

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA – CIRURGIA
MESTRADO INTERINSTITUCIONAL UFRGS-UCS
UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**

RONALD PAULO PINTO ZART

**IDENTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH
FACTOR (VEGF) PELA CONTAGEM DE CÉLULAS MARCADAS
IMUNOISTOQUIMICAMENTE NO OMENTO DE RATOS APÓS LIGADURA
ARTERIAL E APÓS LIGADURA VENOSA**

Porto Alegre

2007

RONALD PAULO PINTO ZART

**IDENTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH
FACTOR (VEGF) PELA CONTAGEM DE CÉLULAS MARCADAS
IMUNOISTOQUIMICAMENTE NO OMENTO DE RATOS APÓS LIGADURA
ARTERIAL E APÓS LIGADURA VENOSA**

Dissertação de Mestrado em Medicina
Para obtenção do título de Mestre em Cirurgia
Mestrado Interinstitucional
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Universidade de Caxias do Sul
Faculdade de Medicina

Orientador: Prof. Dr. Eduardo K. Saadi

Porto Alegre

2007

AGRADECIMENTOS

Nada fazemos sozinhos! A todos que auxiliaram neste trabalho, em especial o Dr.Eduardo Serafini, o Dr. Wilson Spiandorello, os acadêmicos Fernando, Luciano, Sara e Gabriela e as equipes dos laboratórios de Fisiologia e de Patologia, todos da Universidade de Caxias do Sul, meu muito obrigado. Ao professor Dr. Eduardo K. Saadi muito obrigado pela grande oportunidade que me proporcionou.

Ninguém supera desafios sem apoio! Muito obrigado à minha família e aos meus colegas de trabalho.

RESUMO

O sistema cardiovascular está estrutural e funcionalmente disposto de modo “circular”. Situações de obstrução do fluxo sanguíneo determinam o aparecimento de mecanismos que visam suplantar tais interrupções e manter a circularidade íntegra. À nível molecular, o principal elemento envolvido nestes mecanismos é o *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)*. A expressão do VEGF quando há oclusão arterial está bem documentada, faltando elementos com relação à oclusão venosa. Neste estudo objetivamos verificar se a oclusão à nível arterial determina uma expressão do VEGF diferente daquela que ocorre se a oclusão acontecer à nível venoso. Para isso randomizamos dois grupos de ratos de experimentação. Em um grupo realizamos a oclusão da aorta infra-renal e em outro a oclusão da veia cava infra-renal. Posteriormente medimos a expressão do VEGF através da contagem do número de células marcadas imunoistoquimicamente no omento destes ratos. O resultado demonstrou que a expressão do VEGF, quando analisada pelo método proposto foi igual no grupo da oclusão venosa e no grupo da oclusão arterial.

Palavras-Chave: Sistema circulatório; fatores de crescimento; fator de crescimento endotelial vascular; oclusão arterial; oclusão venosa; angiogênese; arteriogênese; venogênese; circulação colateral, imunoistoquímica; densidade vascular; densidade celular.

ABSTRACT

The cardiovascular system is structurally and functionally circular. Situations in which there is obstruction to blood flow trigger mechanisms to bypass these blockages and maintain the integrity of the circularity. At the molecular level the main factor involved is the *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)*. The VEGF expression associated with arterial occlusion is well documented but is lacking evidence when venous occlusion occurs. This study aimed to verify if the expression of VEGF when an occlusion occurs at venous level is the same or different from that caused at the arterial level. Two groups of rats were randomized by infra-renal aortic occlusion or inferior vena cava occlusion. VEGF was measured by counting the immunohistochemistry method marked cells at the omentum level. It was demonstrated that the VEGF expression is the same in the venous group obstruction as the arterial obstruction group.

Keywords: Circulatory system; growth factors; vascular endothelial growth factor, arterial occlusion; venous occlusion; angiogenesis; arteriogenesis; venogenesis; collateral circulation; immunohistochemistry; vascular density; cellular density.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número de células marcadas entre os grupos (média de 5 amostras).	34
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados com o número de células em cada amostra, medianas e percentis.....	33
----------	---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Principais eventos na angiogênese.	12
Quadro 2: Fatores regulatórios da angiogênese.....	13
Quadro 3: Ligantes e receptores que determinam a maturação da parede do vaso e da rede vascular.	13
Quadro 4: Moléculas que governam a interação célula-célula.	13
Quadro 5: Moléculas que governam a interação entre as células e a matriz extracelular.	14
Quadro 6: Mediadores vasoativos na hipertensão portal.	20
Quadro 7: Fatores pró-angiogênicos que são expressados dentro do trombo venoso em resolução.	20
Quadro 8: Família do VEGF: receptores, ligantes e funções.	22
Quadro 9: Defeitos embrionários relacionados aos genes que controlam a angiogênese conforme o estágio de desenvolvimento.	22

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	9
1 OBJETIVO DO TRABALHO	27
2 HIPÓTESES.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 TÉCNICA CIRÚRGICA.....	29
3.2 IMUNOISTOQUÍMICA	30
3.3 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO VEGF E CONTAGEM DE CÉLULAS.....	31
3.4 DELINEAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4 RESULTADOS	33
5 DISCUSSÃO.....	35
REFERÊNCIAS	38
ANEXO A – FIGURAS.....	46

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Justificativa para o sistema circulatório em organismos pluricelulares complexos

O sistema circulatório existe para permitir que substâncias químicas cheguem e saiam das células de um organismo pluricelular complexo de modo eficiente para mantê-lo vivo. Sem um sistema circulatório, a difusão de uma única molécula de oxigênio, seguindo o gradiente de concentração química, leva 100 anos para mover-se da cabeça aos pés de um homem e um cilindro de tecido com 1 centímetro de diâmetro, mergulhado num meio de oxigênio puro, leva três horas para ficar 90% saturado. Em meios como estes, organismos mais complexos não podem sobreviver. A difusão de oxigênio através de um interstício não vascularizado, pela ausência da renovação rápida desse gás e pela maior distância a percorrer, faz com que o gradiente para difusão seja muito pequeno. Por outro lado, a interposição de um sistema de tubos condutores e permeáveis (como os capilares), transportando oxigênio em altas concentrações, ao mesmo tempo que renova o meio com esse gás, diminui a distância para este atingir as células (1). As exigências evolutivas determinaram, então, que surgisse o sistema circulatório a medida que mais e mais células, distantes umas das outras, passam a necessitar constantemente da chegada de nutrientes e da saída de catabólitos a cada período de tempo.

Natureza “circular” do sistema circulatório e sua estrutura

Para ser possível a chegada e a saída de substâncias, é necessário que o meio líquido que serve de veículo para as mesmas, execute um caminho circular de chegada e saída do seu destino final. Isso evita que seja necessário a recriação do próprio líquido a cada passagem. É necessária, apenas, a renovação da composição do mesmo de acordo com a exigência metabólica. Este caminho circular, ou circulatório, se faz dentro de um sistema de condutos que compõem o sistema juntamente com a bomba aspirante e propulsora (o coração). O conjunto de vasos que leva o líquido com os nutrientes às células compõem o sistema arterial e o que retira o líquido com os resíduos do catabolismo compõe o sistema venoso. Estruturalmente, para permitir uma diminuição da velocidade do fluxo e uma diminuição da pressão de perfusão, benéficas para a difusão das substâncias, as artérias se ramificam em condutos cada vez menores até chegar aos capilares. Após, ocorre a situação inversa, onde as veias vão progressivamente se reunindo em condutos maiores até formarem os maiores vasos que retornam ao coração. Cada segmento do sistema circulatório apresenta vasos com

características histológicas e funcionais peculiares (2)(3) conforme as figuras 1 e 2. A parede dos vasos é composta por células endoteliais e células murais que estão embebidas na matriz extracelular. A origem, número, tipo e organização das células murais, a composição da matriz extracelular associada e a conexão entre o sistema vascular e o sistema nervoso dependem da localização do vaso e da sua função. A maturação completa da rede vascular formada por vasculogênese e angiogênese deve ocorrer tanto a nível de parede quanto a nível de rede. A maturação da parede envolve recrutamento de células murais, desenvolvimento da matriz extracelular e da lâmina elástica e especialização órgão-específica das células endoteliais, células murais e da matriz extracelular (junções interendoteliais, fenestrações, polaridade ápico-basal e receptores de superfície). A maturação da rede envolve otimização dos padrões de brotamento, expansão, estabilização, podamento, remodelamento e especialização para atingir as demandas locais (figura 3, figura 4 e figura 5) (4). A natureza circular do sistema está representada na figura 6 (5).

Evidências de que o sistema circulatório tende a suplantar obstruções

A manutenção da vida em animais pluricelulares complexos depende da integridade anatômica e funcional do sistema circulatório. Situações clínicas diárias nos dão evidências claras de que, na situação de obstrução de artérias ou veias, o organismo lança mão de mecanismos que visam a criação de desvios ao fluxo sanguíneo, na tentativa de manter a natureza circular do sistema. Assim, na obstrução de artérias coronárias e de artérias periféricas, situações de alta morbimortalidade, observamos o incremento da circulação colateral na vizinhança do setor obstruído e o surgimento de novos vasos capilares no interior dos tecidos isquêmicos e hipóxicos (6)(7). Do mesmo modo, na obstrução do sistema venoso periférico, do sistema venoso portal, do sistema venoso pulmonar e das veias da retina observamos o surgimento de circulação colateral (8)(9)(10)(11)(12). Além disso, no sistema venoso, ocorre uma tentativa vigorosa de recanalização intraluminal do segmento obstruído por trombose além da tentativa de desvio por circulação colateral (13)(14).

Processos envolvidos na formação de vasos sanguíneos e na ativação da circulação colateral

Subjacente a estas tentativas de desvio “natural” do fluxo sanguíneo em torno de segmentos obstruídos, e da criação de novos vasos sanguíneos, existem vários mecanismos que caracterizam a arteriogênese, a angiogênese e a venogênese. Os dois primeiros (arteriogênese e angiogênese), devido ao maior impacto sobre a morbimortalidade, são

extensamente estudados. Sobre o último (venogênese), a literatura é mais restrita em termos dos mecanismos envolvidos apesar de extensa nos relatos de situações clínicas onde ocorrem.

A formação do sistema vascular é modulada por três processos básicos (15). As figuras 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 ilustram estes processos (16)(17)(18)(19)(20)(22). Durante a embriogênese, ocorre a diferenciação das células embrionárias mesenquimais (angioblastos ou células precursoras) em células endoteliais resultando na formação, pela primeira vez, de vasos sanguíneos. Este processo é chamado de vasculogênese. A partir destes vasos, outros novos vasos se formam por brotamento ou por subdivisão intravascular (intussuscepção) (17)(21). Este processo é chamado de angiogênese e ocorre tanto na vida adulta como na vida embrionária. Após formados, estes novos vasos se transformam em vasos maduros pelos processos de remodelamento e podamento. O terceiro processo, arteriogênese, também ocorre em vasos pré-existentes e consiste na proliferação e remodelamento da circulação colateral quiescente e não utilizada até aquele momento.

Mecanismos envolvidos e seus protagonistas

O processo de angiogênese ocorre em uma sucessão de fases caracterizadas por uma complexa interação entre células, fatores de crescimento e citocinas que determinam o surgimento de uma rede de capilares à partir de um único vaso capilar. O quadro 1 (15) sintetiza os eventos chaves da angiogênese. Os elementos celulares envolvidos são a célula endotelial, as células musculares lisas, os pericitos, os fibroblastos, os monócitos, as células endoteliais progenitoras circulantes e as plaquetas. Os principais fatores de crescimento e citocinas envolvidas são o *vascular endothelial growth factor (VEGF)*, os *fibroblasts growth factors 1 e 2 (FGF 1 e 2)*, o *placenta growth factor (PGF)*, as *angiopoietins 1 e 2 (Ang1 e 2)* e as *neuropilins-1 e 2 (Neu-1 e 2)*, o *platelet derived growth factor (PDGF)*, *tumor necrosis growth factor 4*, o *transforming growth factor (TGF)* e o *insulin-like growth factor I (ILGF-1)*, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)*, *early growth response protein-1 (EGRP-1)*, *monocyte chemoattractant proteins-1, 2 e 3 (MCP)*, o *tumor necrosis factor alfa (TNF)*, *interleukin-1 (IL-1)*, *leptin*, *extracellular matrix proteins*, *hypoxia-inducible factor-1 (HIF)* e a *Akt/protein kinase B* dentre outros (23)(24)(25). Exercem também um importante papel o óxido nítrico e substâncias que atuam como receptores (*selectins*, *ICAM-1*, *VCAM-1*) para as células envolvidas, para várias proteínas extracelulares e para os fatores de crescimento (26). Podemos dizer que a angiogênese resulta de um balanço entre ativadores e inibidores do processo e da integração entre as células envolvidas e a matriz extracelular. No quadro 2 estão citados as diversas moléculas envolvidas na ativação e

na inibição da angiogênese (27). Nos quadros 3, 4 e 5 estão citadas as diversas interações existentes entre os protagonistas da formação dos vasos sanguíneos.

<i>Fase</i>	<i>Evento</i>
Ativação das células endoteliais e dos pericitos	Modificações morfológicas nas células endoteliais para proliferação e secreção, vasodilatação local, aumento da permeabilidade vascular e acúmulo de fibrina extravascular
Degradação da membrana basal	Estímulo angiogênico resulta em degradação proteolítica da membrana basal
Migração das células endoteliais	Fatores quimiotáticos produzidos por fibroblastos, monócitos e plaquetas induzem a migração endotelial e o brotamento capilar
Proliferação das células endoteliais	Fatores mitogênicos produzidos localmente induzem a síntese de DNA pelas células endoteliais e mitoses celulares
Diferenciação das células endoteliais	Proliferação das células endoteliais diminui e o contato entre as células se reestabelece; brotos capilares desenvolvem lúmen
Reconstituição da membrana basal	Maturação dos vasos é obtida pela reconstituição da membrana basal sintetizada pelas células endoteliais e pelos pericitos
Maturação da vasculatura e estabilização	Remodelamento dos capilares por estabilização e regressão

Quadro 1: Principais eventos na angiogênese.

Segundo Felmeden DC, Blann AD, Lip GYH. European Heart Journal 2003.

Ativadores	Inibidores
Angiogenin	Angiostatina (fragmento do plasminogênio)
Angiopoietin-1	Anti-angiogenic anti-trombin III
AC133	Canstatin
Chemokines	
Del-1	Cartilage derived inhibitor (CDI)
B-estradiol	CD59 complement fragment
Ephrins	Endostatin (collagen XII fragment)
FGF – ab	Fibronectin fragment
Follistatin	Fragment of SPARC
HGF	Heparinases
Id1/Id3	HCG
Integrins aVb3, aVb5, a5b1	IFN – abg
IL8	Interferon inducible protein (IP – 10)
Leptin	IL 4, IL 12, IL18
MCP-1	2 – methoxyestradiol
MMPs	Maspin
NOS	Kringle – 5 (plasminogen fragment)
PLGF	Osteopontin fragment
PDGF-BB	Placental ribonuclease inhibitor
Pleiotrophin (PTN)	Plasminogen activator inhibitor
Platelet derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF)	PEDF (pigment epithelium derived growth factor)
PIGF	
Proliferin	PF4
TGF – ab	Prolactin 16 kDa fragment
TNF – a	Retinoids
VE cadherin	TSP – 1
VEGF	Vasculostatin

Quadro 2: Fatores regulatórios da angiogênese.

Segundo Gupta K, Zhang J. Postgraduate Medical Journal, 2005. Promotores e inibidores da angiogênese ocorrem naturalmente. AC 133, marcador das células troncos hematopoiéticas; Del-1, developmentally regulated endothelial locus 1; FGF, fibroblast growth factor; HGF, hepatocyte growth factor; IL8, interleukin 8; MCP-1, macrophage chemoattractant protein; MMPs, matrix metalloproteinases; NOS, nitric oxide synthase; PLG, placental growth factor; PDGF-BB, platelet derived growth factor BB; HCG, human chorionic gonadotrophin; IFN, interferon; TGF, transforming growth factor; TNF, tumor necrosis factor; VE cadherin, vascular endothelial cadherin; VEGF, vascular endothelial growth factor; PF4, platelet factor 4; TSP-1, thrombospondin 1.

<i>Ligante/receptor (tipo celular)</i>	<i>Função</i>
VEGF/VEGFR1,2 (endotélio)	Aumenta atividade das proteases para organização da matriz extracelular; Gera matriz extracelular provisória por aumento da permeabilidade; Aumenta atividade do PDGF B para recrutar células murais para estabilização dos vasos; Suprime apoptose para estabilizar vasos; Induz à especialização das células endoteliais (ex: fenestrações)
VEGF 164/VEGFR2 e NRP1 (endotélio)	Promove crescimento arterial
VEGF C/VEGFR3 e NRP2	Orienta o desenvolvimento dos linfáticos
VEGF/PKR1,2 (endotélio)	Induz especialização do endotélio em órgãos endócrino (ex: fenestrações);
Via da Notch (endotélio, células murais)	Determina a diferenciação das células progenitoras (endotelial x mural); Estabelece a diferenciação vascular (artéria x veia em "upstream" a sinalização das ephrins)
EphrinB2/EphB4 (endotélio)	Determina a especialização arterial ou venosa para o endotélio; guia a ramificação dos vasos
PDGF B/PDGFR B (endotélio, células murais)	Promove proliferação, migração e recrutamento das células murais
S1P1/EDG1 (endotélio, células murais)	Promove o recrutamento de células murais (downstream a sinalização do PDGF B)
Ang1/Tie2 (endotélio)	Estabiliza o vaso por facilitar a interação entre o endotélio e as células murais e o endotélio e a matriz extracelular.; suprime a apoptose das células endoteliais; induz o arranjo hierárquico dos ramos na ausência das células murais
Ang2/Tie2 (endotélio)	Induz a apoptose das células endoteliais na ausência do VEGF; determina o padrão dos vasos linfáticos
Ang1/Tie1,2 (endotélio)	Coordena a polaridade vascular
TGF B1/TGF BR11 (endotélio, células murais)	Promove a produção de matriz extracelular e proteases; promove a diferenciação de fibroblastos à miofibroblastos e à células murais através do fator de resposta sorológico
TGF B1/ALK1 (endotélio)	Regula a proliferação e a migração das células endoteliais (fase de ativação)
TGF B1/ALK5 (endotélio)	Regula a maturação dos vasos (fase de resolução)
TGF B1/ALK1 e endoglinina (endotélio)	Promove a especialização das artérias e das veias através da sinalização envolvendo Notch e ephrins
Via da Syk/SLP76	Separa vasos linfáticos dos vasos sanguíneos

Quadro 3: Ligantes e receptores que determinam a maturação da parede do vaso e da rede vascular.

Segundo Jain RK. Nature Medicine 2003.

<i>Moléculas (tipo celular)</i>	<i>Função</i>
VE-cadherin (endotélio)	Forma a junção endotélio-endotélio
N-cadherin (endotélio, célula mural)	Facilita a junção endotelial e a comunicação com as células murais
Connexins (endotélio, células murais)	Facilita a junção endotelial e a comunicação com as células murais
Occludins e claudins	Forma as junções espessas no cérebro e capilares retinianos
CD148 (endotélio)	Regula a interação entre as células endoteliais e as células murais.

