursor. Outra possibilidade é de que em protocolo experimental utilizado em estudos *in vivo* que causam uma lesão grave no endotélio e posterior reparação provocam a liberação do fator pelos corpos de Weibel-Palade no rato e assim não seria possível detectar por imunocitoquímica.

Já o estudo de Kelly e colaboradores, em 2005, utilizou o mesmo anticorpo humano e a mesma concentração de nosso estudo, porém a incubação do mesmo foi realizada *overnight*, e assim a marcação foi evidenciada. Isto sugere que em nosso estudo talvez o tempo de incubação devesse ser alterado. Uma outra diferença foi notada com relação ao animal utilizado no estudo, em Kelly e colaboradores foram utilizados ratos da espécie Sprague-Dawley e no nosso estudo utilizamos ratos Wistar. Isto pode ser importante visto que no estudo de Reidy e colaboradores, em 1989, outra possibilidade para a não detecção do fvW é que a manifestação do número de corpos de Weibel-Palade é variada entre espécies e até

na mesma espécie. Assim, no rato, os corpos de Weibel-Palade podem não ser um local de armazenamento particularmente importante para o fvW.

Outra avaliação de nosso estudo foi a realização de ensaios de formação de túbulos capilares através de uma membrana basal comercialmente conhecida como matrigel. O matrigel é um preparado de membrana solubilizada de células extraídas do sarcoma de rato chamado de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), este é um tumor rico em proteínas da matriz extracelular. Seu componente principal é laminina, seguido de colágeno IV, proteoglicanos heparan sulfato e entactina / nidogena (KLEINMAN, 1982 e 1986). O matrigel também contém os seguintes fatores: fator de crescimento transformador  $\beta$  (b-TGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) (VUKICECIV, 1992), e outros fatores de crescimento que ocorrem naturalmente no tumor EHS. Esta matriz é eficaz para a fixação e diferenciação de vários tipos celulares, como, células neurais (BIEDERER, 2007) células hepáticas (BI, 2006) e CE (McGUIRE, 1987). Ela é usada como base para vários tipos de testes de invasão celular e fornece o substrato necessário para o estudo da angiogênese, tanto *in vitro* (MAESHIMA, 2001) e *in vivo* (PASSANITI, 1992).

Folkman e colaboradores, em 1980, usaram primeiramente a gelatina como um substrato, o que permitiu o cultivo *in vitro*, para a proliferação e formação de tubo capilar de CE. Desde então, os componentes da matriz tem sido usados com sucesso para modular a proliferação das células do endotélio capilar e promover a organização multicelular, ou seja, a formação de tubo (MADRI, 1986).

As CE quando semeadas em uma matriz de gel, como por exemplo, o matrigel, são capazes de formar estruturas semelhantes a capilares. Tais células oriundas de diversas fontes, como a pele, a veia do cordão umbilical humano, a veia aorta e a artéria carótida, formam vasos comunicantes com uma luz voltada para dentro no prazo de 6 a 12 horas (KLEINMAN, 2005). O uso de CE, com a membrana basal (membrana solubilizada de células extraídas do sarcoma de rato Engelberth-Holm-Swarm) tem sido utilizadas amplamente para o ensaio de formação de tubos, pois estas células conseguem repetir as etapas da angiogênese (BROWING, 2008). O matrigel de forma experimental, abranger todas as etapas do processo angiogênico: adesão, migração, ativação de proteases, alinhamento e formação de tubo. Segundo Arnaoutova e colaboradores, em 2009, existem algumas condições

importantes que podem garantir melhores resultados, como: o número de células é fundamental e o cultivo celular deve apresentar confluência mínima de 80% antes da realização do ensaio.

Neste estudo, os resultados em relação aos ensaios com matrigel, não tiveram sucesso, pois as células não mimetizaram a formação dos túbulos capilares *in vitro* como o esperado, possivelmente devido ao fato do número final de células diferenciadas ter sido pequeno. Lawley e Kubota (1989) e Arnaoutova e colaboradores (2009) sugerem que o número ideal de células por mL deve ser de  $2 \times 10^4$ , número este utilizado em nosso estudo. Considerando os dados obtidos por meio da caracterização celular por citometria de fluxo, apenas 1, % deste número correspondia a células semelhantes as CE o que provavelmente foi insuficiente para a formação dos túbulos.

A viabilidade celular foi verificada e os resultados indicaram que as amostras Pré-P possuem uma viabilidade celular maior que células Pós-P, ficando evidente que quanto maior a manipulação e o processamento das amostras celulares a serem analisadas, menor será a viabilidade celular.

Atualmente o uso de CT tem auxiliado como uma fonte alternativa à regeneração da célula cardíaca, evitando a progressão da insuficiência cardíaca e/ou melhorando a função ventricular em casos graves avançados. Os resultados têm sido promissores e os benefícios dessa nova abordagem deverão ser confirmados por outras pesquisas.

Apesar dos avanços obtidos na TC nas últimas décadas, na área de ciência básica, com relação a esta nova modalidade terapêutica, diversas questões permanecem ainda sem resposta. Pouco ainda se sabe sobre os mecanismos através dos quais a TC possa gerar resultados efetivos. Adicionalmente, a melhor via para o transplante, o número total e a concentração de células permanecem questões importantes, ainda sem definição (CARVALHO, 2009).

Desta forma, futuramente podem ser feitos estudos mais aprofundados com alterações na concentração dos fatores de crescimento, podem ser utilizadas as células selecionadas negativamente para o CD45 para então realizar os cultivos direcionados com os fatores de crescimento como sugere Ladhoof e colaboradores (2010). Ainda segundo estes pesquisadores, podemos variar outros fatores, como por exemplo, utilizar L-glutamina associada ao suplemento de crescimento de células endoteliais ou hidrocortisona associada à fibronectina; podemos também

variar os marcadores para a seleção negativa, como por exemplo utilizar o CD31. Verificamos a possibilidade de realizar o ensaio de formação de túbulos capilares *in vivo* ao invés de *in vitro*. Porém para isso, é preciso a obtenção de dados mais significativos que possam comprovar que o cultivo de CM com fatores específicos para a expansão de CPE pode realmente selecionar estas células e permitir sua proliferação *in vitro*. Este resultado é muito importante para o uso desta técnica em ensaios pré-clínicos.