Quadro 4: Moléculas que governam a interação célula-célula.

Segundo Jain RK. Nature Medicine 2003.

<i>Moléculas (tipo celular)</i>	<i>Função</i>
a5B1, a1B1, a2B1, aVB3, aVB5 (endotélio)	Suprime a apoptose das células endoteliais
Proteases (endotélio, células murais)	Padronização vascular pela liberação de fatores de crescimento Clivagem das moléculas da matriz extracelular (como o colágeno XVIII à endostatina), proteínas plasmáticas (como o plasminogênio à endostatina) e proteases moleculares (como as MMP2 à PEX); produtos da clivagem causam apoptose
Inibidor de proteases	Estabiliza os vasos por prevenir a dissolução da matriz

Quadro 5: Moléculas que governam a interação entre as células e a matriz extracelular.
Segundo Jain RK. Nature Medicine 2003.

Resumidamente, podemos dizer que a angiogênese desenvolve-se do seguinte modo. Num primeiro momento ocorre um aumento da permeabilidade endotelial mediado por óxido nítrico. Segue-se um extravasamento de proteínas para o tecido adjacente seguido da ativação das células endoteliais progenitoras no capilar. A seguir, proteases desmancham a membrana basal e os tecidos circunjacentes. Isto permite que as células endoteliais migrem para o parênquima tecidual para proliferarem. Após isto, as mesmas adquirem uma conformação espacial apropriada para formar a luz do novo capilar. Neste momento, pericitos são recrutados para promover a criação de uma nova membrana basal. Após, ocorre a maturação e estabilização destes novos vasos capilares com anastomoses entre os mesmos (18)(19)(21). A sequência temporal destes processos está ilustrada nas figuras 17 e 18 onde vemos que os fatores de crescimento são expressados já nas primeiras horas do processo (28)(29). O processo de arteriogênese, mesmo tendo similaridades com o da angiogênese, apresenta algumas significativas diferenças (20)(30).

Ambas são formas de crescimento vascular para reduzir a isquemia tecidual, porém, devido as leis físicas da mecânica dos fluidos somente a arteriogênese pode produzir uma resposta, em termos de fluxo sanguíneo, capaz de equivaler-se ao déficit causado por uma obstrução de artéria de grande calibre. Angiogênese e arteriogênese são iniciados por distintos gatilhos. Em tecidos isquêmicos, o crescimento de capilares é iniciado como reação à hipóxia. A tensão de oxigênio exerce um papel chave na expressão de vários genes incluindo os da família do *VEGF*. Num ambiente de hipóxia, surge um fator de transcrição que atua como mediador das reações no tecido (31). É o *Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)* que se liga a regiões específicas do gene que expressa o *VEGF* fazendo com que haja um aumento da transcrição deste (figura 19). O *VEGF* é um potente agente mitogênico que inicia o processo de angiogênese aumentando a proliferação celular. Sob estas condições de hipóxia outros fatores de crescimento também tem sua expressão gênica aumentada e atuam como co-

reguladores do processo. São eles o *Transforming Growth Factor (TGF)*, o *Fibroblast Growth Factor (FGF)* e o *Platelet Derived Growth Factor (PDGF)* que também determinam um aumento da expressão do *VEGF*. Por outro lado, a arteriogênese pode ser induzida independentemente da presença de hipóxia.

Quando ocorre a oclusão de uma artéria, o local onde os vasos colaterais crescem é mais proximal à região onde ocorre a hipóxia, como demonstrado no modelo animal (30) de oclusão de artéria periférica. Isto não afasta, todavia, que em outros órgãos, como o coração por exemplo, onde o local da hipóxia tecidual gerada e o local da obstrução arterial são muito mais próximos que num membro, que o desenvolvimento da circulação colateral sofra influência maior do estímulo hipóxico. O principal fator desencadeante da arteriogênese, no entanto, é mecânico e não químico. A oclusão de uma artéria determina a diminuição da pressão na vasculatura distal criando um gradiente de pressão que favorece o fluxo através de colaterais pré-existentes (figuras 13, 15, 16 e 20) (32). Esta alteração física do fluxo sanguíneo, caracterizada como alteração do “*fluid shear stress*” determina, então, uma série de processos químicos nas células, similares aos que ocorrem na angiogênese, que levam a invasão por monócitos e digestão da matriz extracelular, migração e proliferação de células musculares lisas e alargamento dos vasos sob a influência do stress circunferencial da parede do vaso e dos fatores de crescimento (figura 21) (31). O aumento do raio do vaso e da espessura da parede restauram o “*fluid shear stress*” e o stress circunferencial da parede do vaso cessando o estímulo para o crescimento da circulação colateral. A integração entre as forças mecânicas e as respostas químicas ocorre devido a moléculas chamadas integrinas que estão na superfície endotelial e conectam estas células ao compartimento extracelular da parede vascular funcionando como sensores às alterações do “*fluid shear stress*”. Receptores tipo tirosina-quinase e canais iônicos também tem um papel nesta capacidade de sentir as alterações mecânicas da parede. A comunicação com o núcleo da célula é feita pelo citoesqueleto. No núcleo da célula ocorre a expressão gênica, controlada pelos “*shear stress responsive elements*”, para a quimioatração, ativação de citoquinas e produção de moléculas de adesão. Monócitos são recrutados pela MCP-1 e seletinas e moléculas de adesão intercelular são expressadas (ICAM-1 e VCAM-1). Estas moléculas tem sua produção estimulada pelos fatores de crescimento. Os monócitos (e seu sucessor, o macrófago) exercem um papel central na indução da proliferação de células e no remodelamento da parede vascular. Isto é feito através das *matrix-metalloproteinases* que degradam as estruturas extracelulares durante sua migração pela parede vascular. Após, devido ao estímulo provocado pelos fragmentos de elastina oriundos da clivagem da lâmina elástica, ocorre a

proliferação e migração de células musculares lisas. A liberação de fatores de crescimento como o FGF-2 por macrófagos também promove a proliferação celular dentro da parede do vaso (figura 21). Acredita-se que os linfócitos T também contribuem para arteriogênese ao liberarem citocinas quimioatratoras e darem suporte para o recrutamento dos monócitos (30). Além disso, especula-se que as células progenitoras de endotélio circulantes e células tronco da medula óssea também se incorporem aos vasos em crescimento como componentes do endotélio ou das camadas musculares lisas e tenham um papel no remodelamento da parede vascular (figura 24) (32)(33)(34)(35)(36).

Dentro do que foi discutido até aqui ressaltamos que a arteriogênese representa o mecanismo adaptativo mais eficiente contra a isquemia dos membros e de órgãos como o coração e o cérebro devido à sua capacidade de permitir um fluxo sanguíneo maior. O aumento do número de capilares resultante da angiogênese é incapaz de manter um fluxo da mesma magnitude. Outro aspecto importante a ser salientado é a importância da hipóxia no desenvolvimento da angiogênese e da inflamação no desenvolvimento da arteriogênese. Por outro lado, angiogênese e arteriogênese apresentam em comum a influência dos fatores de crescimento. Enquanto a angiogênese pode ser largamente explicada pela ação do VEGF a arteriogênese parece sofrer também a ação de vários outros fatores de crescimento atuando de forma orquestrada (figura 25) (37).

Sinalização à nível celular e molecular

A sinalização a nível celular e molecular destes processos se desenvolve do seguinte modo (figuras 22 e 23) (38). Nos tecidos, o acúmulo de HIF-1 nas células hipóxicas leva a um aumento da expressão de *VEGF*, do seu receptor *Flt-1* (*VEGFR-1*) e da *inducible nitric oxide synthase* (*iNOS*). O aumento persistente nos níveis de *VEGF* induz a expressão de outro receptor *Flk-1* (*VEGFR-2*) e da *constitutive nitric oxide synthase* (*eNOS*). Isto resulta em significativo aumento na atividade da cascata de sinalização do *VEGF* dependente de óxido nítrico. Enquanto o mecanismo da cascata de sinalização do *VEGF-NO* não é inteiramente estabelecido pode haver uma diminuição na atividade da *PKC* mediada pelo *NO*. Ao mesmo tempo, a hipóxia tecidual tem relativamente menor efeito na cascata de sinalização do *FGF*. Não há significativa mudança na expressão do *FGF* e dos seus receptores (*FGF Rs* e *syndecan-4*). Um efeito menor é o aumento do número de sítios de ligação entre *FGF* e o sulfato de heparan. Isto ocorre secundariamente a indução da expressão de enzimas responsáveis pela síntese destes sítios e resulta num aumento da sensibilidade das células endoteliais à hipóxia. Durante a arteriogênese, a nível tecidual, a sequência de eventos é

diferente. As células circulantes que se acumulam no local onde ocorreu a alteração do “*fluid shear stress*”, principalmente os monócitos, produzem um aumento na expressão de *FGF*, *receptores de FGF*, *PDGF* e *syndecan-4* determinando uma profunda ativação nesta cascata de sinalização. Os monócitos também secretam *VEGF* e fatores capazes de aumentar a indução da expressão deste como a *proline/arginine-rich peptide PR39*, determinando, embora em escala mais reduzida, a estimulação da cascata do *VEGF*. A nível das células endoteliais, durante ambos processos de formação de vasos sanguíneos, ocorre uma completa interação de sinais envolvendo os fatores de crescimento e as interações célula-célula e célula-matriz. De modo geral, muitos, se não todos, fatores de crescimento atuam via receptores *tyrosine kinase*. Estes, por sua vez, ativam as vias de sinalização intracelulares habituais como a *MAPK* e a *phosphoinositol-3-kinase (PI3K)* dentre outras. Utilizando o *VEGF 165* como exemplo, vemos que este fator de crescimento liga-se aos seus receptores *VEGF-R1* e *R2* e ao seu co-receptor (que facilita a ligação com o primeiro) *neuropilin-1*. O *FGF*, por sua vez, liga-se aos seus receptores *FGF-R1* e *R2* e ao seu co-receptor *syndecan-4*. Estas ligações de ambos fatores de crescimento aos seus receptores são dependente de integrinas. Ambos fatores de crescimento ativam a cascata do *Erk-1/2* através da via regular do *Grb2-SOS-Ras*. Ao mesmo tempo, o *VEGF* ativa duas outras vias. A primeira é a da *phosphoinositol-3-kinase* que, por sua vez, ativa a via da *Akt-1*. A ativação desta estimula a produção de *NO* via *eNOS* e inibe a apoptose. A segunda é a ativação da via da *Src* que exerce um papel na ativação da *PI3K* e na ativação da *FAK* integrina dependente. A ativação da *Src* exerce um papel chave na cascata do *VEGF* desde que ele é rapidamente bloqueado pela inibição da *Src* atividade. O papel da *Fak* é menos claro mas ela aparentemente provoca uma ativação adicional da via da *MAPK*. O *FGF*, em adição à ativação da via da *Erk-1/2*, também sinaliza pela via da *syndecan-4* a qual, por sua vez, ativa no final a *PKC*. Concluindo, podemos dizer que o *VEGF 165* e o *FGF* possuem uma via específica (onde recebem influências de integrinas) e uma via comum (da *MAPK*) de sinalização, e que a inibição de alguma das vias específicas leva a inibição da sinalização do fator de crescimento relacionado.

Venogênese e recanalização de trombo venoso

O termo venogênese é muito pouco utilizado na literatura para descrever o surgimento de novas veias durante os processos de neovascularização. Quando ocorre a trombose de uma veia profunda no membro inferior determinando a obstrução do fluxo sanguíneo, uma situação muito comum na prática clínica diária, são desencadeados dois processos: o de abertura de colaterais venosas para suplantar a obstrução e o de recanalização

intraluminal do trombo obstrutivo (39). Clinicamente estes pacientes podem apresentar seqüelas relacionadas à disfunção das válvulas venosas e ao refluxo característicos da síndrome pós-trombótica. Por outro lado, se ocorre a ligadura irreversível de uma veia, como demonstrado no caso da veia femoral superficial, havendo uma circulação colateral pela veia safena magna íntegra e ausência de refluxo nas veias vizinhas, a maioria dos pacientes apresenta pouca, ou mesmo nenhuma, manifestação clínica (dor, edema ou úlcera) (40). Apesar de se demonstrar resistência elevada e fixa ao fluxo nos vasos colaterais e diminuição no fluxo de escoamento em pacientes com obstrução venosa íleofemoral crônica durante o exercício (claudicação venosa) (41) evidenciou-se que a circulação colateral é capaz de manter o fluxo de drenagem adequado no repouso o que salienta a existência de circulação colateral venosa bem desenvolvida. A despeito destes trabalhos evidenciando a presença da circulação colateral venosa nos membros inferiores e de outros evidenciando que situação semelhante ocorre nos vasos esplâncnicos, pulmonares e retinianos (8)(9)(10)(11)(12)(13)(14), o resultado da pesquisa na base de dados da Pubmed sobre os mecanismos envolvidos nesta colateralização é muito escasso. Na trombose aguda da veia porta pode-se observar que em poucos dias surge o chamado “resgate venoso” onde novos vasos disseminam-se ao redor da via biliar e da vesícula aumentando progressivamente de tamanho e assumindo forma serpentina (transformação cavernomatosa). Apesar de serem descritos como novos vasos, o mecanismo subjacente a sua formação não é discutido (42). Na hipertensão no sistema venoso portal foram implicadas várias substâncias vasoativas como mediadoras do processo (quadro 6) e evidenciado que as veias colaterais parecem ser sensíveis ao óxido nítrico, a endotelina e a angiopoietina. No início da colateralização o mecanismo é o recrutamento de canais pré-formados (43). As alterações patológicas observadas na vasculopatia da hipertensão portal incluem o remodelamento das veias viscerais arterializadas, injúria da camada íntima destas veias e destruição das estruturas contráteis da parede dos vasos viscerais. Os mecanismos desta vasculopatia são atribuídos à mudanças hemodinâmicas no sistema venoso portal, à respostas imunologicamente mediadas, à modulação gênica, à presença de substâncias vasoativas e a resistência intrahepática ao fluxo sanguíneo (44). As alterações na hemodinâmica do sistema portal são explicadas pelo aumento da resistência ao fluxo originado pela hiperplasia intimal, irregularidades da parede vascular, diminuição na elasticidade e na contratilidade que levam a trombose mural e estreitamento ou oclusão dos vasos. Além desta diminuição do raio da luz dos vasos, estes também ficam tortuosos e aumentados de comprimento, o que, também pela lei de Poiseuille, aumenta a resistência ao fluxo. No desenvolvimento da vasculopatia portal há mecanismos

celulares e moleculares envolvendo as células endoteliais e musculares lisas, citocinas, fatores de crescimento, mediadores inflamatórios, e expressão de moléculas de adesão, de modo similar ao que acontece na arteriogênese, porém com efeitos mais marcados na migração e proliferação de células musculares lisas na região subintimal e produção de grandes quantidades de matrix extracelular que se depositam na parede dos vasos e levam ao espessamento dos mesmos. A regulação gênica também ocorre de modo a estimular estes mecanismos. O outro processo que se desenvolve após a obstrução do fluxo venoso por trombose é o de recanalização. Este, ao contrário do processo de desenvolvimento de colaterais, apresenta mecanismos melhores estudados. O trombo venoso costuma recanalizar através de um processo similar ao da formação do tecido de granulação no reparo de feridas. Neutrófilos, monócitos e células endoteliais entram no trombo para organizá-lo. No estágio inicial desta organização, o trombo retrai-se para longe da parede da veia. Isto leva ao surgimento de bolsões que vão aumentando de tamanho e sendo recobertos por endotélio. Estes bolsões coalescem formando canais que permitem o reestabelecimento do fluxo sanguíneo através e ao redor do trombo. Novos vasos também aparecem dentro do corpo do trombo e contribuem para a restauração de um lúmen patente. Estes acontecimentos estão associados com um aumento local da expressão do *VEGF*, do *FGF* e de outros fatores (figura 26) (45). Além disso, células progenitoras endoteliais da medula óssea, que também atuam na neovascularização arterial, são mobilizadas até o trombo para atuar na resolução do mesmo. A recanalização seria realizada por células endoteliais derivadas da “*vena venorum*” da parede do vaso estimulada por *VEGF*, *FGF* *MCP-1* produzidas por macrófagos originados da transdiferenciação de células progenitoras da medula óssea (46). A recanalização do trombo envolve, então uma interação entre o mesmo e a parede do vaso. Nesta interface ocorre o remodelamento da parede do vaso a partir do processo inflamatório que envolve a expressão de genes estimulantes de colágeno e *MMP* (47). A demonstração da presença do VEGF nos tecidos circunjacentes a trombose venosa foi feita no tecido nervoso após oclusão de veia cerebral e no humor aquoso após oclusão de ramo da veia central da retina. Também encontra-se o VEGF presente no líquido extraído de feridas operatórias e no líquido intraperitoneal pós-diálise, situações que cursam sem a oclusão de vasos sanguíneos de maior porte, mas que se relacionam com os mecanismos envolvidos no processo de reparação de feridas (48)(49)(50)(51).

Através desta discussão podemos observar que os mecanismos envolvidos na formação de novos vasos e na formação de colaterais estão relacionados com processos hemodinâmicos e processos inflamatórios. Substâncias como fatores de crescimento, dentre

os quais o *VEGF*, e citocinas são encontradas atuando tanto nas artérias quanto nas veias. Podemos dizer que a formação de vasos colaterais ocorre quando artérias e quando veias são obstruídas. Por outro lado, a recanalização de trombos intravasculares é um processo que tende a ocorrer, por razões ainda não esclarecidas, mais nas veias do que nas artérias (52).

<i>Vasodilatadores</i>	<i>Vasoconstritores</i>
Glucagon	Norepinefrina
Prostaciclina	Serotonina
Substância P	Endotelina
Fator Natriurético Atrial	AngiotensinaII
Ácidos Biliares	Vasopressina
Histamina	
PeptídeoIntestinal Vasoativo	
ÁcidoGama-Aminobutírico	
Leu e Meta-Encefalinas	
Endotoxina	
Fator de Necrose Tumoral alfa	
Óxido Nítrico	

Quadro 6: Mediadores vasoativos na hipertensão portal.
Segundo Paquet KJ. Med Sci Monit 2000.

<i>Fator</i>	<i>Atividade pró-angiogênica</i>
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	Aumenta a quimiotaxia das células endoteliais Aumenta a mitogênese das células endoteliais Mobiliza células endoteliais progenitoras
Fibroblast Growth Factor b (bFGF)	Aumenta a mitogênese das células endoteliais Aumenta a migração das células endoteliais Aumenta a α V β 3 integrinas
Monocyte Chemoattractor Factor 1 (MCP 1)	Aumenta a quimiotaxia das células endoteliais Aumento o brotamento de capilares
Interleucina 8 (IL8)	Aumenta a quimiotaxia das células endoteliais Aumenta a mitogênese das células endoteliais
Matrix Metalloproteinases 2 e 9 (MMP 2 e 9)	Aumenta a migração das células endoteliais

Quadro 7: Fatores pró-angiogênicos que são expressados dentro do trombo venoso em resolução.

Segundo Modarai B, Burnand KG, Humphries J, Waltham M, Smith A. Thromb Haemost 2005.

Família do *vascular endothelial growth factor (vegf)* e seus receptores

Os *VEGFs* compõem uma família de polipeptídeos com múltiplas funções implicadas na angiogênese, na linfangiogênese e no aumento da permeabilidade capilar ao atuarem sobre receptores específicos nas superfícies celulares. A família VEGF consiste

atualmente de 5 membros que tem seus efeitos mediados por 3 receptores tipo tirosina-quinase (quadro 8) O membro predominante desta família é o VEGF –A. Existem 4 isoformas principais de *VEGF-A* com 121, 165, 189 e 206 aminoácidos resultantes da transcrição variada de éxons de um mesmo gene. O gene do *VEGF-A* localiza-se no cromossoma 6p21.3 e possui 8 éxons e 7 íntrons. A isoforma predominante é o *VEGF* 165, isso é, com 165 aminoácidos na cadeia. O *VEGF-A* é uma glicoproteína homodimérica de 45 kDa com duas cadeias de direções opostas ligadas por pontes S-S entre as Cis-51 e a Cis-60. Tem estrutura similar ao *PDGF* com oito cistinas nas cadeias A e B porém com grupo NH₂ terminal mais helicóide do que estendido. Todas as isoformas do *VEGF-A* tem no grupo amino terminal o sinal peptídico que determina a capacidade de identificação pelos receptores *Flt-1* e *Kdr*. O *VEGF* 121 é um polipeptídeo ácido com pouca afinidade pela heparina e que se difunde no plasma facilmente. Os *VEGF* 189 e 206 são básicos, com maior afinidade pela heparina e, por isso, ficam seqüestrados na matriz extracelular. O *VEGF* 165, por ter propriedades intermediárias, permanece na matriz extracelular e ligado à superfície das células. As isoformas do *VEGF* ligadas à matriz extracelular podem ser liberadas em uma forma difusível pela ação da heparinase e da plasmina o que determina que a atividade proteolítica do plasminogênio possa ter um papel regulatório local na biodisponibilidade do *VEGF*. Pela propriedade de ligar-se à heparina (no *heparin-binding domain*) o *VEGF* 165 apresenta a melhor biodisponibilidade e potência biológica (53). A figura 27 (54) demonstra o aspecto molecular do VEGF e do seu receptor. A figura 28 demonstra como o VEGF atua na orientação da rede vascular que se forma através dos gradientes criados. Os efeitos do *VEGF-A* nas células endoteliais durante a angiogênese são mediados por dois receptores específicos (da família tirosina-quinase) à nível de membrana: o *VEGFR-1* e o *VEGFR-2*. Estruturalmente estes receptores apresentam um domínio extra-celular com características *immunoglobulin-like*, um domínio intracelular comum aos receptores do tipo tirosina-quinase (subdividido em dois segmentos) e um domínio transmembrana hidrofóbico . Estes receptores, também conhecidos como *Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)* e *Kinase-insert domain containing receptor (KDR)*, são 33% idênticos em seu domínio extracelular e 80% idênticos em seu *kinase domain*. O gene que codifica o *Flt-1* está no cromossoma 13q12 e o que codifica o *KDR* está no cromossoma 4q12. Apesar de todas as isoformas de *VEGF-A* serem capazes de induzir angiogênese existem diferenças nas capacidades de ligação de cada uma isoforma com os receptores. Como cada receptor está implicado com um efeito específico ocorre uma variedade de situações como exemplificado nos quadros 8 e 9 (15)(55)(56)(57). Em adição aos receptors *VEGF-1* e *VEGFR-2*, as células endoteliais

expressam neuropilin-1 (Neu-1) e neuropilin-2 (Neu-2) que ligam-se com baixa afinidade ao VEGF 165. Como possuem um domínio intracelular muito curto não conseguem atuar de modo independente sendo considerados como co-receptores para o VEGF-2. Os quadros 3, 4 e 5 citam as principais moléculas envolvidas na maturação vascular e nas relações das células com a matriz extracelular.

<i>Receptor</i>	<i>Ligante</i>	<i>Funções</i>
VEGFR-1 (Flt-1)	VEGF-A 121 VEGF-A 165 VEGF-1 PlGF-1 PlGF-2	Promove a migração celular Organização dos vasos sanguíneos Expressão gênica de monócitos e macrófagos
VEGFR-2 (KDR, Flk-1)	VEGF-A 121 VEGF-A 145 VEGF-A 165 VEGF-C VEGF-D	Mitogênese e diferenciação das células endoteliais Promoção da migração celular Aumento da permeabilidade vascular
VEGFR-3 (Flt-4)	VEGF-A 145 VEGF-A 165 VEGF-A 189 PlGF-2 VEGF-B 167	Remodelamento da vasculatura capilar primária Desenvolvimento cardiovascular embrionário Regulação do crescimento e manutenção do sistema linfático
Neu-1	VEGF-A 165 PlGF-2	Desenvolvimento do sistema cardiovascular
Neu-2	VEGF-A 165	Organização das fibras de nervo periférico Desenvolvimento da rede vascular

Quadro 8: Família do VEGF: receptores, ligantes e funções.

Segundo Felmeden DC, Blann AD, Lip GYH. European Heart Journal 2003.

<i>Gene afetado</i>	<i>Estágio de desenvolvimento</i>	<i>Fenótipo que ocorre</i>
VEGF-A	Vasculogênese e angiogênese	Mal-formação da aorta dorsal Defeitos cardíacos e do brotamento vascular. Retardo na diferenciação das células endoteliais
VEGFR-1	Vasculogênese	Desordem no acoplamento das células endoteliais levando a vasos grandes e deformados
VEGFR-2	Vasculogênese	Células endoteliais indiferenciadas resultam em vasos anômalos e falha na vasculogênese
VEGFR-3	Vasculogênese	Brotamento, organização e remodelamento anormais
Ang1	Angiogênese	Falha na angiogênese do tubo neural. Deficiência no remodelamento vascular e estruturação do coração
Ang2	Maturidade	Deficiência na integridade da parede vascular levando a edema e hemorragia.
Tie-1	Maturidade	Deficiência na integridade da parede vascular levando a edema e hemorragia.
Tie-2	Angiogênese	Deficiência no remodelamento vascular e estruturação do coração. Falha na angiogênese do tubo neural.
Neu-1	Angiogênese	Inadequado desenvolvimento da rede vascular.

Quadro 9: Defeitos embrionários relacionados aos genes que controlam a angiogênese conforme o estágio de desenvolvimento.

Segundo Felmeden DC, Blann AD, Lip GYH. European Heart Journal 2003.

Papel do tecido adiposo

A fração vascular estromal representa uma população de células heterogêneas, incluindo as células endoteliais maduras da microvasculatura, que circundam os adipócitos no tecido gorduroso. Esta fração de células, além de originar os adipócitos, é fonte irrestrita de células pluripotentes como as hematopoiéticas e mesodérmicas que se diferenciam em células sanguíneas, osteogênicas, condrogênicas, miogênicas e até neurogênicas. Assim, as células endoteliais e adipócitos, além de terem a mesma célula progenitora, podem participar na neovascularização de tecidos isquêmicos. Estudos mostram que a habilidade das células da linhagem adiposa em diferenciarem-se em células endoteliais pode estar relacionada com o fato dos vasos sanguíneos existentes nos tecidos adiposos encontrarem-se num estado de relativa imaturidade em comparação com os vasos de outros tecidos. Esta maior plasticidade da linhagem de células adiposas permite que, além de serem capazes de se diferenciar em células adiposas ou em células endoteliais, as próprias células adiposas maduras possam se de-diferenciar e reverter ao estado de célula progenitora com capacidade de originar células endoteliais (figura 29) (58). Dentre os agentes promotores da angiogênese e inibidores da apoptose secretados pelas células da linhagem vascular estromal do tecido adiposo estão o *VEGF*, o *granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)*, *hepatocyte growth factor (HGF)*, *basic fibroblast growth factor*, o *transforming growth factor (TGF)* e a leptina. A presença de vários fatores de crescimento atuando de maneira sinérgica numa preparação retirada de tecido adiposo e liberada num tecido isquêmico pode ter vantagens sobre a liberação de um fator de crescimento isolado, visto que a angiogênese é um processo complexo orquestrado por vários agentes (59)(60). Isto tudo pode explicar porque células tronco derivadas de tecido adiposo, cultivadas *in vitro* e transplantadas em membros isquêmicos de animais promove angiogênese e recupera as lesões musculares (61). Dentre os tecidos gordurosos, o omento possui grande capacidade de produzir o VEGF (62) e é utilizado há anos como opção terapêutica cirúrgica para promover conexões vasculares, aliviar a isquemia, tratar infecções intratorácicas e reparação de defeitos em tecidos moles (63)(64)(65)(66)(67). Atualmente observa-se uma renovação das tentativas de utilizar o omento para auxiliar na cirurgia de revascularização miocárdica (68)(69) baseadas na sua biologia que envolve a presença das células vasculares estromais e a produção de fatores de crescimento.

Quantificação da expressão do vegf por imunoistoquímica

Pelo exposto até aqui, o VEGF exerce um papel central na formação de novos vasos sanguíneos por vasculogênese, angiogênese e arteriogênese além da recanalização

intraluminal de trombos venosos. Assim, a identificação do mesmo nos diversos tecidos pode ser utilizada como marcador de angiogênese (70)(71). A identificação de marcadores de vasos sanguíneos alcançou grande desenvolvimento no estudo de tumores, pois tem se demonstrado que a agressividade destes está associada a intensidade da angiogênese intratumoral (72). Conseqüentemente, muito do conhecimento sobre a quantificação da angiogênese advém de estudos oncológicos. O método quantitativo costumeiramente utilizado nestes estudos é a medida da microdensidade vascular que também pode ser usada para avaliação de tecidos não tumorais. Os vasos são marcados com anticorpos contra o endotélio e identificados por métodos imunoistoquímicos. Os anticorpos mais comumente usados são contra o fator VIII/fator de von Willebrand, contra CD31 (molécula de adesão endotélio-plaqueta 1, PECAM-1), contra CD34 e contra *lectin ulex europaeus agglutinin 1 (UEA 1)*. CD31 e CD34 são os mais sensíveis e específicos anticorpos contra o endotélio preparado com parafina e, por isso, são os mais usados. A determinação da microdensidade vascular é muito útil para quantificação mesmo sendo um método estático perante a angiogênese que é um processo dinâmico. Além desta, o método apresenta algumas outras dificuldades. É laboriosa e intrinsecamente subjetiva a medida que as áreas do tecido a serem analisadas são escolhidas pelo examinador. Além disso, as amostras dos tecidos a serem comparados devem ser retiradas de segmentos anatômicos similares, isso é, do mesmo local de biópsia, o que nem sempre é conseguido. Na tentativa de melhorar a representatividade das amostras, as áreas escolhidas para análise devem ser aquelas com uma maior concentração de marcadores (áreas chamadas como “hot spots”) localizáveis em campos de pequeno aumento (100 X). No caso da análise de neoplasias esta determinação se baseia no fato de que estas áreas devem representar o comportamento tumoral mais ativo (invasividade). A partir da identificação das áreas “hot spots” faz-se a contagem das células marcadas pelo anticorpo em campos de maior aumento (200 X ou mais). Habitualmente são considerados vasos sanguíneos qualquer célula ou agrupamento de células que ficam corados, independentes da presença ou não de luz vascular repletas de hemácias (73)(74). O método de contagem pode variar. Uma célula isolada ou um agrupamento de células (*clusters*) costumam ser considerados com “um ponto”. Vasos com paredes maiores, mesmo que corados, costumam não ser contados por serem considerados vasos antigos e não neo-formados (75). Os vasos podem ser contados e apresentados como pontos por milímetro quadrado (76), por campo de visão ou como pontos percentuais dentre o total de células presentes (77) (78). Para facilitar a contagem pode ser acopladas grades com áreas pré-definidas que permitem o cálculo do número de pontos por mm (como a contagem/escore de Chalkley) (79) ou algum outro método sistemático (75).

Câmaras fotográficas acopladas a softwares para edição e leitura das imagens podem ser usados para facilitação e padronização da contagem dos pontos (76)(72) (80) (81). Não obstante, é importante ressaltar, que o VEGF identificado durante os processos de formação de novos vasos sanguíneos não é exclusivamente expressado pelas células endoteliais. Uma série de outras células é capaz de produzir o mesmo: monócitos (82) (83), macrófagos (84) (85), mastócitos (86), linfócitos (87) células do estroma adiposo (59) dentre outras (88) . Estas células participam dos mecanismos envolvidos na formação de novos vasos. Desde modo, durante a angiogênese, a arteriogênese e a venogênese, as células identificadas que expressam o VEGF podem ser qualquer uma das acima citadas e não exclusivamente endoteliais como ocorre quando se quantifica a angiogênese com os marcadores do fator VIII, do CD31 e do CD34.

A imunistoquímica se baseia na detecção de substâncias teciduais por meio de anticorpos (89)(91)(92). Estes anticorpos podem ser obtidos mediante a imunização de animais de laboratório contra a proteína, o polissacarídeo, o ácido nucléico ou outro tipo de molécula que se deseja detectar, em cujo caso as imunoglobulinas são produzidas por vários clones de plasmócitos contra diferentes epitopos da molécula. Por este motivo, estes anticorpos são denominados policlonais. Outro método de produzir anticorpos consiste em fundir células imortais de um plasmocitoma com linfócitos B de um rato sensibilizado contra a substância que se deseja detectar. As células B fundidas resultantes são conhecidas como hibridomas. Como no laboratório são isoladas colônias celulares (clones) nas fases iniciais, cada uma delas proveniente de uma única célula, os anticorpos produzidos são denominados monoclonais, Na imunistoquímica, sobre um corte histológico, faz-se atuar uma solução com a imunoglobulina (anticorpo) capaz de se unir especificamente ao componente do tecido que se pretende demonstrar (o antígeno). Em seguida, a preparação é lavada a fim de eliminar desta todas as moléculas do anticorpo não ligadas ao seu antígeno. Obviamente, os anticorpos que permanecem ligados ao antígeno não são visíveis por si mesmos. Para que isto ocorra, é necessário empregar-se sistemas de visualização, habitualmente do tipo enzimático, embora também sejam utilizadas substâncias fluorescentes ou elétron-densas para a microscopia eletrônica. No sistema de marcação direta se liga uma enzima, fluorocromo ou metal pesado ao anticorpo. Este sistema é de baixa sensibilidade e por isso tem uso restrito. No sistema de marcação indireta de um passo aparece o conceito de anticorpo primário e secundário. O primeiro é dirigido contra a proteína que se deseja detectar e, o secundário, um anticorpo contra o anticorpo primário, marcado enzimaticamente. Isto aumenta a sensibilidade do método e facilita o trabalho uma vez que, para vários anticorpos primários, se emprega o

mesmo secundário (por exemplo: para todos os anticorpos primários monoclonais produzidos por hibridomas de rato pode-se utilizar um mesmo anticorpo secundário anti-imunoglobulinas de rato, produzido imunizando-se um coelho ou uma cabra (figuras 30 e 31). O desenvolvimento dos sistemas do tipo peroxidase-antiperoxidase permite um grande aumento na sensibilidade do método. Nestes sistemas, depois de se incubar com o anticorpo primário, emprega-se um anticorpo secundário em excesso que servirá de ponte entre o primeiro e um complexo da enzima peroxidase com o anticorpo antiperoxidase produzidos no mesmo animal que o anticorpo primário para que o secundário possa agir como ponte. O sistema ABC se baseia no uso das lecitinas (substâncias de estrutura polissacarídea obtida de vegetais, bactérias, leite e ovos) capazes de se ligar com extraordinária afinidade. Para empregá-los, liga-se a biotina a anticorpos secundários e depois incuba-se o tecido com um complexo de avidina (mais recentemente streptavidina, produzida pelo estreptococos, mais específica) marcada com peroxidase. Esta irá se aderir de um modo específico ao tecido alvo. As marcações com a enzima peroxidase são reveladas com diaminobenzidina (DAB), que permanece incolor e estável em solução até ser oxidada pelo oxigênio oriundo da degradação do peróxido de hidrogênio por ação da peroxidase, depois do que se precipita como seu derivado de coloração marrom ou parda que é identificada na microscopia.

1 OBJETIVO DO TRABALHO

Considerando (a) a necessidade do sistema circulatório de abrir colaterais ou criar novos vasos quando se defronta com obstruções ao fluxo sanguíneo em qualquer dos seus segmentos, (b) considerando que o *VEGF* participa, a nível molecular, dos mecanismos envolvidos principalmente na angiogênese e na arteriogênese pós oclusão arterial, (c) considerando que o tecido adiposo representa um tecido com alto potencial angiogênico, (d) considerando que é possível identificar a expressão do VEGF nas células que o expressam através de métodos imunistoquímicos e (e) considerando que são poucas as informações existentes na literatura sobre o comportamento do *VEGF* no surgimento de novos vasos ou colaterais que ocorrem após a obstrução venosa, o presente estudo visou medir e comparar a expressão do *VEGF* no tecido adiposo de ratos (omento) submetidos à oclusão arterial e à oclusão venosa (figura 32). A mensuração da expressão do *VEGF* foi feita através da contagem de células marcadas imunistoquimicamente pelo anticorpo contra o *VEGF* expressado nas diversas células após o desencadeamento dos estímulos para a sua produção.

2 HIPÓTESES

H0 (Hipótese nula): a expressão do VEGF no omento de ratos, identificada pela contagem de células imunoistoquimicamente marcadas, não apresenta diferença quantitativa após a ligadura da aorta infra-renal e após a ligadura da veia cava infra-renal.

H1 (Hipótese alternativa): a expressão do VEGF no omento de ratos, identificada pela contagem de células imunoistoquimicamente marcadas, apresenta diferença quantitativa após a ligadura da aorta infra-renal e após a ligadura da veia cava infra-renal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 TÉCNICA CIRÚRGICA

Após aprovação do comitê de normas e de ética na pesquisa da instituição, vinte e dois ratos machos *Wistar* com peso médio de 415g foram randomizados para ligadura da aorta infrarenal (11 ratos) e para ligadura da veia cava infrarenal (11 ratos). A indução anestésica foi feita com Halotano inalado em campânula de grande volume (figura 33) e a anestesia foi feita com Tiletamina + Zolazepam (Zoletil, Virbac 50mg/ml) na dose de 0,2ml/100g intraperitonealmente com agulha 25x7 (figura 34). Antissepsia do abdome foi feita com clorexidina 0,2% em spray.

Os vasos foram abordados através de laparotomia mediana. Após a eventração das vísceras intra-abdominais o retroperitônio foi exposto e dissecado com tesoura e cotonetes para exposição da aorta e da cava infrarenais (figuras 35 e 36). Prosseguiu-se a dissecação romba para separar adequadamente um vaso do outro de modo que a clipagem de um não distorcesse o outro prejudicando o fluxo sanguíneo do vaso vizinho. Após o a dissecação da aorta e da cava e exposição completa das mesmas sorteava-se qual vaso seria ocluído.