## **7 CONCLUSÃO**

Com bases nos resultados obtidos nosso estudo chegou às seguintes conclusões:

- Foi possível isolar as células mononucleares obtidas da medula óssea de ratos Wistar. Utilizando fatores de crescimento uma pequena parcela destas células foi diferenciada em células semelhantes às endoteliais.
- As células mononucleares isoladas e as expandidas e diferenciadas da medula óssea de ratos Wistar puderam ser caracterizadas imunofenotipicamente por citometria de fluxo.
- O fator de von Willebrand não foi evidenciado nas células isoladas e nas expandidas e diferenciadas.
- Não houve formação de túbulos capilares *in vitro* nas células isoladas e nas expandidas e diferenciadas.
- Uma pequena porcentagem das células mononucleares diferenciaram-se em células semelhantes às endoteliais sugerindo que existe uma tendência, não significativa estatisticamente, da influência dos fatores de crescimento neste processo.

## **8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. ABDALLAH, BM; KASSEM, M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. **Gene Therapy**. 15, 109-16, 2008.
2. ALVAREZ-DOLADO, M; PARDAL, R; GARCIA-VERDUGO, JM; FIKE, JR; LEE, HO; PFEFFER, K; LOIS, C; MORRISON, SJ; ALVAREZ-BUYLLA. A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. **Nature**. 425, 968-73, 2003.
3. ANGELINI A, CASTELLANI C, VESCOVO G, THIENE G. Pathological evidence of stem cell regeneration in the heart. **Int Journal of Cardiol**. 96, 499-504, 2004.
4. ARNAOUTOVA, I; GEORGE, J; HYNDA K. KLEINMAN, HK; BENTON, G. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. **Angiogenesis**. 12, 267-274, 2009.
5. ASAHARA, T; BAUTERS, C; ZHENG, LP; TAKESHITA, S; BUNTING, S; FERRARA, N; SYMES, JF; ISNER, JM. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis *in vivo*. **Circulation**. 13, 199-204. 1995.
6. ASAHARA, T; MASUDA, H; TAKAHASHI, T; KALKA, C; PASTORE, C; SILVER, M; KEARNE, M; MAGNER, M; ISNER, JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. **Circulation Research**. 85, 221-228, 1999.
7. ASAHARA, T; MUROHARA, T; SULLIVAN, A; SILVER, M; VAN DER ZEE, R; LI, T; WITZENBICHLER, B; SCHATTEMAN, G; ISNER, JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**. 275, 965-967, 1997.
8. ASSMUS, B; SCHÄCHINGER, V; TEUPE, C; BRITTEN, M; LEHMANN, R; DÖBERT, N; GRUNWALD, F; AICHER, A; URBICH, C; MARTIN, H; HOELZER, D; DIMMELER, S; ZEIHNER, AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration

enhancement in acute myocardial infarction (Topcare-AMI). **Circulation**. 106, 3009-17, 2002.

9. BACAL, NS; FAULHABER, MHW. **Aplicação prática em citometria de fluxo**. São Paulo: Atheneu, 2003.

10. BARTUNEK, J; VANDERHEYDEN, M; VANDEKERCKHOVE, B; MANSOUR, S; DE BRUYNE, B; DE BONDT, P; . Intracoronary injection of CD133- positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. **Circulation**. 112, 1178-83, 2005.

11. BELTRAMI, AP; URBANEK, K; KAJSTURA, J; YAN, S-M; FINATO, N; BUSSANI, R; NADAL-GINARD, B; SILVESTRI, F; LERI, A; BELTRAMI, A; ANVERSA, P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. **The New England Journal of Medicine**. 344, 1750-1757, 2001.

12. BENJAMIN, LE; HEMO, I; KESHET, E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. **Development**. 125, 1591-1598, 1998.

13. BI, Y.; KAZOLIAS, D; DUIGNAN, DB. Use of cryopreserved human hepatocytes in sandwich culture to measure hepatobiliary transport, **Drug Metabolism and Disposition**. 34, 1658, 2006.

14. BIEDERER, T; SCHEIFFELE, P. Mixed-culture assays for analyzing neuronal synapse formation. **Nature Protocols**. 2, 670, 2007.

15. BOCCHI, EA; FERREIRA, SMA. Células-tronco no tratamento das doenças cardiovasculares. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**. - Ano XIII nº 04 Jan/Fev/Mar/Abr 2005.

16. BOYUM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. **Scandinavian Journal Clinical and Laboratory Investigation**. 21, 109, 1968.