A oclusão das aortas e das cavas foi feita com clips de polímero não absorvíveis Hem-o-lok (*Weck Closure Systems Research – USA*) de 10mm aplicados com pinça específica (figura 37). Após a aplicação do clip verificava-se a completa oclusão do vaso escolhido e a não interferência por distorção ou pinçamento concomitante do fluxo sanguíneo no vaso vizinho. A utilização do clip apresentou a vantagem de uniformizar o modo de oclusão, pois o segmento ocluído apresentava sempre a mesma extensão e localização além de ser mais seguro no que se refere a evitar sangramentos pois a manipulação dos vasos é menor. A laparorráfia foi feita com fio de Mononylon 4-0 em sutura contínua em dois planos. O tempo cirúrgico foi em torno de 20 a 30 minutos em todos os animais. Analgesia pós-operatória foi feita com Butorphanol (Torbugesic, Fort Dodge) 1mg/Kg subcutaneamente e com agulha 25x7. Os cuidados pós-operatórios de alojamento, nutrição, hidratação, analgesia e controle de stress foram realizados conforme as normas nacionais de cuidados com animais de experimentação e as normas do Laboratório de Fisiologia da Fundação Universidade de Caxias do Sul.

No 5º dia de pós-operatório um dos animais do grupo de oclusão da veia cava faleceu sendo excluído da pesquisa. No décimo dia de evolução pós-operatória os animais sofreram eutanásia pelo uso de Halotano inalatório e Pentobarbital (100mg/kg) intraperitonealmente com agulha 25x7. Através de relaparotomia e toracotomia anterior removeram-se segmentos do omento, da gordura retroperitoneal, do músculo ílio-psoas direito, do diafragma e o rim direito, o fígado, os pulmões e o coração. O omento foi retirado em bloco seccionando-se as inserções no estômago, no cólon e no baço. Um dos animais do grupo de oclusão da aorta foi excluído pela suspeita do clip não ter ocluído adequadamente o vaso. Foram encaminhados para análise, então, dez animais em cada grupo. Considerando-se as duas exclusões o peso médio dos animais foi de 412g.

3.2 IMUNOISTOQUÍMICA

As peças foram conservadas em formol 10% tamponado e posteriormente emblocadas na parafina (histotécnico, álcool absoluto, xilol, parafina, 60°C). Posteriormente, cortes de aproximadamente 5 micras foram obtidos para serem submetidos a imunoistoquímica. Para realização desta, primeiramente procedeu-se a desparafinização das lâminas em xilol e álcool com graduação decrescente (xilol duas vezes, álcool duas vezes para cada graduação de 100%, 70%, 50% e água destilada). Em seguida procedeu-se a recuperação antigênica colocando-se as lâminas em meio tampão de citrato com pH = 6.0 em banho-maria a temperatura de 95°C. Após, realizou-se o bloqueio da peroxidase com peróxido de hidrogênio a 5% (peróxido de hidrogênio 5ml + álcool metílico 95ml). Reações “inespecíficas” foram bloqueadas com lecitina (5g de leite em pó Glória + 95ml de tampão PBS). Procedeu-se a mais uma lavagem das lâminas com tampão PBS. Após esta lavagem aplicou-se o anticorpo primário, anti-VEGF de coelho (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA) e deixou-se em repouso na geladeira em câmara úmida “overnight”. Mais uma lavagem com tampão PBS. A seguir aplicou-se o primeiro anticorpo secundário biotina (Biotinylated Link Universal; Dako Cytomation LSAB + System-HRP) e deixou-se a lâmina em repouso por vinte minutos. Após, nova lavagem com tampão PBS seguida da aplicação de segundo anticorpo secundário streptavidina (Streptavidin-HRP; Dako Cytomation LSAB) e novo repouso por vinte minutos. Mais uma lavagem com tampão PBS foi realizada. Após esta, realizou-se a aplicação de diaminobenzidina (DAB substrate – Chromogen System) por dez minutos para revelação, seguida de nova lavagem em água corrente. Após, realizou-se a

contra-coloração com hematoxilina por trinta segundos, lavagem em água corrente e aplicação de álcool com graduação crescente (uma vez a 50%, uma vez a 70% e duas vezes à 100%) e xilol (duas vezes) para clarificação.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO VEGF E CONTAGEM DE CÉLULAS

Os fragmentos de omento foram retirados do mesmo local em todos os animais de experimentação, sendo que a presença de tecido pancreático visível na mesma lâmina comprovando a mesma localização, foi possível na grande maioria. As lâminas foram analisadas primeiramente com um aumento de 100 X para procura de áreas “hot spots” ou altamente corada (figura 38). Cinco destas áreas foram escolhidas por patologista experiente para contagem das células em aumento de 400 X do seguinte modo: cada célula corada ou cada “cluster” de células coradas equivaleram a 1 ponto (figura 38). Os campos escolhidos, cinco de cada animal de experimentação, foram fotografados e colocados, na tela de computador, sob uma grade quadriculada para contagem. Muitos campos não apresentavam áreas “hot spots” mas foram escolhidos para interarem o número de cinco por cada animal de experimentação. Não nos restringimos apenas a contagem de células endoteliais, visto que a expressão do VEGF pode se dar num grande número de células (59)(73)(74)(82)(83)(84)(85)(86)(87)(88) que participam do processo de formação de novos vasos (angiogênese) ou de colateralização (arteriogênese ou venogênese). Toda célula que apresentava coloração marrom no citoplasma foi considerada como expressando o VEGF. Cada campo representou um dado número de pontos que foram levados em conta para os cálculos. Considerou-se a média aritmética de pontos dentre os cinco campos como representativa de cada animal de experimentação. Comparou-se, então, os pontos obtidos nos animais submetidos à oclusão da artéria aorta com os pontos obtidos nos animais submetidos à oclusão da veia cava. .

As figuras 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 e 47 são exemplos do que se observou no trabalho. Ao verificarmos estas lâminas, observamos a variação de quantidade de células coradas em cada campo (densidade), a existência de células isoladas, a existências de células aglomeradas (“clusters”), a presença de vasos sanguíneos com células coradas e vasos sanguíneos sem células coradas em suas paredes, além das células adiposas

3.4 DELINEAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Este trabalho foi um estudo experimental, randomizado, cego com animais de laboratório (ratos *Wistar*). Dois grupos foram formados diferindo um do outro exclusivamente pela intervenção realizada. Em dez animais procedeu-se a ligadura da aorta abdominal infra-renal e em dez animais procedeu-se à ligadura da veia cava infra-renal. Os dados obtidos foram classificados como oriundos de variáveis quantitativas contínuas (número de células coradas por campo de microscópio) e não apresentando distribuição normal. Por estas razões, o teste estatístico escolhido foi o Mann-Whitney.

Alfa e beta escolhidos foram 0,05 e 0,2 respectivamente. O tamanho da amostra foi estimado a partir da suposição do número de células coradas que poderiam apresentar importância clínica quando houvesse diferença entre os dois grupos pois se desconhecia o desvio padrão da população. Considerou-se que este valor estaria em torno de 8 (diferença entre a média dos dois grupos). Esta estimativa, concomitantemente com a observação do tamanho da amostra de alguns outros trabalhos experimentais onde se mediu a densidade vascular (77)(90), levou-nos a concluir que uma amostra com 10 a 12 animais seria adequada. Na realização dos cálculos foi utilizado os programas SPSS 13.0, Stats Direct e Excel.

4 RESULTADOS

Na tabela 1 está sumarizada a contagem das células obtidas em cada amostra bem como as medianas e os percentis interquartis resultantes de cada uma delas. A dispersão dos dados está representada no gráfico 1.

Tabela 1 Resultados com o número de células em cada amostra, medianas e percentis.

Grupo	Am1	Am2	Am3	Am4	Am5	Mediana (Perc 25-75)
Cava	8	20	12	5	23	12,0 (6,5-21,5)
Cava	12	3	9	8	16	9,0 (5,5-14,0)
Cava	3	27	20	18	4	18,0 (3,5-23,5)
Cava	14	16	27	23	14	16,0 (14,0-25,0)
Cava	0	0	0	0	1	0 (0-0,5)
Cava	0	0	0	0	1	0 (0-0,5)
Cava	5	8	7	5	5	5,0 (5,0-7,5)
Cava	4	4	2	2	7	4,0 (2,0-5,5)
Cava	0	0	1	0	0	0 (0-0,5)
Cava	4	5	0	0	0	4,0 (0-10,0)
Total	4,0 (0-9,0)	4,5 (0-17,0)	4,5 (0-14,0)	3,5 (0-10,5)	4,5 (0,75-14,5)	7,1 (5,5-8,0)
Aorta	4	10	33	16	9	10,0 (6,5-24,5)
Aorta	2	4	0	0	15	2,0 (0-9,5)
Aorta	3	3	4	8	11	4,0 (3,0-9,5)
Aorta	0	1	2	16	1	1,0 (0,5-9,0)
Aorta	18	6	5	10	15	10,0 (5,5-16,5)
Aorta	23	22	0	4	4	4,0 (2,0-22,5)
Aorta	3	0	0	0	0	0 (0-1,5)
Aorta	1	0	0	0	0	0 (0-0,5)
Aorta	0	0	0	0	1	0 (0-0,5)
Aorta	0	3	0	0	0	0 (0-1,5)
Todos	2,5 (0-7,5)	3,0 (0-7,0)	0 (0-4,25)	2,0 (0-11,5)	2,5 (0-12,0)	5,4 (4,6-5,5)

Dados apresentados com mediana e percentis interquartis (25% e 75%): grupo 1 – oclusão da veia cava infrarenal, grupo 2 – oclusão da aorta infrarenal; amost = amostras (1, 2, 3, 4 e 5) dos omentos retirados de cada animal;

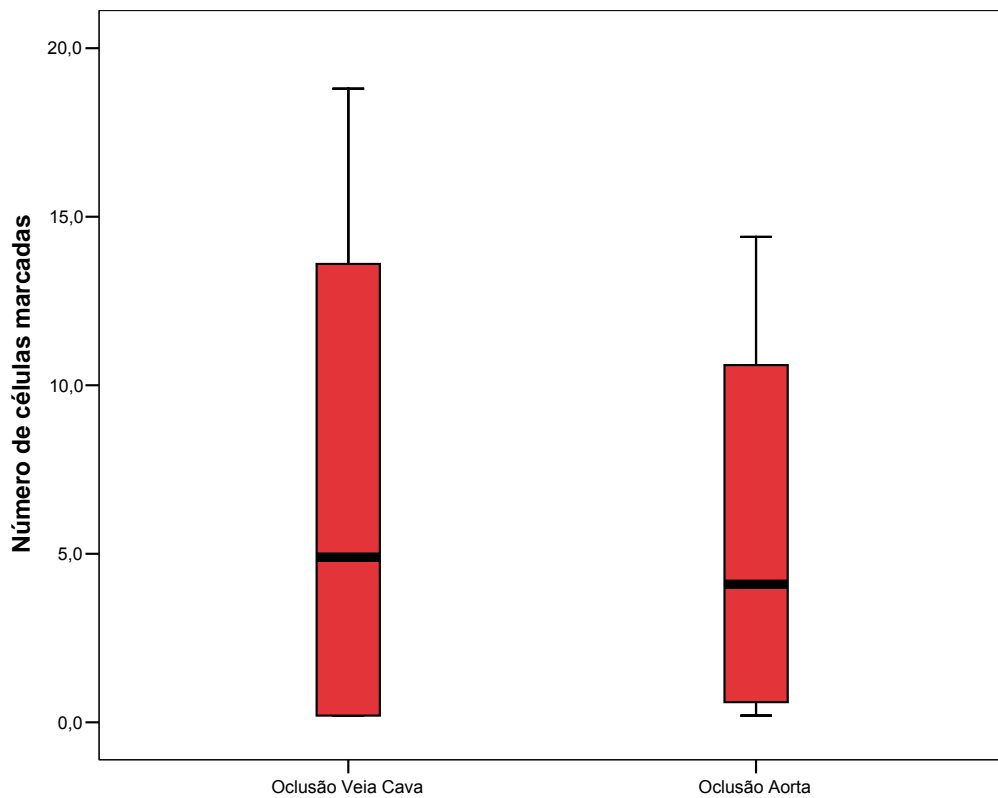


Figura 1: Número de células marcadas entre os grupos (média de 5 amostras).

Houve a perda de um animal no grupo da aorta e um animal no grupo da cava.

A mediana no grupo oclusão da veia cava foi 7,1 e no grupo oclusão da aorta foi de 5,4. Não houve diferença estatisticamente significativa, $P = 0,53$.

Houve 15 campos no grupo da cava e 20 campos no grupo da aorta que não apresentaram nenhuma célula corada expressando o VEGF. Ao analisarmos os campos com células coradas e dividindo os mesmos, arbitrariamente, em grupos foi observado o seguinte. No grupo da oclusão da aorta houve 20 campos apresentando entre 1 e 10 células coradas, 7 campos apresentando entre 11 e 20 células coradas e 3 campos apresentando mais de 20 células coradas. No grupo da oclusão da veia cava houve 22 campos apresentando entre 1 e 10 células coradas; 9 campos apresentando entre 11 e 20 células coradas e 4 campos apresentando mais de 20 células coradas.

5 DISCUSSÃO

Considerando-se a “circularidade” do sistema circulatório e os mecanismos da vasculogênese, da angiogênese e da arteriogênese, é perfeitamente compreensível que o resultado confirmando a hipótese nula e negando a hipótese alternativa ($P 0,53$), ou seja, a expressão do VEGF pela contagem de células no omento de ratos após a oclusão da aorta e após a oclusão da cava infra-renais não são diferentes. Mesmo que existam diferenças estruturais, funcionais e embriológicas importantes entre os sistemas arterial e venoso (2)(3)(4)(5), pela necessidade primeira de se manter o fluxo sanguíneo constante (2) é plausível aceitar que, a nível molecular, na situação de obstrução ao fluxo sanguíneo, os mecanismos que o organismo utiliza para suplantar a obstrução tanto a nível arterial quanto a nível venoso sejam semelhantes em magnitude. Assim, o lado arterial quando se depara com uma obstrução ao fluxo sanguíneo apresenta uma resposta quantitativamente similar a resposta apresentada pelo lado venoso quando obstruído no que tange a expressão do VEGF.

O valor do desvio padrão encontrado (**6,8** para o grupo da cava e **5,1** para o grupo da aorta), determinou que, para este tamanho de amostra, o poder do estudo fosse de somente 7%. No planejamento inicial estimou-se que uma diferença entre as medianas dos dois grupos em torno de 8 células poderia ser alcançada e caracterizada como de importância clínica. Aceitando esta estimativa para a mediana e um desvio padrão também estimado em torno de 6 teríamos, para a amostra de 22 ratos, um poder de 80%. Após o estudo, mesmo com o desvio padrão encontrado sendo igual ao estimado no planejamento, a diferença entre as medianas dos grupos sendo de apenas 1,7 alterou de modo bastante significativo o poder do estudo. Assim, consideramos que o cálculo feito para o tamanho da amostra baseado nesta estimativa mostrou-se inadequado. Talvez um projeto piloto apontando uma estimativa diferente da que imaginamos pudesse ter sido útil para evitar esta situação. Uma amostra maior poderia determinar um poder de estudo maior.

A opção de não incluir um grupo controle para comparação se deveu ao fato de que, na literatura, já existem suficientes evidências de que a expressão do VEGF é diferente quando existe a oclusão arterial (20)(25)(37).

Esperávamos uma quantidade maior de células coradas por campo. Achemos pequena a quantidade de células que se marcaram imunoistoquimicamente. Os fatores que contribuíram para este achado podem ter afetado os resultados do trabalho.

O VEGF é considerado como a principal molécula envolvida com os processos de angiogênese, arteriogênese e venogênese (48)(49)(55)(56). Ele é expressado por várias células que também participam destes processos (59)(73)(74)(82)(83)(84)(85)(86)(87)(88). Sendo assim, a quantificação da expressão do VEGF nestas situações deve considerar a presença de todas as células marcadas imunoistoquimicamente que se apresentam no campo e não somente as células endoteliais específicas de vasos sanguíneos. A contagem destas células apresenta uma dificuldade importante. As células que expressam o VEGF tem coloração marrom em seu citoplasma. Nas lâminas é muito comum o aglomeramento de células (ou “clusters”) fazendo que, pela proximidade, seja difícil determinar os limites de cada uma. Assim torna-se difícil quantificar com exatidão o número de células marcadas imunoistoquimicamente. Muitos trabalhos tentam amenizar este viés de mensuração considerando cada “cluster” de células como sendo uma célula apenas. Isto simplifica a contagem e ameniza o problema se aplicarmos o mesmo critério para todos os campos observados. O viés permanece, todavia, em algum grau, pois, neste método, não existe diferença entre um “cluster” formado por muitas células e um “cluster” formado por poucas células. A existência desta situação pode ter contribuído para os resultados.

A medida que o estímulo para a formação de novos vasos sanguíneos, ou para a abertura de colaterais quiescentes surge, inicia-se imediatamente a expressão gênica do VEGF. Isto começa a ocorrer já na primeira hora após o estímulo desencadeante sendo o período até o sétimo dia caracterizado como aquele onde há a maior produção dos fatores de crescimento. A partir deste momento começa ocorrer uma diminuição da produção destes apesar de que a formação de endotélio persiste até além dos 240 dias (neointima) (28)(29). Nos pareceu razoável imaginar que no décimo dia após a oclusão da aorta ou da veia cava infra-renais, o momento escolhido para retirada dos omentos, ainda teríamos uma expressão significativa do VEGF. Não podemos descartar, todavia, que a expressão do VEGF pelas células estivesse em fase de remissão e que, por isso, as células expressando o VEGF não se marcaram imunoistoquimicamente do modo adequado em algumas lâminas determinando alteração do resultado.

O tecido adiposo é considerado como tendo um grande potencial angiogênico pela presença de células capazes de se diferenciar e de se de-diferenciar em células que originam vasos sanguíneos (58)(59)(60)(61)(62) . Além disso, o tecido conjuntivo que permeia os adipócitos, pode servir como interstício para o desenvolvimento da angiogênese, da arteriogênese e da venogênese dando sustentação estrutural para estes vasos. Assim é razoável imaginar que o omento, por estar relacionado anatomicamente a aorta e a cava infra-renais, se

constituísse no tecido apropriado para a mensuração da expressão do VEGF em nosso estudo. Todavia, os resultados observados, principalmente o baixo número de campos com células expressando o VEGF, sugere, ao nosso ver, que um viés de seleção do segmento de omento para análise possa ter ocorrido. Esta idéia é reforçada pela presença de alguns campos com uma grande concentração de células expressando o VEGF. A escolha dos segmentos peri-pancreáticos feita para balizar os mesmos locais para análise dos campos microscópicos pode ter sido inadequada e ter permitido que as maiores concentrações de células expressando o VEGF tenham ficado em outros locais.

Por fim é importante salientar que a maioria das evidências existentes na literatura se referem a situações onde ocorreu a oclusão arterial. Quase nada foi estudado em situações onde existem obstruções venosas. Nosso trabalho demonstrou que a expressão do VEGF quando há oclusão venosa não é menor do que com oclusão arterial.

Como conclusão final destacamos que a análise dos dados do presente estudo permite concluir que a expressão do VEGF, quando analisada pela contagem de células imunoistoquimicamente marcadas, não apresentou diferença significativa entre o grupo da ligadura da veia cava infra-renal e o grupo da ligadura da aorta infra-renal. Estudos futuros com amostras maiores são necessários para melhor avaliar o processo de venogênese e sua relação com o VEGF.