17. BROFMAN, PR; CARVALHO, KA; GUARITA-SOUZA, LC; REBELATTO, C; HANSEN, P; SENEGAGLIA, AC; MIYAGUE, N; FURUTA, M; FRANCISCO, JC; OLANDOSKI, M. Transplante celular: análise funcional, imunocitoquímica e histopatológica em modelo experimental e miocardiopatia isquêmica utilizando diferentes células. **Revista Brasileira de Circulação Cardiovascular**. 19, 261-266, 2004.
18. BROWNING, AC; DUA, HS; AMOAKU, WM. The effect of growth factors on the proliferation and in vitro angiogenesis of human macular inner choroidal endothelial cells. **British Journal of Ophthalmology**. 92, 1003-1008, 2008.
19. BUSCHMANN, I; SCHAPER, W. Arteriogenesis versus angiogenesis: two mechanisms of vessel growth. **News Physiology Science**. 14, 121-125, 1999.
20. CAI, J; WEISS, ML; RAO, MS. In search of "stemness". **Experimental Hematology**. 32, 585-598, 2004.
21. CARMELIET, P. Mechanism of angiogenesis and arteriogenesis. **Nature Medicine**. 6, 389-395, 2000.
22. CARVALHO, AC; GOLDENBERG, RCS; TUCHE, FAA; DOHMANN, HFR. Bases da terapia celular em cardiologia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 31, 75-81, 2009.
23. CHACHQUES, JC; DUARTE, F; HERREROS, J; PROSPER, F; GIAMBRONI, R; JULIA, P; FOURNIAL, G; CARPENTIER, A; FABIANI, JN. Cellular myogenic and angiogenic therapy for patients with cardiac or limb ischemia. **Basic and Applied Myology**. 13, 29-37, 2003.
24. CHEN, SL; FANG, WW; YE, F; LIU, YH; QIAN, J; SHAN, SJ; ZHANG, JJ; CHUNHUA, RZ; LIAO, LM; LIN, S; SUN, JP. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. **The American Journal of Cardiology**. 94, 92-95, 2004.

25. CHOI, K; KENNEDY, M; KAZAROV, A; PAPADIMITRIOU, JC; KELLER, G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. **Development**. 125, 725-732, 1998.
26. CLIFFORD, JR; POLLAK, M. Circulating IGF-1: New perspectives for a new century. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. 10, 136-41, 1999.
27. CONWAY EM, COLLEN D, CARMELIET P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. **Cardiovasc Res**. 49, 5075-21, 2001.
28. COOPER, DL. Evidence for and mechanisms of exercise modulation of growth: an overview. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. 26, 733-40, 1994.
29. COUFFINHAL, T; SILVER, M; KEARNEY, M; SULLIVEN, A; WITZENBICHLER, B; MAGNER, M; ANNEX, B; PETERS, K; ISNER, JM. Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in ApoE<sup>-/-</sup> mice. **Circulation**. 99, 3188-3198, 1999.
30. DATASUS – **Taxa de Mortalidade Específica por Doenças do Aparelho Circulatório**. Período de 2006. Disponível em <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2008/c08.def>>. Acessado 17 mar 2010.
31. DeVRIES, C; ESCOBEDO, JA; UENO, H; HOUCK, K; FERRARA N; WILLIAMS, LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. **Science**. 255, 989-991, 1992.
32. DVORAK HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumour angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. **J Clin Oncol**. 20, 4368-4680, 2002.

33. DVORAK, HF; DETMAR, M; CLAFFEY, KP; NAGY, JA; Van de WATER, L; SENGER, DR. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignants and inflammation. **Internacional Archives of Allergy and Immunology**. 107, 233-235, 1995.
34. EGGERMANN J, KLICHE S, JARMY G, HOFFMANN K, MAYR-BEYRLE U, DEBATIN KM, et al. Endothelial progenitor cell culture and differentiation *in vitro*: a methodological comparison using human umbilical cord blood. **Cardiov Res**. 58, 478-486, 2003.
35. EGGERMANN, J; KLICHE, S; JARMY, G; HOFFMANN, K; MAYR-BEYRLE, U; DEBATIN, KM; WALTENBERGER, J; BELTINGER, C. Endothelial progenitor cell culture and differentiation *in vitro*: a methodological comparison using human umbilical cord blood. **Cardiovascular Research**. 58, 478-786, 2003.
36. EPSTEIN, SE; FUCHS, S; ZHOU, YF; BAFFOUR, R; KORNOWSKI, R. Therapeutic interventions for enhancing collateral development by administration of growth factors: basic principles, early results and potential hazards. **Cardiovascular Research**. 49, 532-542, 2001.
37. ERBS, S; LINKE, A; ADAMS, V; LENK, K; THIELE, H; DIEDERICH, KW; et al. Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study. **Circulation Research**. 97, 756-62, 2005.
38. ESCH, F; BAIRD, A; LING, N; UENO, N; HILL, F; DENOROY, L; KLEPPER, R; GOSPODAROWICZ, D; BOHLEN, P; GUILLEMIN, R. Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. **Proccedings of the National Academy of Sciences**. 82, 6507-6511, 1985.
39. ETZION, S; BATTLER, A; BARBASH, IM; CAGNANO, E; ZARIN, P; GRANOT, Y; KEDES, LH; KLONER, RA; LEOR, J. Influence of embryonic cardiomyocyte transplantation on the progression of heart failure in a rat model of

extensive myocardial infarction. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. 33, 1321-1330, 2001.

40. FARGEAS, CA; CORBEIL, D; HUTTNER, WB. AC133 antigen, CD133, prominin-1, prominin-2, etc.: prominin family gene products in need of rational nomenclature. **Stem Cells**. 21, 506-508, 2003.

41. FERNANDES, MR; SILVA, GV. Terapia Celular no Tratamento da Insuficiência Cardíaca Isquêmica. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**. 15, 277-284, 2007.

42. FERRARA N, GERBER HP, LECOUTER J. The biology of VEGF and its receptor. **Nat Med**. 9, 669-679, 2003.

43. FERRARA N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. **Nat Rev Cancer**. 2, 795-803, 2002.

44. FLAME, I; BREIR, I; RISAU, W. Vascular endothelial growth factor (VEGF) end VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. **Development Biology**. 69, 699-712, 1995.

45. FOLKMAN, J; BREM, H. **Angiogenesis and inflammation**. In: Inflammation basic principles and clinical correlates. 2th, New York: Raven Press, 821-839, 1992.

46. FOLKMAN, J; HAUDENSCHILD, C. Angiogenesis in vitro. **Nature**. 32, 55-61, 1980.

47. FOLKMANN, J. Tumor angiogenesis. **Adv Cancer Res**. 43, 175-203, 1985.

48. FUCHS, S; HERMANN, MI; KIRKPATRICK, CJ. Retention of a differentiated endothelial phenotype by outgrowth endothelial cells isolated from human peripheral blood and expanded in long-term cultures. **Cell and Tissue Research**. 326, 79-92, 2006.

49. FUKUDA, K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. **Artificial Organs.** 25, 187-193, 2001.
50. GEHLING, UM; ERGÜN, S; SCHUMACHER, U; WAGENER, C; PANTEL, K; OTTE, M; SCHUCH, G; SCHAFHAUSEN, P; MENDE, T; KILIC, N; KLUGE, K; SCHÄFER, B; HOSSFELD, DK; FILDER, W. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. **Blood.** 95, 3106-3112, 2000.
51. GNECCHI, M; HE, H; LIANG, OD; MELO, LG; MORELLO, F; MU, H; ET AL. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. **Nature Medicine.** 11, 367-8, 2005.
52. GOMES, JR; CAETANO, FH; HERMINI, HA; ROGATTO, GP; LUCIANO, E. Efeitos do treinamento físico sobre o hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) em ratos diabéticos. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento.** 11, 57-62, 2003.
53. GROSS P, HERBRIG K. Role of endothelial progenitor cells in cardiovascular pathology. **Rocz Akad Med Bialymst.** 49, 174-177, 2004.
54. GROUNDS, MD; WHITE, JD; ROSENTHAL, N; BOGOYEVITCH, MA. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry.** 50, 589-610, 2002.
55. HARTNETT, MA; GARCIA, C; D'AMORE, P. Release of b-FGF in endothelial cell survival factor, by osmotic shock. **Investigative Ophthalmology & Visual Science.** 40, 2945-2951, 1999.
56. HASSINK, RJ; RIVIÈRE, AB; MUMMERY, CL; DOEVENDANS, PA. Transplantation of cells for cardiac repair. **Journal of the American College of Cardiology.** 41, 711-717, 2003.

57. HICKLIN DJ, ELLIS LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **J Clin Oncol.** 23, 1011-1027, 2005.
58. HOEBEN, A; LANDUYT, B; HIGHLEY, MS; WILDIERS, H; VAN OOSTEROM, AT; DE BRUIJN, EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. **Pharmacological Reviews.** 56, 549-80, 2004.
59. HUSTEN, L. Global epidemic of cardio-vascular diseases predicted. **The Lancet.** 352, 1530-1542, 1998.
60. INGRAM, DA; MEAD, LE; TANAKA, H; MEADE, V; FENOGLIO, A; MORTELL, K; POLLOK, K; FERKOWCZ, M; GILLEY, D; YODER, MC. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells utilizing human peripheral and umbilical cord blood. **Blood.** 104, 2752-2760, 2004.
61. IWAMI, Y; MASUDA, H; ASAHARA, T. Endothelial Progenitor Cells: past, stantes of the art and future. **Journal of Cellular and Molecular Medicine.** 8, 488-497, 2004.
62. JACOB, JLB; SALLIS, FV; GRECO, OT; ET AL. Transplante de células-tronco marcadas para o miocárdio de paciente com doença de Chagas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia.** 89, 10-11, 2007.
63. JAFFE, EA; HOYER, LW; NACHMAN, RL. Synthesis of antihemophilic factor by cultured human endothelial cells. **The Journal of Clinical Investigation.** 52, 2757-2764, 1973.
64. JAFFE, EA; HOYER, LW; NACHMAN, RL. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. **Proccedings of the National Academy of Sciences.** 71, 1906-1909, 1974.
65. JAIN, RK. Molecular regulation of vessel maturation. **Nature Medicine.** 9, 685-693, 2003.

66. JANEWAY, C. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. Rio Grande do Sul: Artmed, 2005.
67. JIANG, Y; JAHAGIRDAR, BN; REINHARDT, RL; SCHWARTZ, RE; KEENE, CD; ORTIZ-GONZALEZ, XR. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**. 418, 41-9, 2002.
68. JONES, N.; ILJIN, K.; DUMONT, D.; ALITALO, K. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. **Nature**. 2, 257-267, 2001.
69. KALKA, C; MASUDA, H; TAKAHASHI, T; KALKA-MOLL, WM; et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 97, 3422-3427, 2000.
70. KATRITSIS, D; SOTIROPOULOU, P; KARVOUNI, E; KARABINOS, I; KOROVELIS, S; PEREZ, S; ET AL. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. **Catheterization and Cardiovascular Interventions**. 65, 321-329, 2005.
71. KAWADA, H; FUJITA, J; KINJO, K; MATSUZAKI, Y; TSUMA, M; MIYATAKE, H. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. **Blood**. 104, 3581-7, 2004.
72. KAWAMOTO, A; TKEBUCHAVA, T; YAMAGUCHI, J; NISHIMURA, H; YOON, YS; MILLIKEN, C. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. **Circulation**. 107, 461-8, 2003.
73. KELLY, DJ; ZHANG, Y; GOW, RM; ITESCU, S; GILBERT, RE. Cells expressing the stem cell factor receptor, c-kit, contribute to neoangiogenesis in diabetes. **Diabetes and Vascular Disease Research**. 2, 76, 2005.