REFERÊNCIAS

1. GOTTSCHALL, Cam. **Dinâmica Cardiovascular: do miócito à maratona**. São Paulo: Atheneu, 2005.
2. BURTON, AC. **Relation of structure to function of the tissues of the wall of blood vessels**. *Physiology Review*, 1954. 34:619-42.
3. BURTON, AC. **Fisiologia e Biofísica da Circulação**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978.
4. JAIN, RK. **Molecular regulation of vessel maturation**. *Nature Medicine*, 2003. 9(6): 685-93.
5. OPIE, L. **Heart Physiology**. From Cell to Circulation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
6. KOERSELMAN, J. et al. **Coronary Collaterals**. An Important and Underexposed Aspect of Coronary Artery Disease. *Circulation*, 2003. 107:2507-11.
7. HELISCH, H, SCHAPER, W. **Arteriogenesis**: The development and growth of collateral arteries. *Microcirculation*, 2003. 10:83-97.
8. SONIN, AH.; MAZER, MJ.; POWERS, TA. **Obstruction of the inferior vena cava: a multiple-modality demonstration of causes, manifestations and collateral pathways**. *RadioGraphics*, 1992. 12:309.
9. BROWN, JJ.; NAYLOR, Mj.; YAGAN, N. **Upper-Extremity Deep Vein Thrombosis**. *Circulation*, 2002. 106:1874-80.
10. DE GAETANO, AM. et al. **Cavernous transformation of the portal vein: patterns of intrahepatic and splanchnic collateral circulation detected with Doppler sonography**. *American Journal of Roentgenology*, 1995. 165:1151-55.
11. GENTA, PR. et al. **Pulmonary vein thrombosis after bilobectomy and development of collateral circulation**. *Thorax*, 2003. 58:550-2.
12. FULLER, JF. et al. **Retinochoroidal Collateral Veins Protect Against Anterior Segment Neovascularization After Central Retinal Vein Occlusion**. *Archives of Ophthalmology*, 2003. 121:332.
13. WALTHAM, M. et al. **Vascular endothelial growth factor naked DNA gene transfer enhances thrombus recanalization and resolution**. *Journal Vascular Surgery*, 2005. 42:1183-89.

14. LABROPOULUS, N. et al. **Early Thrombus Remodeling of Isolated Calf Deep Vein Thrombosis**. European Journal Vascular Endovascular Surgery, 2002. 23:344-48.
15. FELMEDEN, DC.; BLANN, AD.; LIP, GYH. **Angiogenesis**: basic pathophysiology and implications for disease. European Heart Journal, 2003. 24:586-603.
16. PAPETTI, M.; HERMAN, IM. **Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis**. American Journal of Physiology and Cellular Physiology, 2002. 282:C947-70.
17. CARMELIET, P.; JAIN, RK. **Angiogenesis in cancer and other diseases**. Nature, 2000. 407:249-57.
18. CARMELIET, P. **Mechanism of Angiogenesis and Arteriogenesis**. Nature Medicine, 2000. (3); 389-95.
19. RUSIECKA, E.; BANACH, M.; DROZDZ, J. **The cardiologists' dream may come true – vascular therapy**. Archives Medical Science, 2005. 1, 4:187-94.
20. SCHAPER, W., SCHOLZ, D. Factors **Regulating Arteriogenesis**. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2003. 23:1143-51.
21. RISAU, W. **Mechanisms of angiogenesis**. Nature, 1997. 386:671-74.
22. CARMELIET, P. **Manipulating angiogenesis in medicine**. Journal of Internal Medicine, 2004. 255:538-61.
23. BUSCHMANN, I. et al. **Influence of Inflammatory Cytokines on Arteriogenesis**. Microcirculation, 2003. 10:371-79.
24. LOSORDO, D.; DIMMELER, S. **Therapeutic Angiogenesis and Vasculogenesis for Ischemic Diseases**. Part I: Angiogenesis Cytokines. Circulation, 2004. 109: 2487-91.
25. TABIBIAZAR, R.; ROCKSON, SG. **Angiogenesis and the ischemic heart**. European Heart Journal, 2001. 22:903-18.
26. GUPTA, K.; ZHANG, J. **Angiogenesis: a curse or cure**. Postgraduate Medical Journal, 2005. 81:236-42.
27. HEIL, M. et al. **Arteriogenesis versus angiogenesis**: similarities and differences. Journal Cellular and Molecular Medicine, 2006. 10:45-55.

28. SCHOLZ, D. et al. **Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis)**. Virchows Archives, 2000. 436:257-70.
29. HEILMAN, C.; BEYERSDORF, F.; LUTTER, G. **Collateral Growth: cells arrive at the construction site**. Cardiovascular Surgery, 2002. 10(6):570-78.
30. HEIL, M.; SCHAPER, W. **Influence of Mechanical, Cellular and Molecular Factors on Collateral Artery Growth (Arteriogenesis)**. Circulation Research, 2004. 95:449-58.
31. BERRA, E.; GINOUVÈS, A.; POUYSSÉGUR, J. **The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signaling**. EMBO reports, 2006. 7(1):41-5.
32. WALTER, DH.; DIMMELER, S. **Endothelial Progenitor Cells: Regulation and Contribution to Adult Neovascularization**. Herz, 2002. 27:579-88.
33. SZMITKO, PE. et al. **Endothelial Progenitor Cells**. New Hope for a Broken Heart. Circulation, 2003. 107:3093-100.
34. RABELINK, TJ. et al. **Endothelial Progenitor Cells: More Than an Inflammatory Response?** Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2004. 24:834-38.
35. TEPPER, OM. et al. **Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation and tubulization of circulating bone marrow-derived cells**. Blood, 2005. 105:1068-77.
36. KINNAIRD, T. et al. **Bone Marrow-Derived Cells for Enhancing Collateral Development**. Mechanisms, Animal Data, and Initial Clinical Experiences. Circulation Research, 2004. 95:354-63.
37. BUSCHMANN, I.; SCHAPER, W. **Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessels Growth**. News Physiology Science, 1999. 14:121-25.
38. SIMONS, M. **Integrative signaling in angiogenesis**. Molecular and Cellular Biochemistry, 2004. 264:99-102.
39. VAN BEMMELEN, OS. et al. **Functional status of deep venous system after an episode of deep venous thrombosis**. Annals of Vascular Surgery, 1990. 4:455-59.
40. MASUDA, EM.; KISTNER, RL.; FERRIS, EB. 3rd. **Long-term effects of superficial femoral vein ligation: thirteen-year follow-up**. Journal of Vascular Surgery, 1992. 16(5):741-49.

41. KILLEWICH, LA. et al. **Pathophysiology of venous claudication**. Journal of Vascular Surgery, 1984. 1(4):507-11.
42. BAYRAKTAR, Y.; HARMANCI, O. **Etiology and consequences of thrombosis in abdominal vessels**. World Journal of Gastroenterology, 2006. 12(8):1165-74.
43. PAQUET, KJ. **Causes and pathomechanisms of oesophageal varices development**. Med Sci Monit, 2000. 6(5):915-28.
44. TAO, L.; YANG, Z. **Research progress of vasculopathy in portal hypertension**. World Journal of Gastroenterology, 2005. 11(39):6079-84.
45. MODARAI, B. et al. **The role of neovascularisation in the resolution of venous thrombus**. Thrombosis and Haemostasis, 2005. 93:801-9.
46. MODARAI, B. et al. **Endothelial Progenitor Cell Are Recruited Into Resolving Venous Thrombi**. Circulation, 2005. 11:2645-53.
47. DEADRICK, KB. et al. **Vein wall remodeling after deep vein thrombosis involves matrix metalloproteinases and late fibrosis in a mouse model**. Journal of Vascular Surgery, 2005. 42:140-8.
48. KIMURA, R. et al. **Vascular Endothelial Growth Factor Antagonist Reduces Brain Edema Formation and Venous Infarction**. Stroke, 2005. 36:1259-63.
49. NOMA, H. et al. **Pathogenesis of macular edema with branch retinal vein occlusion and intraocular levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6**. American Journal of Ophthalmology, 2005. 140(2):256-61.
50. HOWDIESHELL, TR. et al. **Normoxic wound fluid contains high levels of vascular endothelial growth factor**. Annals of Surgery, 1998. 228(5):707-15.
51. NACHTSHEIM, R. et al. **The peritoneal cavity is a distinct compartment of angiogenic molecular mediators**. Journal of Surgical Research, 2006. 134(1):28-35.
52. MAJNO, G.; JORIS, I. **Cells, Tissue and Disease**. Principles of General Pathology, 1996. Blackwell Science.
53. CARMELIET, P. **Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases**. Nature Review, 2003. 4:711-20.
54. GOODSSELL, DS. **The Molecular Perspective: VEGF and Angiogenesis**. Stem Cells, 2003. 21:118-9.

55. FERRARA, N. **Vascular Endothelial Growth Factor**: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Reviews*, 2004. 25:581-611.
56. FERRARA, N. **Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis**. *American Journal of Physiology and Cell Physiology*, 2001. 280:C1358-66.
57. ZACHARY, I. **VEGF signaling**: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochemical Society Transactions* , 2003. 31: 1171-7.
58. PLANAT-BERNARD, V. et al. **Plasticity of Human Adipose Lineage Cells Toward Endothelial Cells**. *Physiological and Therapeutics Perspectives. Circulation*, 2004. 109:656-63.
59. REHMAN, J. et al. **Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stroma Cell**. *Circulation*, 2004, 109:1292-8.
60. BOULOUMIÉ, A. et al. **The Product of Ob Gene, Promotes Angiogenesis**. *Circulation Research*, 1998. 83:1059-66.
61. MOON, MH. et al. **Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse modelo of hindlimb ischemia**. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2006. 17(5-6):279-90.
62. ZHANG, QX. et al. **Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum**: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. *Journal of Surgery Research*, 1997. 67(2):147-54.
63. VINEBERG, A.; PIFARRE, R.; MERCIER, C. **An operation designed to promote the growth of new coronary arteries, using a detached omental graft**: a preliminary report. *Canadian Medical Association Journal*, 1962. 86:1116-8.
64. TURUNEN, M. et al. **Revascularization of the heart muscle following the transposition of the spleen and omentum into the thoracic cavity; experimental study on dogs**: preliminary report. *Annales Medicinae Experimentalis et Biologiae Fenniae*, 1957. 35(2):210-13.
65. GOLDSMITH, HS. et al. **Lipid angiogenic factor from omentum**. *JAMA*, 1984. 252:2034.
66. SHRAGER, JB. et al. **Omentum is highly effective in the management of complex cardiothoracic surgical problems**. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2003. 125:526-32.
67. MASUDA, T.; FURUE, M. **Novel Strategy for Soft Tissue Augmentation Based on Transplantation of Fragmented Omentum and Preadipocytes**. *Tissue Engineering*, 2004. 10(11/12):1672-83.

68. UHEYAMA, K. et al. **Development of biologic coronary artery bypass grafting in a rabbit model**: Revival of a classic concept with modern biotechnology. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2004. 127:1608-15.
69. TAHERI, AS. et al. **Myoangiogenesis after cell patch cardiomyoplasty and omentopexy in a patient with ischemic cardiomyopathy**. *Texas Heart Institute Journal*, 2005. 32(4):598-601.
70. TURNER, HE. et al. **Angiogenesis in Endocrine Tumors**. *Endocrine reviews*, 2003. 24(5):600-32.
71. USHIYAMA, T. et al. **Cytokine production in the infrapatellar fat pad**: another source of cytokines in knee synovial fluids, *Annals of Rheumatic Diseases*, 2003. 62:108-12.
72. GUO, L. et al. **Quantitative analysis of angiogenesis using confocal laser scanning microscopy**. *Angiogenesis*, 2001. 4:187-91.
73. UZZAN, B. et al. **Microvessel density as a Prognostic factor in Women with Breast Cancer**: A Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis. *Cancer Research*, 2004. 64:2941-55.
74. KIM, SW. et al. **Identification of angiogenesis in primary breast carcinoma according to the image analysis**. *Breast Cancer research and Treatment*, 2002. 74:121-9.
75. KATO, T. et al. **The methodology of quantification of microvessel density and prognostic value of neovascularization associated with long-term survival in Japanese patients with breast cancer**. *Breast Cancer Research and Treatment*, 1999. 53:19-31.
76. GODDARD, JC. et al. **Microvessel Density at Presentation Predicts Subsequent Muscle Invasion in Superficial Bladder Cancer**. *Clinical Cancer Research*, 2003. 9:2583-2586.
77. MORIMURA, M. et al. **Angiogenesis in adipose tissues and skeletal muscles with rebound weight-gain after diet restriction in rabbits**. *International Journal of Molecular Medicine*, 2001. 8:499-503.
78. VAN DER AUWERA, I. et al. **Increased Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Inflammatory versus Noninflammatory Breast Cancer by real-Time Reverse Transcriptase-PCR Gene Expression Quantification**. *Clinical Cancer Research*, 2004. 10:7965-71.
79. HANSEN, S. et al. **The prognostic Value of Angiogenesis by Chalkley Counting in a Confirmatory Study Design on 836 Breast Cancer Patients**. *Clinical Cancer Research*, 2000. 6:139-146.

80. GODDARD, JC. et al. **A computer image analysis system for microvessel density measurement in solid tumours.** *Angiogenesis*, 2002. 5:15-20.
81. HERBST, C. et al. **Evaluation of microvessel density by computerised image analysis in human renal cell carcinoma.** Correlation to pT category, nuclear grade, proliferative activity and occurrence of metastasis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1998. 124:141-7.
82. ROHDE, E. et al. **Blood Monocytes Mimic Endothelial Progenitor Cells.** *Stem Cells*, 2005. 24(2):357-67.
83. MELTER, M. et al. **Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promote angiogenesis in vivo.** *Blood*, 2000. 96(12):3801-8.
84. KIRIAKIDIS, S. et al. **VEGF expression in human macrophages is NF-KB-dependente:** studies using adenoviruses expressing the endogenous NF-KB inhibitor IKB alfa and a kinase-defective form of the IKB kinase 2. *Journal of Cell Science*, 2003. 116:665-74.
85. REHMAN, J. et al. **Peripheral Blood “Endothelial Progenitor Cells” Are Derived From Monocytes/Macrophages and Secrete Angiogenic Growth Factors.** *Circulation*, 2003. 107:1164-9.
86. HEISSIG, B. et al. **Low dose irradiation promotes tissue revascularization through VEGF release from mast cells and MMP-9- mediated progenitor cell mobilization.** *Journal of Experimental Medicine*, 2005. 202(6):739-50.
87. FREEMAN, MR.; SCHNECK, FX.; GAGNON, ML. **Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor:** a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Research*, 1995. 55:4140-5.
88. MAHARAJ, ASR. et al. **Vascular Endothelial Growth Factor Localization in the Adult.** *American Journal of Pathology*, 2006. 168:639-48.
89. DE ROBERTIS, EMF.; HIB, H.; PONZIO, R. **Biologia Celular e Molecular de De Robertis.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
90. DAVANI, S. et al. **Mesenchymal Progenitor Cells Differentiate into an Endothelial Phenotype, Enhance Vascular Density, and Improve Heart Function in a Rat Cellular Cardiomyoplasty Model.** *Circulation*, 2003. 108: II-253-8.
91. LODISH, H. et al. **Biologia Celular e Molecular.** Porto Alegre: Artmed, 2005.

92. ALBERTS. B et al. **Fundamentos da Biologia Celular**. Uma introdução à biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artmed, 1999.

ANEXO A – FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características diferenciais na estrutura dos vasos sanguíneos.....	49
Figura 2: Características funcionais dos vasos sanguíneos: variação da pressão, da velocidade, da secção transversa e da capacidade sanguínea ao longo da grande circulação.....	50
Figura 3: Composição da parede vascular de vasos nascentes e vasos maduros.....	51
Figura 4: Passos na formação e maturação da rede vascular durante a angiogênese.....	52
Figura 5: Origem das células da parede vascular e da matriz extracelular.....	53
Figura 6: A natureza “circular” do sistema circulatório.....	54
Figura 7: Mecanismos da angiogênese segundo Papetti M, Herman IM. Am J Physiol Cell Physiol 2002.....	55
Figura 8: Mecanismos celulares da angiogênese e da arteriogênese segundo Carmeliet P. Nature Medicine, 2000.....	55
Figura 9: Progenitores das células vasculares no embrião e no adulto.....	56
Figura 10: Mecanismos moleculares da angiogênese e da arteriogênese segundo Carmeliet P. Nature Medicine 2000.....	57
Figura 11: Mecanismos moleculares da angiogênese para estabilização ou regressão dos neovasos. Segundo Carmeliet P. J Inter Med 2004.....	58
Figura 12: Desencadeamento da vasculogênese, da angiogênese e da arteriogênese segundo Carmeliet P. Nature Medicine 2000.....	59
Figura 13: Mecanismos da angiogênese:	60
Figura 14: Esquema ilustrando o conceito e a característica principal da vasculogênese, da angiogênese e da arteriogênese.....	60
Figura 15: Esquema demonstrando o suprimento arterial duplo:	61
Figura 16: Seqüência temporal de eventos no desenvolvimento de circulação colateral:	62
Figura 17: Esquema demonstrando os eventos na arteriogênese em sua evolução temporal.	62
Figura 18: Esquema demonstrando o papel da disponibilidade de oxigênio na regulação do HIF e de suas ações.	63
Figura 19: Diagrama demonstrando o recrutamento de vasos pré-existentes na arteriogênese em coelhos.....	64
Figura 20: Diagrama demonstrando a proliferação de células musculares lisas e o remodelamento na parede do vaso na arteriogênese.....	64
Figura 21: Diagrama demonstrando a família do VEGF e seus receptores.....	65
Figura 22: Diagrama evidenciando as vias de sinalização do VEGF.....	66
Figura 23: Mecanismo para aumentar o desenvolvimento de circulação colateral pelas células progenitoras endoteliais.....	67

Figura 24: Integração entre os mecanismos da angiogênese e da arteriogênese.....	68
Figura 25: Mecanismos implicados na resolução do trombo venoso.	69
Figura 26: Representação da molécula do VEGF:.....	70
Figura 27: Papel do VEGF ligado à matriz extracelular na ramificação vascular.	71
Figura 28: Diagrama demonstrando a plasticidade da linhagem de células adiposas em se diferenciar em células endoteliais.....	72
Figura 29: Esquema representando diferentes procedimentos imunoistoquímicos.	73
Figura 30: Esquema ilustrativo do método peroxidase-antiperoxidase (PAP):.....	74
Figura 31: Circularidade do sistema cardiovascular:.....	75
Figura 32: Indução anestésica com Halotano.....	76
Figura 33: Anestesia com Tiletamina + Zolazepam.	76
Figura 34: Evisceração dos órgãos intra-abdominais após a laparotomia.	77
Figura 35: Retroperitônio antes (E) e após (D) a dissecação para exposição da aorta e da cava infrarenais.....	77
Figura 36: Clips vasculares ocluindo a veia cava infra-renal (acima) e a artéria aorta infra-renal (abaixo).	78
Figura 37: Esquema demonstrando as possibilidades de observação dos campos num aumento de 100 X.....	79
Figura 38: Campo demonstrando grande quantidade de células marcadas imunoistoquimicamente (citoplasma marrom) e tecido adiposo.....	79
Figura 39: Campo demonstrando a presença de várias células circundadas por tecido adiposo porém com somente uma delas marcada imunoistoquimicamente próxima ao centro.	80
Figura 40: Campo demonstrando praticamente somente células adiposas.	80
Figura 41: Outro campo demonstrando uma boa quantidade de células marcadas imunoistoquimicamente mas não tão aglomeradas, isso é, com uma melhor condição de contagem individual.	81
Figura 42: Campo demonstrando várias células porém poucas apresentando marcação imunoistoquímica.	81
Figura 43: Outro campo demonstrando a presença de várias células porém com poucas delas exibindo marcação imunoistoquímica.	82
Figura 44: Campo exemplificando apenas uma célula marcada imunoistoquimicamente próxima ao centro da lâmina.	82
Figura 45: Campo exemplificando um aglomerado de células (“clusters”) na parte central e superior da lâmina.	83
Figura 46: Campo onde aparece a parede de um vaso seccionado e com células marcadas imunoistoquimicamente.....	83