74. KERBEL RS. Tumor Angiogenesis. **N Engl J Med.** 358, 2039-2049, 2008.
75. KIM, EJ; LI, RK; WEISEL, RD; MICKLE, DAG; JIA, ZQ; TOMITA, S; SAKAI, T; YAU, TM. Angiogenesis by endothelial cell transplantation. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.** 122, 963-971, 2001.
76. KIM, I; YILMAZ, OH; MORRISON, S. CD144 (VE-cadherin) is transiently expressed by fetal liver hematopoietic stem cells. **Blood.** 106, 903-905, 2005.
77. KLEINMAN, HK. Basement membrane complexes with biological activity. **Biochemistry.** 25, 312, 1986.
78. KLEINMAN, HK. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. **Biochemistry.** 21, 6188, 1982.
79. KLEINMAN, HK; MARTIN, GR. Matrigel: basement membrane extracellular matrix with biological activity. **Seminars in Cancer Biology.** 15, 378-386, 2005.
80. KOCHER, AA; SCHUSTER, MD; SZABOLCS, MJ; TAKUMA, S; BURKHOF, D; WANG, J; HOMMA, S; EDWARDS, NM; ITESCU, S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. **Nature Medicine.** 7, 430-436, 2001.
81. KRAUSE, DS; THEISE, ND; COLLECTOR, MI; HENEGARIU, O; HWANG, S; GARDNER, R; NEUTZEL, S; SHARKIS, SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. **Cell.** 105, 369-377, 2001.
82. LADHOFF, J. FLEISCHER, B. HARA, Y. VOLK, HD. SEIFERT, M. Immune privilege of endothelial cells differentiated from endothelial progenitor cells. **Cardiovascular Research.** 2010.

83. LAHAM, RJ; CHRONOS, NA; PIKE, M; LEIMBACH, ME; UDELSON, JE; PEARLMAN, JD; PETTIGREW, RI; WHITEHOUSE, MJ; YOSHIZAWA, C; SIMONS, M. Intracoronary basic fibroblast growth factor (FGF-2) in patients with severe ischemic heart disease: results of a phase I open-label dose escalation study. **Journal of the American College of Cardiology**. 36, 2132-2139, 2000.
84. LAHAM, RJ; SIMONS, M; SELKE, F. Gene transfer for angiogenesis in coronary disease. **Annual Review of Medicine**. 52, 485-502, 2001.
85. LAWLEY, TJ; KUBOTA, Y. Induction to morphologic differentiation of endothelial cells in culture. **Journal of Investigative Dermatology**. 93, 59S-61S, 1989.
86. LEMISCHKA, IR. Stem cell biology: a view toward the future. **Annals of New York Academy of Science**. 1044, 132-138, 2005.
87. LEUNG, DW; CACHIANES, G; KUANG, WJ; GOEDEL, DV; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science**. 246, 1601-1603, 1989.
88. LI, TS; HAMANO, K; HIRATA, K; KOBAYASHI, T; NISHIDA, M. The safety and feasibility of the local implantation of autologous bone marrow cells for ischemic heart disease. **Journal of Cardiovascular Surgery**. 18, S69-S75, 2003.
89. LIEKENS, S; DE CLERCQ, E; NEYTS, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochemical Pharmacology**. 61, 253-270, 2001.
90. LINKE, A; MÜLLER, P; NURZYNSKA, D; CASARSA, C; TORELLA, D; NASCIMBENE, A. Stem cells in the dog heart are selfrenewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 25, 8966-8971, 2005.

91. LOPES, AAB; MAEDA, NY; BYDLOWSKI, SP. Fator von Willebrand e Disfunção Endotelial Pulmonar. Implicações Prognósticas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 70, 141-145, 1998.
92. LYNCH, DC; WILLIAMS, R; ZIMMERMAN, T; KIRBY, E; LIVINGSTON, DM. Biosynthesis of the subunits of factor VIIIIR by bovine aortic endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 80, 2738-2742, 1983.
93. MADRI, JA; PRATT, BM. Endothelial Cell-Matrix Interactions: In Vitro Models of Angiogenesis. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. 34, 85-91, 1986.
94. MAESHIMA, Y; MANFREDI, M; REIMER, C; HOLTHAUS, A; HOPFER, H; CHANDAMURI, BR; KHARBANDA, S; KALLURI, R. Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived Tumstatin. **The Journal of Biological Chemistry**. 276, 15240-15248, 2001.
95. MASON, IJ. The ins and outs of fibroblast growth factors. **Cell**. 78, 547-552, 1994.
96. MCGUIRE, PG; ORKIN, RW. A simple procedure to culture and passage endothelial cells from large vessels of small animals. **Biotechniques**. 5, 456, 1987.
97. MENASCHÉ, P. Cell transplantation in myocardium. **The Annals of Thoracic Surgery**. 75, S20-S28, 2003.
98. MEYER, GP; WOLLERT, KC; LOTZ, J; LIPPOLT, P; FICHTNER, S; RINGES-LICHTENBERG, S; GANSER, A; HERTENSTEIN, B; DREXLER, H. Bone Marrow Transfer to Enhance ST-Elevation Infarct Regeneration: Long-term Magnetic Resonance Imaging Follow-up Data from The BOOST-Trial. **Circulation**. III-239, 2004.
99. MILLAUER, B.; WIZIGMANN-VOOS, S.; SCHNURCH, H.; MARTINEZ, R.; MOLLER, N. P. H.; RISAU, W.; ULLRICH, A. High affinity VEGF binding and

developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. **Cell**. 72, 835, 1993.

100. MIRAGLIA, S; GODFREY, W; YIN, AH; ATKINS, K; WARNK, R; HOLDEN, JT; BRAY, R; WALLER, EK; BUCK, DW. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. **Blood**. 90, 5013-5021, 1997.

101. MULLER-EHMSSEN, J; PETERSON, KL; KEDES, L. Rebuilding a damaged heart: long-term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function. **Circulation**. 105, 1720-1726, 2002.

102. MURASAWA, S; ASAHARA, T. Endothelial Progenitor Cells for Vasculogenesis. **Physiology**. 20, 36-42, 2005.

103. MUROHARA, T. Angiogenesis and vasculogenesis for therapeutic neovascularization. **Nagoya J. Med. Sci**. 66, 1-7, 2003.

104. MURRY, CE; FIELD, LJ; MENASCHÉ, P. Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. **Circulation**. 112, 3174-3183, 2005.

105. ORLIC, D; KAJSTURA, J; CHIMENTI, S; BODINE, DM; LERI, A; ANVERSA, P. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. **Pediatric Transplantation**. 7, 86-88, 2003.

106. ORLIC, D; KAJSTURA, J; CHIMENTI, S; JAKONIUK, I; ANDERSON, SM; LI, B; PICKEL, J; MCKAY, R; NADAL-GINARD, B; BODINE, DM; LERI, A; ANVERSA, P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**. 410, 701-705, 2001.

107. ORLIC, D; KAJSTURA, J; CHIMENTI, S; LIMANA, F; JAKONIUK, I; QUAINI, F; NADAL-GINARD, B; BODINE, DM; LERI, A; ANVERSA, P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 98, 10344-10349, 2001.

108. PASSANITI, A; TAYLOR, RM; PILI, R; GUO, Y; LONG, PV; HANEY, JA; PAULY, RR; GRANT, DS; MARTIN, GR. A simple quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. **Laboratory Investigation**. 67, 519-528, 1992.
109. PEICHEV, M; NAIYER, AJ; PEREIRA, D; ZHU, Z; LANE, WJ; WILLIAMS, M; OZ, MC; HICKLIN, D; WITTE, L; MOORE, MAS; PAFII, S. Expression of VGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. **Blood**. 95, 952-958, 2000.
110. PEPPER MS, MONTESANO R, MANDRIOTA SJ, ORCI L, VASSALLI, JD. Angiogenesis: a paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. **Enzyme Protein**. 49, 138-62, 1996.
111. PEREIRA, LV. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**. 13, 7-14, 2008.
112. PERES, CM; CURY, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2005.
113. POURGHOLAMI MH, MORRIS DL. Inhibitors of vascular endothelial growth factor in cancer. **Cardiovasc Hematol Agents Med Chem**. 6, 343-347, 2008.
114. PRATA, KL. **Efeito da quimioterapia em altas doses sobre as células-tronco mesenquimais humanas**. Ribeirão Preto. Dissertação – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP, 2006.
115. PROW. **Protein Reviews on the Web**. 1999a Disponível em: <[http://prow.nci.nih.gov/guide/2131935697\\_g.htm](http://prow.nci.nih.gov/guide/2131935697_g.htm)>. Acessado 17 mar 2010.
116. PROW. **Protein Reviews on the Web**. 1999b. Disponível em: <[http://prow.nci.nih.gov/guide/968267813\\_g.htm](http://prow.nci.nih.gov/guide/968267813_g.htm)>. Acessado 17 mar 2010.

117. PROW. **Protein Reviews on the Web**. 1999c. Disponível em: <[http://prow.nci.nih.gov/guide/1381917985\\_g.htm](http://prow.nci.nih.gov/guide/1381917985_g.htm)>. Acessado 17 mar 2010.
118. PROW. **Protein Reviews on the Web**. 1999d. Disponível em: <[http://prow.nci.nih.gov/guide/948384634\\_g.htm](http://prow.nci.nih.gov/guide/948384634_g.htm)>. Acessado 17 mar 2010.
119. PROW. **Protein Reviews on the Web**. 1999e. Disponível em: <[http://prow.nci.nih.gov/guide/940930521\\_g.htm](http://prow.nci.nih.gov/guide/940930521_g.htm)>. Acessado 17 mar 2010.
120. PROW. **Protein Reviews on the Web**. 1999f. Disponível em: <[http://prow.nci.nih.gov/guide/96035796\\_g.htm](http://prow.nci.nih.gov/guide/96035796_g.htm)>. Acessado 17 mar 2010.
121. PROW. **Protein Reviews on the Web**. 2001. Disponível em: <[http://prow.nci.nih.gov/guide/438375806\\_g.htm](http://prow.nci.nih.gov/guide/438375806_g.htm)>. Acessado 17 mar 2010.
122. QI RU WANG, BAO HE WANG, YAN HONG HUANG, GUO DAI, WEI MING LI, QI YAN, Purification and Growth of Endothelial Progenitor Cells From Murine Bone Marrow Mononuclear Cells. **Journal of Cellular Biochemistry** 103, 21-29, 2008.
123. QU-PETERSEN, Z; DEASY, B; JANKOWSKI, R; IKEZAWA, M; CUMMINS, J; PRUCHNIC, R; et al. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. **The Journal of Cell Biology**. 157, 851-864, 2002.
124. REBELATTO, CLK; CARVALHO, KAT; SENEGAGLIA, AC; HANSEN, P; GUARITZA-SOUZA, LC; FRANCISCO, JL; CURY, C; OLANDOSKI, M; BROFMAN, PRS. Otimização na obtenção de células mononucleares da medula óssea em modelo experimental de transplantes de miocárdio. **Jornal Brasileiro de Transplantes**. 7, 2004.
125. REHMAN, J; LI, J; ORSCHELL, CM; MARCH, KL. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secret angiogenic growth factors. **Circulation**. 276, 5281-5286, 2003.

126. REIDY, MA; CHOPEK, M; CHAO, S; MCDONALD, T; SCHWARTZ, SM. Injury Induces Increase of von Willebrand Factor in Rat Endothelial Cells. **American Journal of Pathology**. 134, 857-864, 1989.
127. RIBATTI, D; VACCA, A; RONCALI, L; et al. Hematopoiesis and angiogenesis: a link between two apparently independent processes. **Journal of Hemotherapy and Stem Cell Research**. 9, 13-9, 2000.
128. RICHARDSON MR, YODER MC, Endothelial progenitor cells: Quo Vadis? **J Mol Cell Cardiol** (2010),
129. RISAU W, FLAMME I. Vasculogenesis. **Ann. Rev. Cell Dev. Biol.** 11, 73-91. 1995.
130. RISAU, W; FLAME, I. Vasculogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. 267, 10931-10934, 1995.
131. RIVARD, A; FABRE, JE; SILVER, M; CHEN, D; MUROHARA, T; KEARNEY, M; MAGNER, M; ISNER, JM. Age dependent impairment of angiogenesis. **Circulation**. 99, 111-120, 1999.
132. ROSAMOND, W. American Heart Association Heart Diseases and Stroke Statistics – 2007 Update: A Report from the American Heart Association Statistic Committee and Stroke Subcommittee. **Circulation**. 115: e69-e171, 2007.
133. ROY H, BHARDWAJ S, YLA-HERTTUALA S. Biology of vascular endothelial growth factors. **FEBS Lett**. 580, 2879-2887, 2006.
134. RUMPOLD H, WOLF D, KOECK R, GUNSILIUS E. Endothelial progenitor cells: a source for therapeutic vasculogenesis? **J Cell Mol Med**. 8, 509-518, 2004.
135. SCHETTERT, I. Ensaios clínicos no Brasil para doenças cardíacas utilizando células-tronco. **Ciência & Saúde Coletiva**. 13, 15-22, 2008.