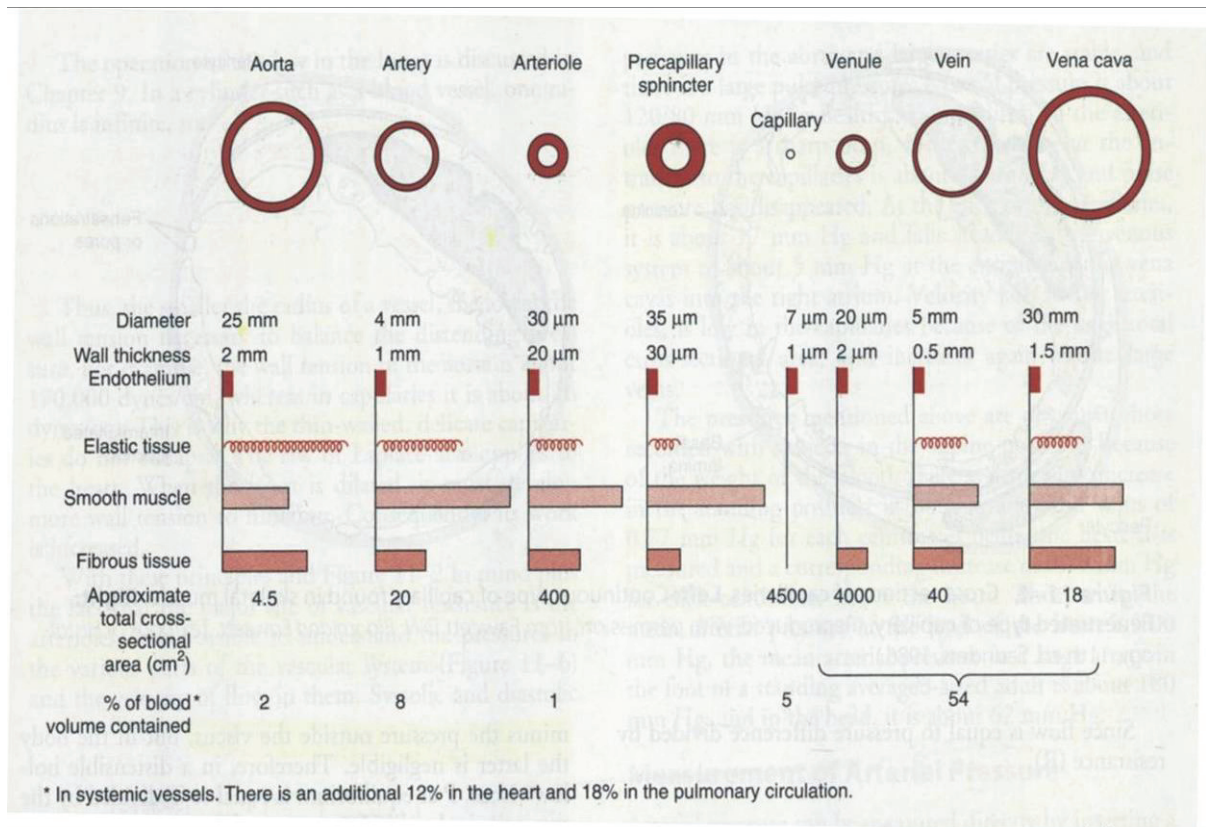


Figura 1: Características diferenciais na estrutura dos vasos sanguíneos.

Modificado de Burton AC. Physiology Review, 1954. Conforme o segmento do sistema circulatório, existem diferenças de diâmetro, espessura, área seccional e componentes da parede do vaso.

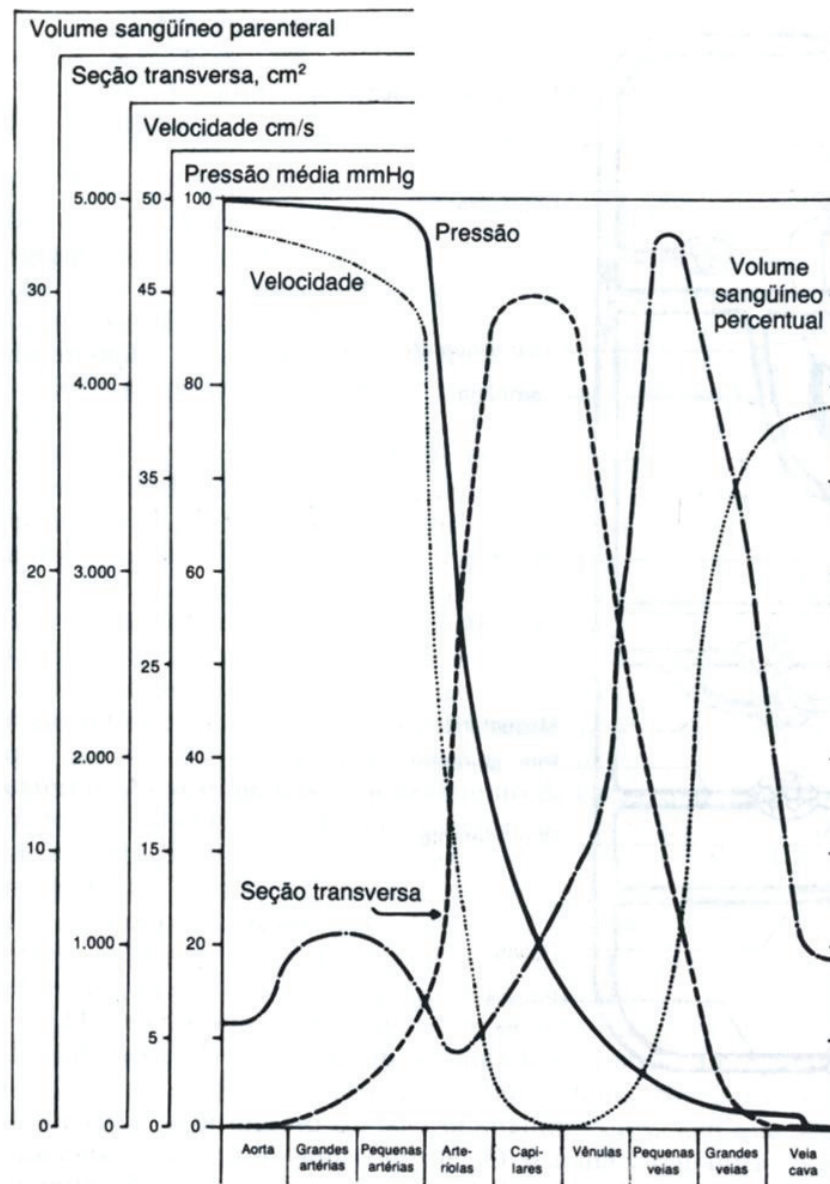


Figura 2: Características funcionais dos vasos sanguíneos: variação da pressão, da velocidade, da secção transversa e da capacidade sanguínea ao longo da grande circulação.

Burton AC. Fisiologia e biofísica da circulação, 1978. A pressão decresce continuamente, pouco ao longo do sistema arterial, muito através das arteriolas, capilares e vênulas e pouco, de novo, no sistema venoso. O fluxo sanguíneo, a qualquer momento, é constante ao longo do sistema. A velocidade do sangue decresce da aorta para os capilares, onde atinge valor mínimo, mas volta a crescer no sistema venoso. A capacidade do sistema distribui-se com um mínimo nas arteriolas e um máximo nas pequenas veias.

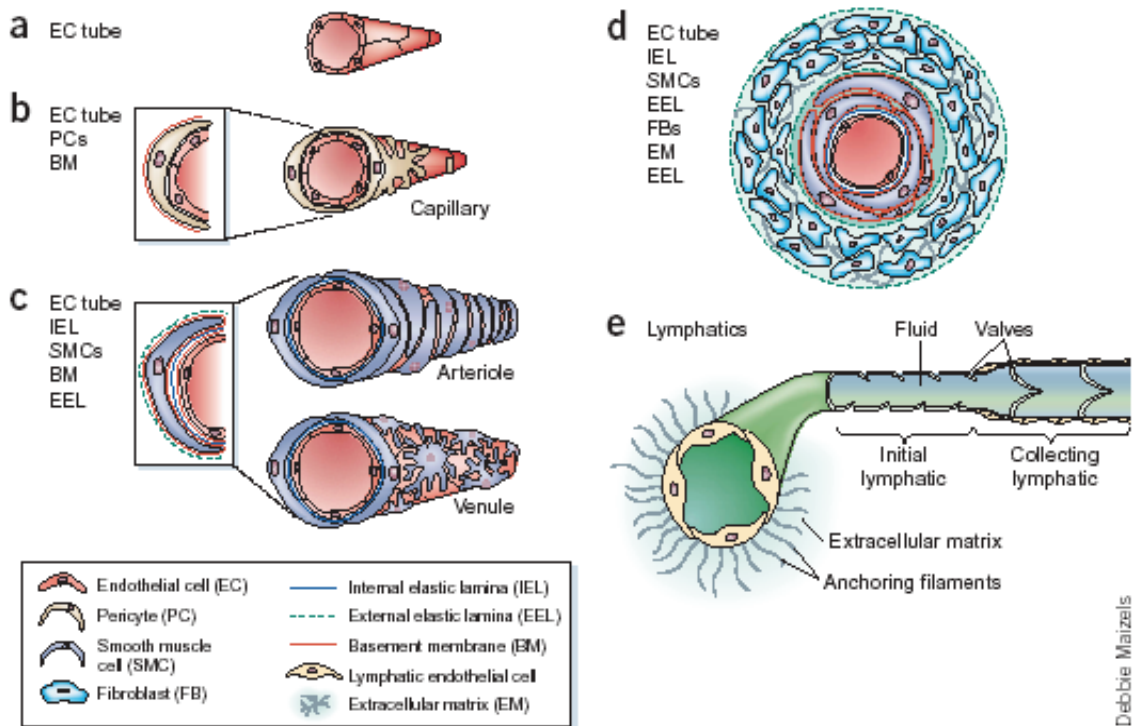


Figura 3: Composição da parede vascular de vasos nascentes e vasos maduros.

Vasos nascentes (a) consistem de um tubo de células endoteliais. Estes maturam em estruturas especializadas que consistem em artérias, capilares e veias. Capilares (b), os vasos mais abundantes em nosso corpo, consistem de células endoteliais circundadas por uma membrana basal com pericitos esparsamente distribuídos numa camada única dentro desta. Devido a sua parede “fina” e grande área de superfície estes vasos formam o principal sítio de troca de nutrientes entre o sangue e os tecidos. Dependendo do órgão ou tecido, a lâmina de células endoteliais é contínua (ex: músculo), fenestrada (ex: rim e glândulas endócrinas), ou descontínua (ex: sinusóides hepáticos). O endotélio das barreiras hemato-encefálica e retino-encefálica possuem especializações (junções celulares espessas) e são impermeáveis à várias moléculas. Arteriolas e vênulas (c) tem um aumento de cobertura de células murais comparadas com os capilares. Arteriolas pré-capilares são completamente revestidas com células musculares lisas vasculares que formam a sua própria membrana basal e são circunferencialmente arranjadas e compactadas com a camada endotelial. O extravasamento de macromoléculas e células da corrente sanguínea ocorre tipicamente nas vênulas pós-capilares. A parede dos vasos maiores (d) consistem de três camadas especializadas: uma íntima (interna) composta de células endoteliais, uma média composta de células musculares lisas e uma adventícia (externa) composta por fibroblastos, matriz extracelular e uma lâmina elástica. A camada adventícia tem sua própria irrigação sanguínea, a chamada vasa vasorum, que estende-se em parte até a média. As células musculares lisas e a camada elástica contribuem para o tônus vascular e medeiam o controle do diâmetro do vaso e o fluxo sanguíneo através do mesmo. Um controle adicional do fluxo sanguíneo é realizado por shunts arterio-venosos que podem divergir o mesmo para longe do leito capilar quando for necessário. Os capilares linfáticos (e) não tem pericitos. Vasos linfáticos maiores (coletores) são revestidos por membrana basal e contém válvulas que permitem o fluxo somente unidirecionalmente (proximal). As células endoteliais dos linfáticos são conectadas ao tecido conjuntivo adjacente através de filamentos de ancoragem. Nature Medicine, 2003.

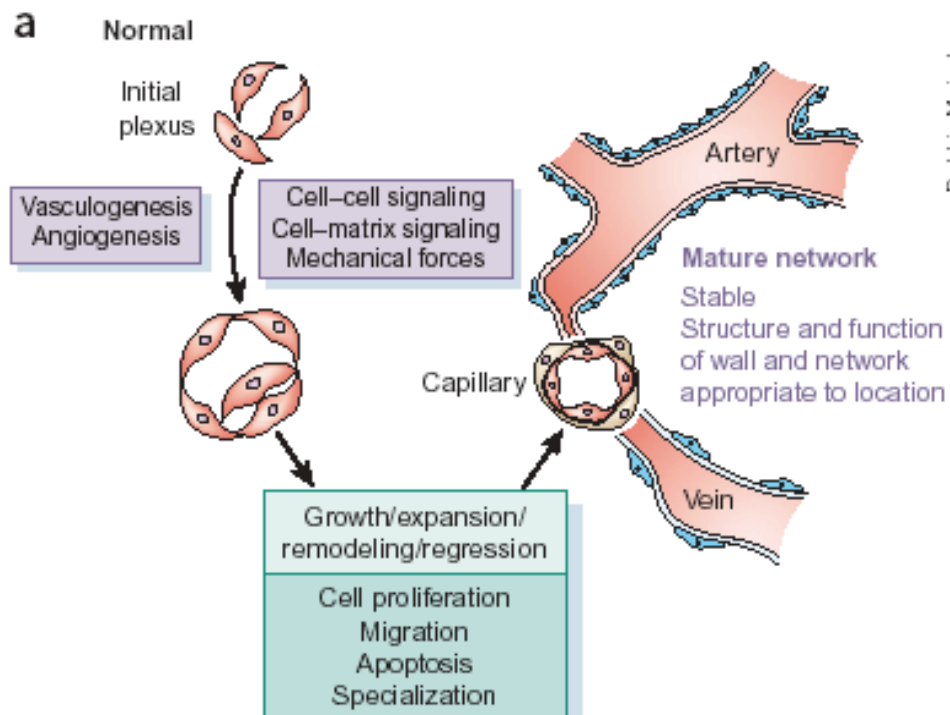


Figura 4: Passos na formação e maturação da rede vascular durante a angiogênese.

A rede vascular nascente forma-se a partir de um plexo de células primárias (angioblastos) por vasculogênese ou angiogênese. A regulação é feita pela sinalização molecular envolvendo as células entre si e entre as células e a matriz extracelular. Forças mecânicas também atuam nesta regulação, principalmente no crescimento e expansão da rede. Padrões de crescimento, organização e especialização ordenados produzem redes maduras de artérias, capilares e veias apropriados para cada órgão e local. Nature Medicine, 2003.

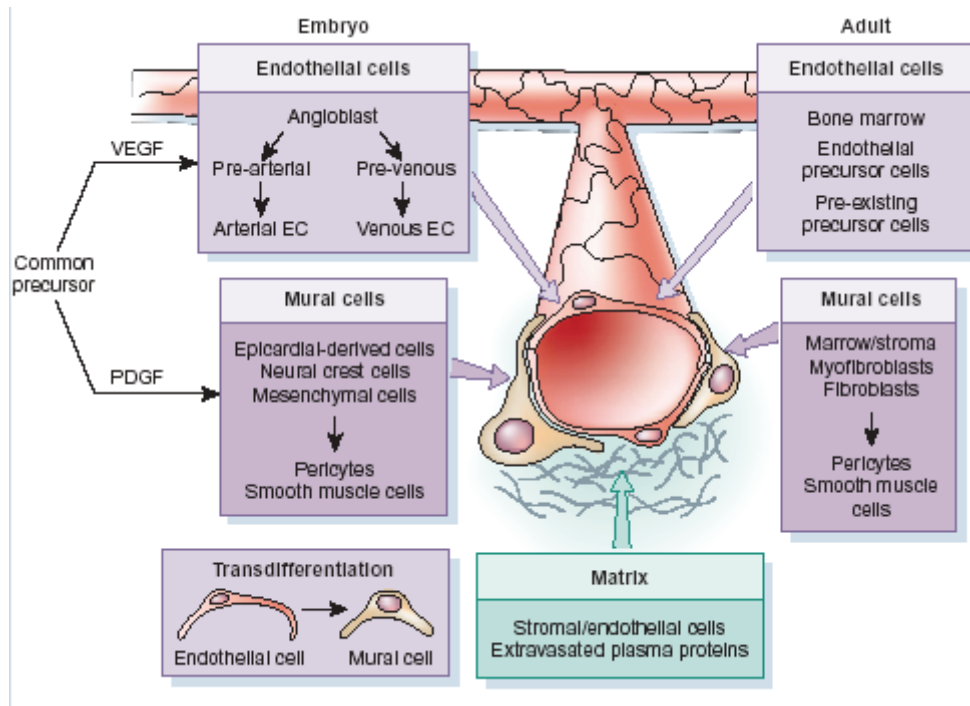


Figura 5: Origem das células da parede vascular e da matriz extracelular.

As células endoteliais originam-se de hemangioblastos presentes em vários órgãos (vasculogênese pré-natal), de células tronco originadas da medula óssea (vasculogênese pós-natal) ou por migração e proliferação de células endoteliais existentes em vasos já formados (angiogênese). Células murais tem origem em vários sítios durante o desenvolvimento embrionário incluindo o mesênquima e células endoteliais progenitoras da aorta dorsal que podem transdiferenciar-se em células musculares lisas na presença de PDGF B. No adulto, as células murais podem originar-se da medula óssea ou do estroma tecidual. Fibroblastos podem se diferenciar em miofibroblastos que, por sua vez, podem se diferenciar em células musculares lisas vasculares em resposta à estímulos bioquímicos e mecânicos. Finalmente, os fibroblastos, os miofibroblastos e as células musculares lisas podem se originar de uma célula progenitora comum. Tanto as células endoteliais como as murais produzem moléculas da matriz. Proteínas plasmáticas extravasadas da rede vascular nascente também contribuem para a formação da matriz extracelular. Nature Medicine, 2003.

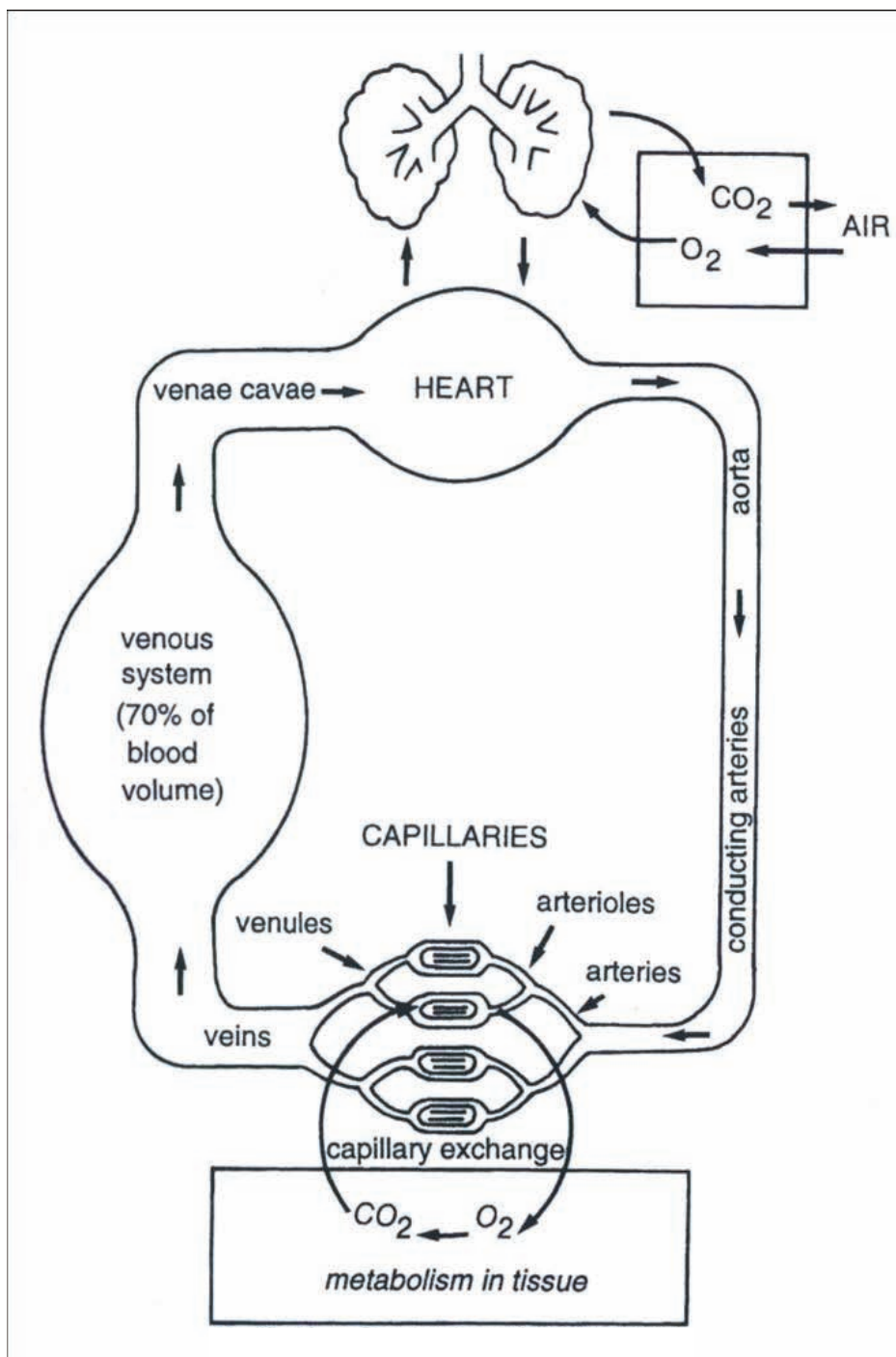


Figura 6: A natureza “circular” do sistema circulatório.
Opie L. Heart Physiology: From cell to circulation, 2004.

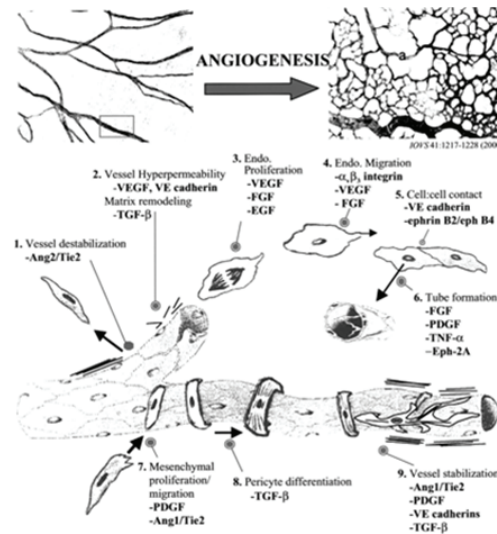


Figura 7: Mecanismos da angiogênese segundo Papetti M, Herman IM. Am J Physiol Cell Physiol 2002.

Angiogênese normal depende da coordenação de muitos processos independentes. Remoção dos pericitos do endotélio e desestabilização (1) dos vasos pela angiopoietin-2 (Ang2) determinam que as células endoteliais passem do fenótipo “estável e de crescimento lento” para o de “proliferativo ou plástico”. A hiperpermeabilidade (2) induzida pelo VEGF permite o extravasamento local de proteases e componentes da matriz extracelular da corrente sanguínea. As células endoteliais proliferam (3) e migram (4) através da matriz extracelular remodelada (5) formando tubos pelos quais o sangue pode fluir (6). Células mesenquimais proliferam e migram ao longo dos novos tubos (7) e diferenciam-se em pericitos maduros(8). O retorno ao fenótipo de estabilidade das células endoteliais, o reforço do contato entre as células e a elaboração de uma nova matriz extracelular estabiliza o novo vaso sanguíneo (9). TGF, transforming growth factor; FGF, fibroblast growth factor; EGF, epidermal growth factor; PDGF, platelet-derived growth factor; TNF, tumor necrosis factor; a, arteriole; v, venule.

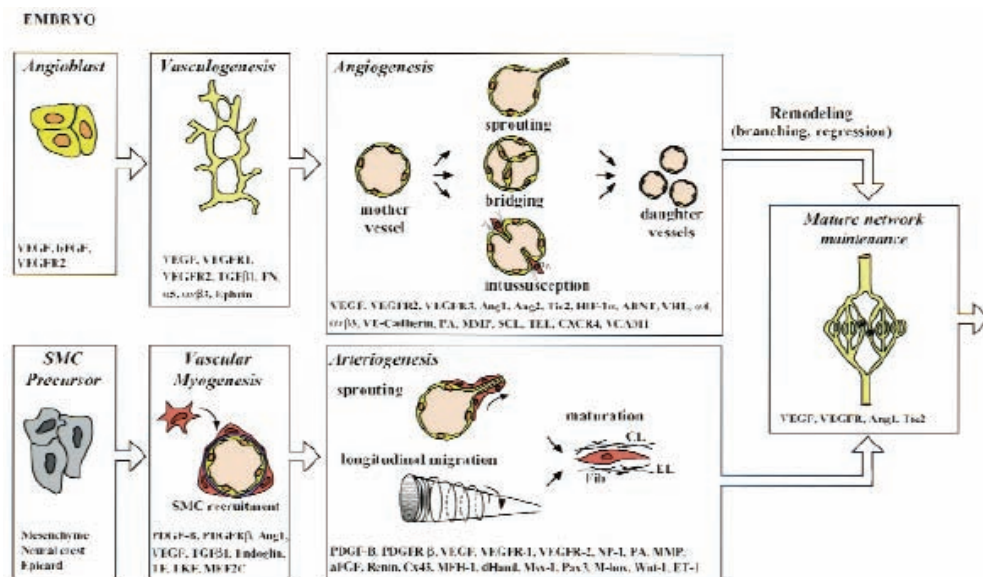


Figura 8: Mecanismos celulares da angiogênese e da arteriogênese segundo Carmeliet P. Nature Medicine, 2000.

Precusores endoteliais (angioblastos) no embrião formam uma rede primitiva (vasculogênese) que se expande e remodela (angiogênese). Células musculares lisas cobrem as células endoteliais durante a miogênese vascular e estabilizam o vaso durante a arteriogênese. CL, colágeno; EL, elastina; Fib, fibrilina.

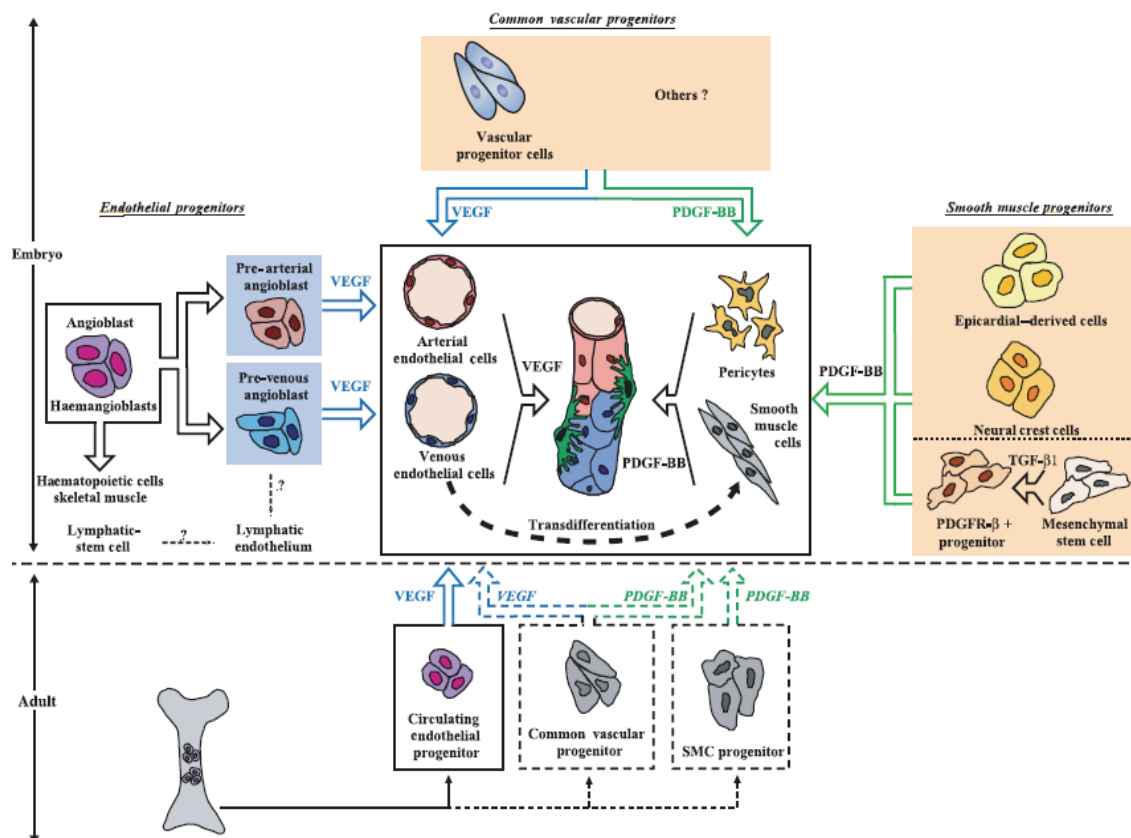


Figura 9: Progenitores das células vasculares no embrião e no adulto.

No embrião, células endoteliais, musculares lisas e progenitoras vasculares contribuem para o desenvolvimento. Células musculares lisas tem diferentes origens. Células progenitoras do endotélio e de células musculares lisas originadas da medula óssea ocorrem no adulto e sofrem influência do VEGF e do PDGF BB. Segundo Carmeliet P. J Inter Med 2004.

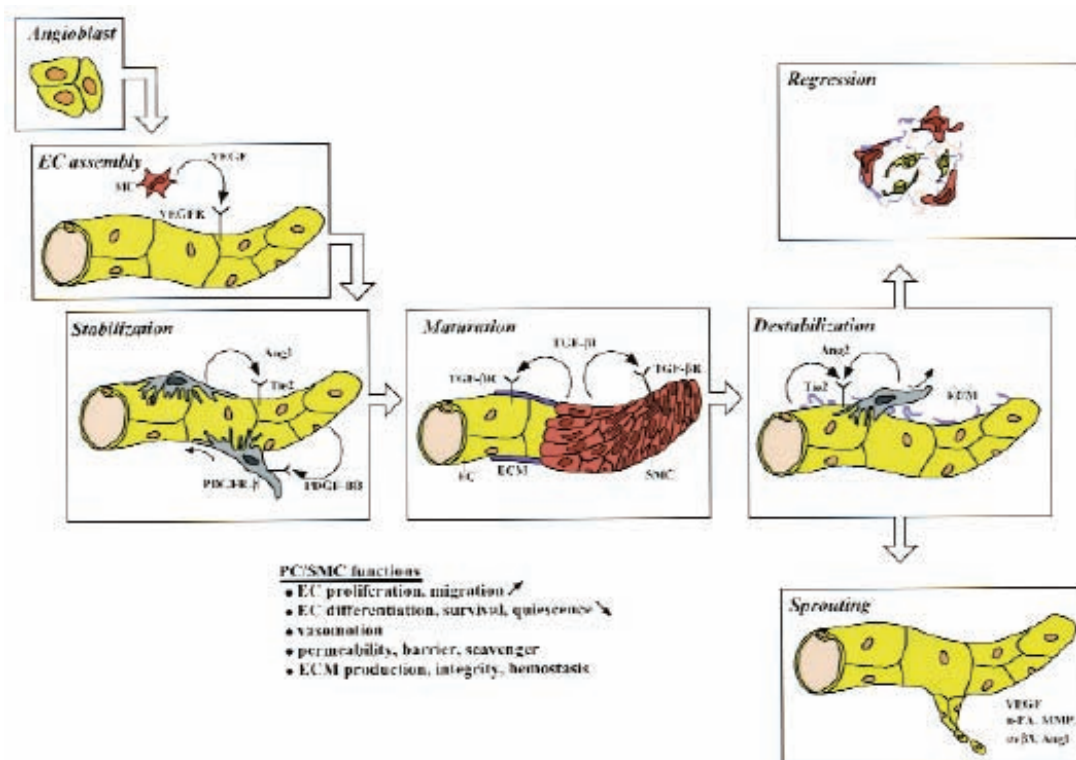


Figura 10: Mecanismos moleculares da angiogênese e da arteriogênese segundo Carmeliet P. Nature Medicine 2000.

O VEGF inicia a formação de células endoteliais(EC); PDGF-BB recruta pericitos (PC) e células musculares lisas (SMC); Angiopietin-1 (Ang-1) e TGF-β1 estabiliza os neovasos; o resultado é a angiogênese na presença de estímulos para a mesma (hipóxia) ou regressão vascular na ausência de fatores de sobrevivência endotelial.

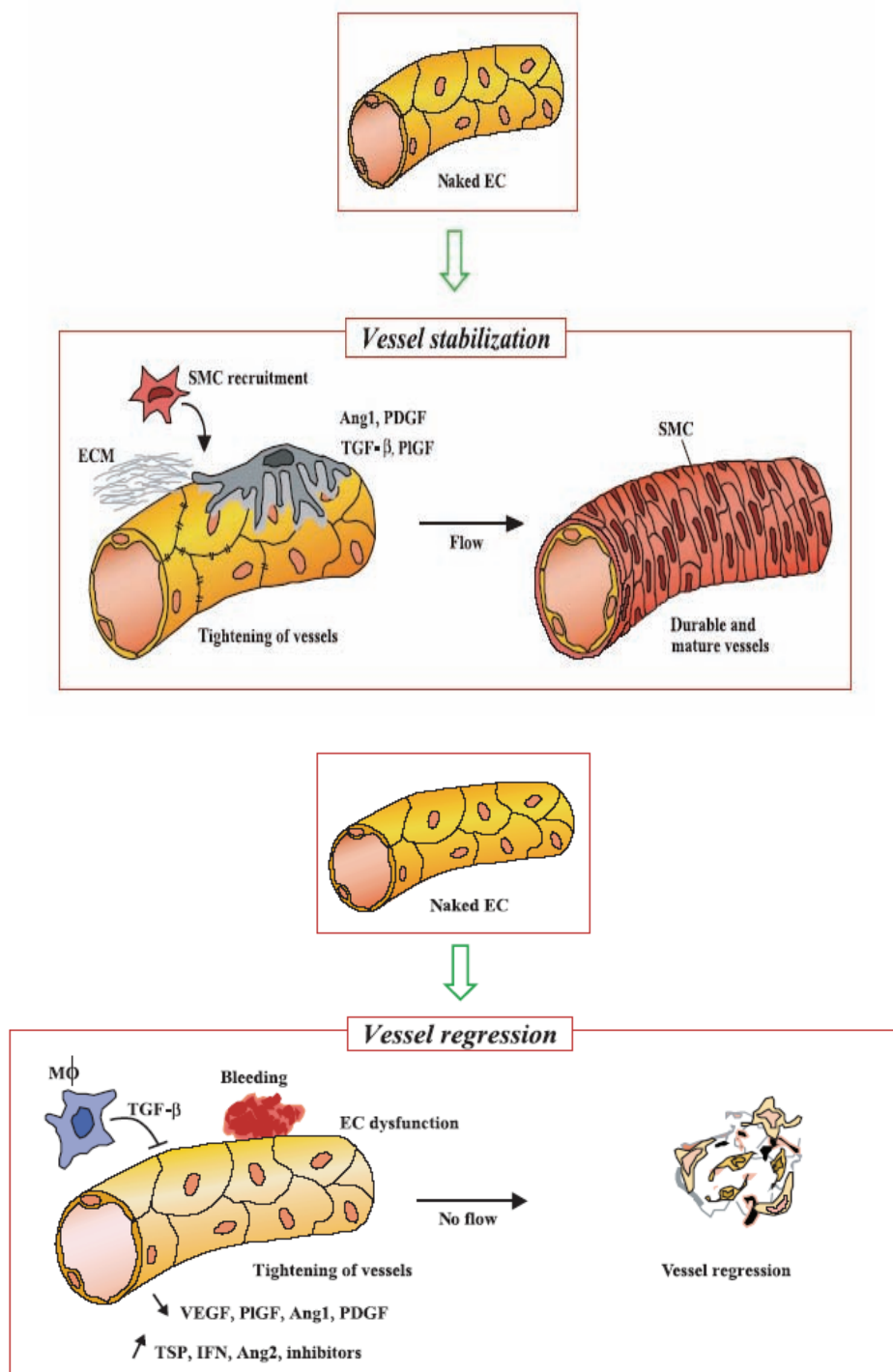


Figura 11: Mecanismos moleculares da angiogênese para estabilização ou regressão dos neovasos. Segundo Carmeliet P. J Inter Med 2004.