136. SCHUSTER, MD; KOCHER, AA; SEKI, T; MARTENS, TP; XIANG, G; HOMMA, S. Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**. 287, H525-32, 2004.
137. SCHUSTER, MD; MARTENS, TP; ITESCU, S. Células-Tronco Mesenquimais para Reparo Cardíaco. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**. 16, 95-101, 2008.
138. SCHWARTZ, Y; KORNOWSKI, R. Progenitor and embryonic stem cell transplantation for myocardial angiogenesis and functional restoration. **European Heart Journal**. 24, 404-411, 2003.
139. SENEGAGLIA, AC; BARBOZA, LA; DALLAGIOVANNA, B; AITA, CAM; HANSEN, P; REBELATTO, CLK; AGUIAR, AM; MIYAGUE, NI; SHIGUNOV, P; BARCHIKI, F; CORREA, A; OLANDOSKI, M; KRIEGER, MA; BROFMAN, PRS. Are purified or expanded cord blood-derived CD133+ cells better at improving cardiac function? **Experimental Biology and Medicine**. 235, 119-129, 2010.
140. SENEGAGLIA, AC; BROFMAN, PRS; AITA, CAM; DALLAGIOVANA, B; REBELATTO, CLK; HANSEN, P; BARCHIKI, F; KRIEGER, M. A. Formação in vitro de túbulos capilares a partir de células de sangue de cordão umbilical humano com perspectivas para aplicação terapêutica. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**. 23, 467-473, 2008.
141. SHEN, BQ; LEE, DY; CORTOPASSI, KM; DAMICO, LA; ZIONCHECK, TF. Vascular endothelial growth factor KDR receptor signaling potentiates tumor necrosis factor – induced tissue factor expression in endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**. 276, 5281-5286, 2001.
142. SHIBUYA M, CLAEISSON-WELSH L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Exp Cell Res**. 312, 549-560, 2006.

143. STAMM, C; KLEINE, HD; WESTPHAL, B. CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.** 52, 152-158, 2004.
144. STEINMETZ M, NICKENIG G, WERNER N. Endothelial-regenerating cells: an expanding universe. **Hypertension.** 55, 593–599, 2010.
145. STRAUER, BE; BREHM, M; ZEUS, T; KOSTERING, M; HERNANDEZ, A; SORQ, RV; KOGLER, G; WERNET, P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. **Circulation.** 106, 913-1918; 2002.
146. TATEISHI-YUYAMA, E.; MATSUBARA, H.; MUROHARA, T.; IKEDA, U.; SHINTANI, S.; MASAKI, H.; AMANO, K.; KISHIMOTO, Y.; AKASHI, H.; SHIMADA, K.; IWASAKA, T.; IMAIZUMI, T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial. **Lancet.** 360, 427-435, 2002.
147. TERRANOVA, VO; DIFLORIO, R; LYALL, RM; HIC, S; FRIESEL, R; MACIAG, T. Human Endthelial Cells are Chemotact to Endothelial Cell Growth Factor and Heparin. **The Journal of Cell Biology.** 101, 2330-2334, 1985.
148. UEMURA, R; XU, M; AHMAD, N; ASHRAF, M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. **Circulation Research.** 98, 1414-1421, 2006.
149. VAN BELLE, E; RIVARD, A; CHEN, D; SILVER, M; BUNTING, S; FERRARA, N; SYMES, JF; BAUTERS, C; ISNER, JM. Hypercholesterolemia attenuates angiogenesis but does not preclude augmentation by angiogenic cytokines. **Circulation.** 96, 2667-2674, 1997.
150. VANDERHEYDEN, M; MANSOUR, S; VANDEKERCKHOVE, B; DE BONDT, P; VAN HAUTE, I; LOOTENS, N. Selected intracoronary CD133+ bone marrow cells

promote cardiac regeneration after acute myocardial infarction. **Circulation**. 110, 324-325, 2004.

151. VERFAILLIE, CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends in Cell Biology**. 11, 502-508, 2002.

152. VOLTARELLI, JC. Transplante de células-tronco hematopóéticas no diabete melito do tipo I. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 26, 43-45, 2004.

153. VUKICEVIC, S. Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular activity related to extracellular matrix components. **Experimental Cell Research**. 202, 1, 1992.

154. WAGERS, AJ; WEISSMAN, IL. Plasticity of adult stem cells. **Cell**. 116, 639-648, 2004.

155. WEISSMAN, IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell**. 100, 157-168, 2000.

156. WOLLERT, KC; MEYER, GP; LOTZ, J; RINGES-LICHTENBERG, S; LIPPOLT, P; BREIDENBACH, C; FICHTNER, S; KORTE, T; HORNIG, B; MESSINGER, D; ARSENIJEV, L; HERTENSTEIN, B; GANSER, A; DREXLER, H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: The BOOST randomized controlled clinical trial. **Lancet**. 364, 141-148, 2004.

157. XU, C; POLICE, S; RAO, N; CARPENTER, MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. **Circulation Research**. 91, 501-517, 2002.

158. YAMAZAKI Y, TOKUNAGA Y, TAKANI K, MORITA T. Identification of the heparin-binding region of snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF-F) and its blocking of VEGF-A 165. **Biochem**. 44, 8858-8864, 2004.

159. YING, QL; NICHOLS, J; EVANS, EP; SMITH, AG. Changing potency by spontaneous fusion. **Nature**. 416, 545-548, 2002.
160. YODER MC, INGRAM DA. Endothelial progenitor cell: ongoing controversy for defining these cells and their role in neoangiogenesis in the murine system. **Curr Opin Hematol**. 16, 269-273, 2009.
161. YOUNG, HE; BLACK, AC. Adult stem cells. **The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**. 276, 75-102, 2004.
162. ZAMMARETTI P, ZISCH AH. Adult 'endothelial progenitor cells'. Renewing vasculature. **Int J Biochem Cell Biol**. 37, 493-503, 2005.
163. ZUMSTEIN, P; STILES, CD. Molecular cloning of gene sequences that are regulated by insulin-like growth factor I. **The Journal of Biological Chemistry**. 262, 11252-11260, 1987.



## ANEXO 01 – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PUCPR

### PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

NÚCLEO DE BIOÉTICA  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

**Parecer nº:** 222/07 CEUA PUCPR

**Registro do projeto no CEUA:** 298

**Data do parecer:** 04/12/2007

**Título do Projeto:**

Isolamento, purificação, expansão e caracterização de células progenitoras endoteliais adultas de medula óssea. Estudo experimental em ratos wistar.

**Pesquisador responsável:**

Andrea Kuhn

**Equipe da pesquisa:**

**Instituição:**

PUCPR

**Categoria do Experimento - Categoria B**

Espécie de Animal	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Rattus norvegicus albinus, rodentia, mammalia da linhagem wistar,	Macho	2 meses/200g.	30

O colegiado do CEUA em reunião no dia 29/11/2007, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

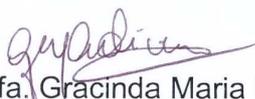
Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do

pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao senhor pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Curitiba, 4 de dezembro de 2007

Atenciosamente



Profa. Gracinda Maria D'Almeida e Oliveira  
Coordenadora do CEUA  
PUC PR



**ANEXO 02 – ARTIGO CIENTÍFICO****Diferenciação de células mononucleares da medula óssea de ratos Wistar em células endoteliais.**

Andrea Kuhn<sup>1</sup>, Alexandra Cristina Senegaglia<sup>1</sup>, Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto<sup>1</sup>, Paula Hansen Suss<sup>1</sup>, Fabiane Barchiki<sup>1</sup>, Bruno Dallagiovanna<sup>2</sup>, Marcia Olandoski<sup>3</sup>, Paulo Roberto Slud Brofman<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório Experimental de Cultivo Celular, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, 80215-901, Brasil. <sup>2</sup> Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Rua Algacyr Munhoz Mader, 3775, Curitiba, 81350-010, Brasil. <sup>3</sup> Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, 80215-901, Brasil.

**TÍTULO RESUMIDO:** Diferenciação de células mononucleares em endoteliais.

**PALAVRAS-CHAVES:** Células progenitoras endoteliais. Células endoteliais. Fatores de crescimento. Diferenciação. Proliferação.

**AGRADECIMENTOS:**

CNPQ – 552233/2005-6

CAPES – PROSUP modalidade II

**ENDEREÇO DE CORRESPONDÊNCIA:**

Paulo Roberto Slud Brofman. Laboratório Experimental de Cultivo Celular, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, 80215-901, Brasil.

VER MODIFICAÇÕES  
NÃO ESQUECER DO INGLÊS

**ANEXO 03 – EXPRESSÃO CELULAR, FUNÇÃO OUTRO NOME E FAMÍLIA RELACIONADA DOS ANTICORPOS DE SUPERFÍCIE AVALIADOS**

	<b>CD14</b>	<b>CD31</b>	<b>CD34</b>	<b>CD45</b>	<b>CD90</b>	<b>CD105</b>	<b>CD133</b>	<b>CD144</b>
<b>Expressão celular</b>	Células mielomonocíticas, superfície de monócitos, granulócitos e macrófagos.	Monócitos, plaquetas, granulócitos, neutrófilos, células NK, subpopulações de células T, CE	Precursos hematopoiéticos, CE de pequenos vasos.	Todas as células hematopoiéticas	Protimócitos CD34+ (homem), timócitos, células T (camundongo)  Células hematopoiéticas, fibroblastos e células estromais	CE (pequenos e grandes vasos), subgrupo de células da MO, macrófagos e monócitos ativados.	Células progenitoras hematopoiéticas, neurais e endoteliais.	CE, algumas células do estroma
<b>Função</b>	Receptor para complexo de lipopolissacarídeo e proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LBP)	Molécula de adesão mediando tanto as interações leucócito-endotélio quanto endotélio-endotélio	Ligante para CD62L (selectina-L), adesão de célula-célula.	Tirosina fosfatase, aumenta sinalização pelo receptor de antígeno de células T e B, múltiplas isoformas resultam de uniões alternativas	Inibição da proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas.	Liga TGF- $\beta$ 1		Organiza as junções aderentes nas CE
<b>Outro nome</b>	LPS-R	GPiia, Endocam, PECAM-1	gp105-120	Antígeno leucocitário comum (LCA), T200, B220, CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RO, EC 3.1.3.4, Ly5	Thy-1	Endoglina	PROML 1, AC133, prominina	Caderina-S, Caderina VE
<b>Família relacionada</b>		Imunoglobulina	Mucina	Fosfatase	Imunoglobulina	TGF	Glicoproteína de membrana	Caderina

Adaptado de: JANEWAY, 2005