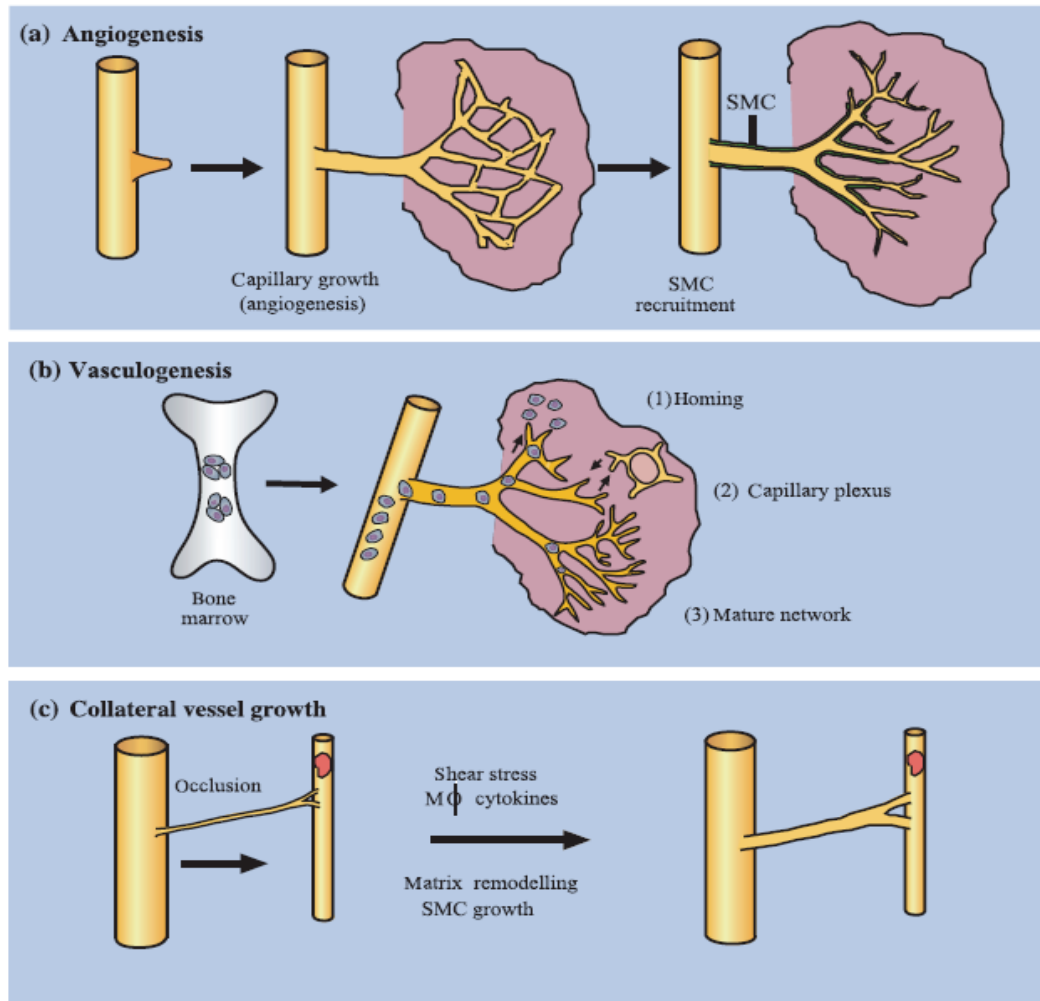
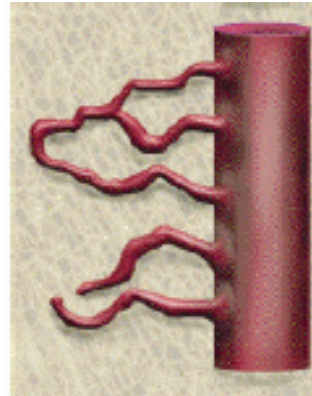


Figura 12: Desencadeamento da vasculogênese, da angiogênese e da arteriogênese segundo Carmeliet P. Nature Medicine 2000.

A formação de vasos sanguíneos no adulto pode ocorrer através da vasculogênese através da mobilização de células-tronco da medula óssea para a área necessitada que “chama” as mesmas “de volta para casa”; através da angiogênese pelo crescimento de brotos capilares a partir de vasos pré-existentes para a área de isquemia absoluta ou relativa; através da arteriogênese pelo remodelamento de vasos pré-existentes que ocorre após alteração do “shear stress” gerado pela oclusão de uma artéria.

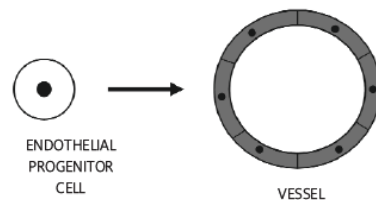


Crescimento por intussuscepção:
inserção de colunas de tecido intersticial dentro do lúmen



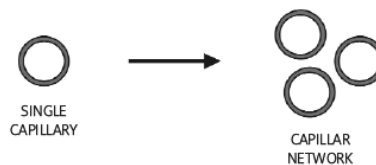
Crescimento por brotamento:
ramos vão surgindo e se conectando

Figura 13: Mecanismos da angiogênese: crescimento por intussuscepção (E): inserção de colunas de tecido intersticial dentro do lúmen; crescimento por brotamento (D): ramos vão surgindo e se conectando. Segundo Carmeliet P. Nature, 2000.



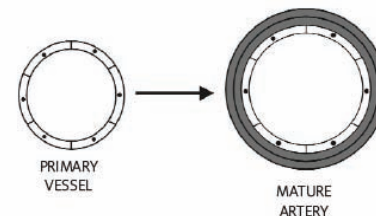
Vasculogênese

Transformação da célula endotelial progenitora em células maduras capazes de formar novos vasos



Angiogênese

Extensão da rede vascular formada por novas ramificações a partir de vasos existentes e criação de novas anastomoses



Arteriogênese

Transformação de vasos primários em artérias maduras. Paredes da artéria consistem de várias camadas formadas por células diferenciadas

Figura 14: Esquema ilustrando o conceito e a característica principal da vasculogênese, da angiogênese e da arteriogênese.

Segundo Rusiecka E, Banach M, Drozdoz J. Arch Med Sci 2005.

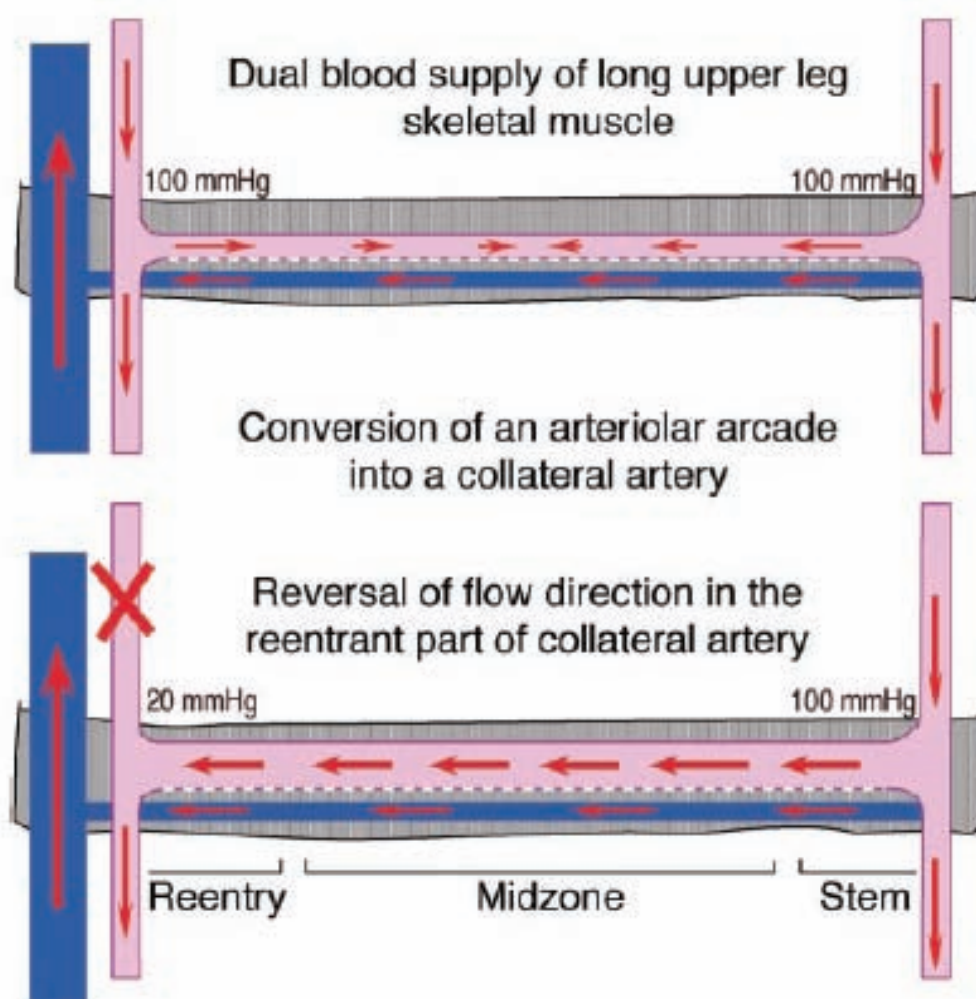


Figura 15: Esquema demonstrando o suprimento arterial duplo: (arcada fisiológica) em músculos do membro superior do camundongo (parte superior) que propicia o surgimento de uma artéria colateral (calibre e fluxo maiores, parte inferior) após a obstrução (X) da artéria da esquerda. Depois da obstrução, o fluxo sanguíneo na região média e de reentrada muda de um padrão anterógrado lento para retrógrado rápido (“alteração do shear stress”). Segundo Schaper W, Scholz D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003.

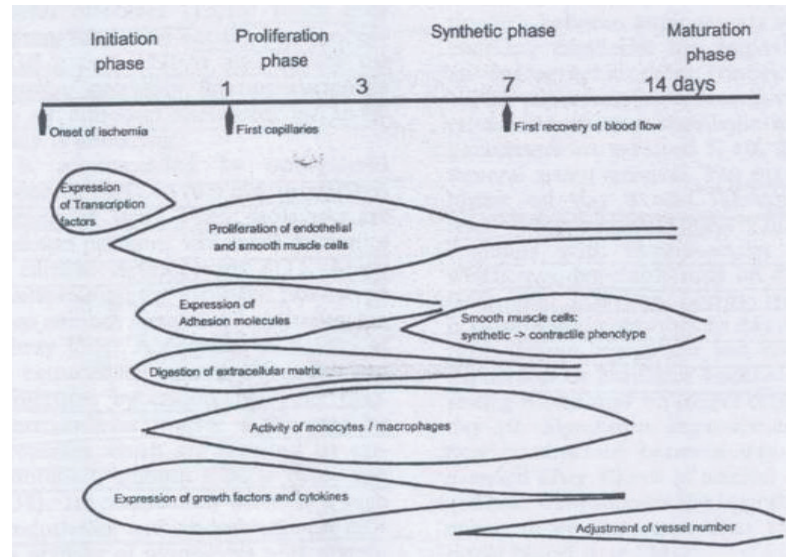


Figura 16: Seqüência temporal de eventos no desenvolvimento de circulação colateral: Demonstrando que a expressão de fatores de crescimento e de citocinas inicia já nas primeiras horas após o começo da isquemia. Segundo Heilmann C, Beyersdorf F, Lutter G. Cardiovascular Surgery, 2002.

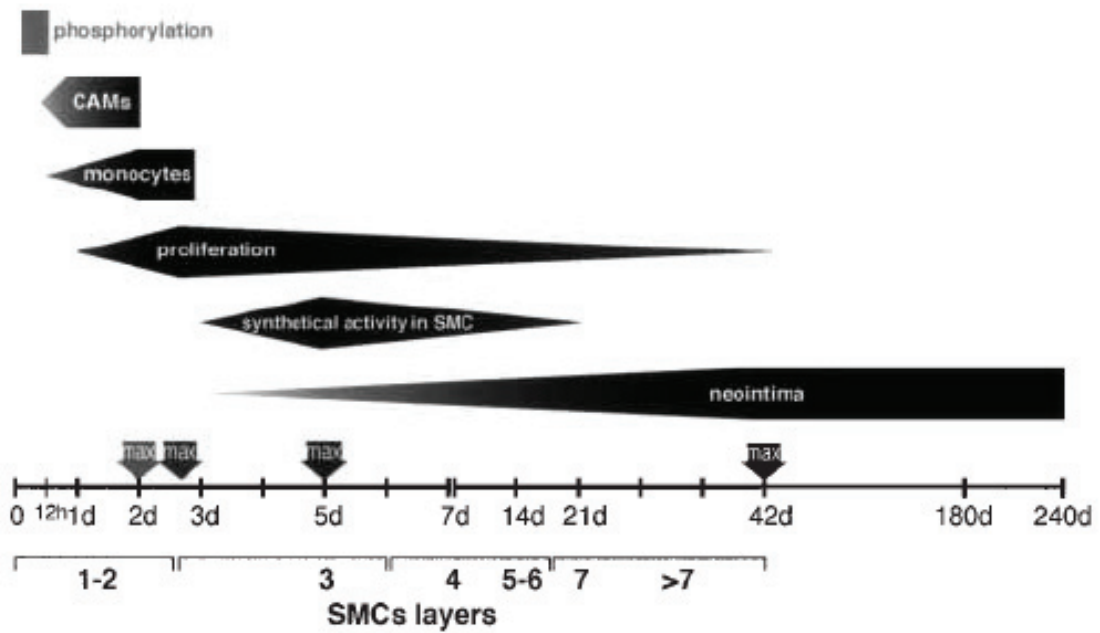


Figura 17: Esquema demonstrando os eventos na arteriogênese em sua evolução temporal. Segundo Scholz D, Ito W, Fleming I, Deindl E, Sauer A, Wiesnet M, Busse R, Schaper J, Schaper W. Virchows Arch, 2000.

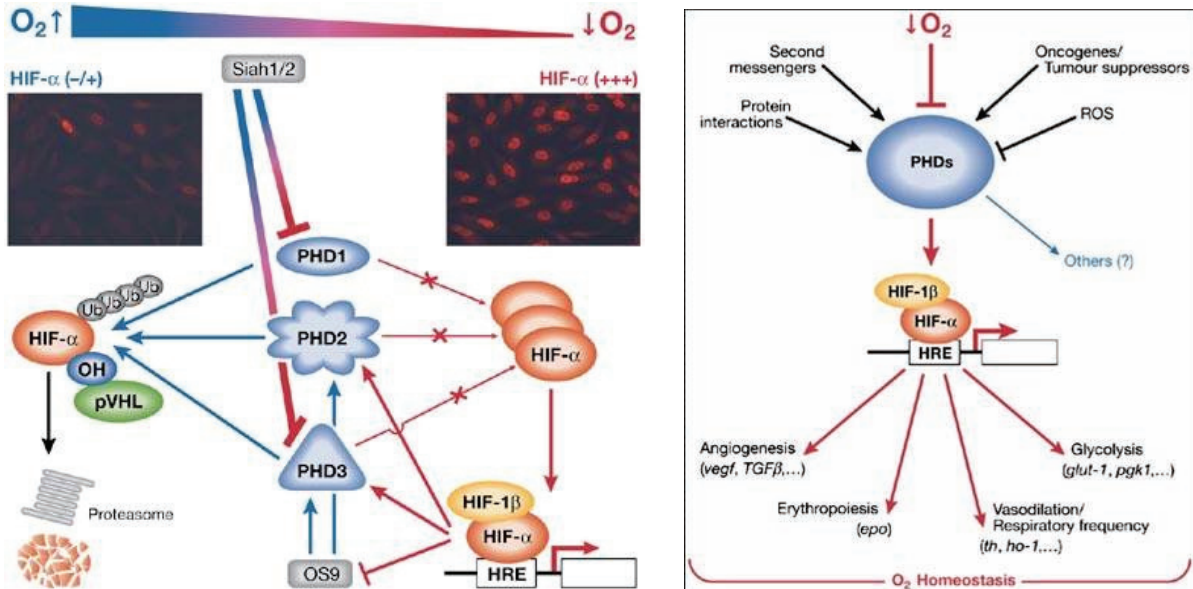


Figura 18: Esquema demonstrando o papel da disponibilidade de oxigênio na regulação do HIF e de suas ações.

Segundo Berra E, Ginouvès A, Pouyssegur J. EMBO reports, 2006. À esquerda, a prolyl-hidroxilase-domain protein (PHDs) regula o HIF-a em resposta à disponibilidade de oxigênio. Sob condições aeróbicas (setas azuis), a PHDs hidroxilada permite à von Hippel-Lindau protein (pVHL) ligar-se ao HIF-a e chegar até o proteossoma. Por outro lado, pela união ao PHD2, PHD3 ou OS9 promove a hidroxilação do HIF-a. Uma diminuição na disponibilidade do oxigênio (setas vermelhas) inibe a PHDs; o HIF-a acumula-se e induz a expressão de genes específicos. Adicionalmente, Siah 1 e 2 acionam a degradação da PHD1 e da PHD3 sob condições de hipóxia. Hipóxia controla PHD2, PHD3, OS9 e Siah 1 e 2 através de um mecanismo de feedback. Imunofluorescência mostra a expressão do HIF-1b em células HeLa com PO₂ de 20% e com PO₂ de 1-2%. HRE, hypoxia response element.

À direita, um modelo esquemático da regulação e função da PHD. Muitos estímulos fisiológicos relacionados à disponibilidade de oxigênio, regulam a atividade da PHD que promove a adaptação “fina” ao microambiente. A PHD modula a estabilidade e a atividade do HIF-a, ações fundamentais na homeostasia do oxigênio. HRE, hypoxia response element; ROS, reactive oxygen species.

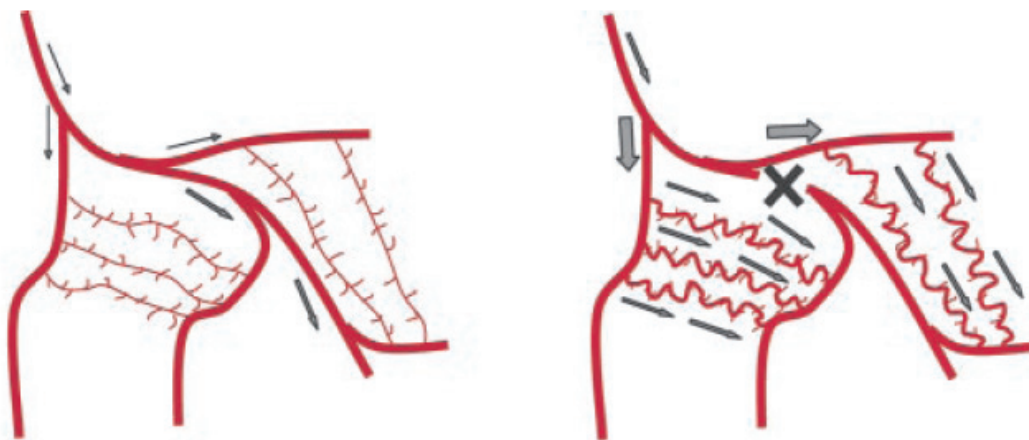


Figura 19: Diagrama demonstrando o recrutamento de vasos pré-existentes na arteriogênese em coelhos.

Ocorre mudança do fluxo sanguíneo após a oclusão da artéria femoral. Depois da oclusão(X), o fluxo sanguíneo (setas) segue o gradiente entre o segmento com alta pressão (proximal) e o segmento com baixa pressão (distal). Vasos colaterais pré-existentes são recrutados. Segundo Heil M, Schaper W. Circ Res, 2004.

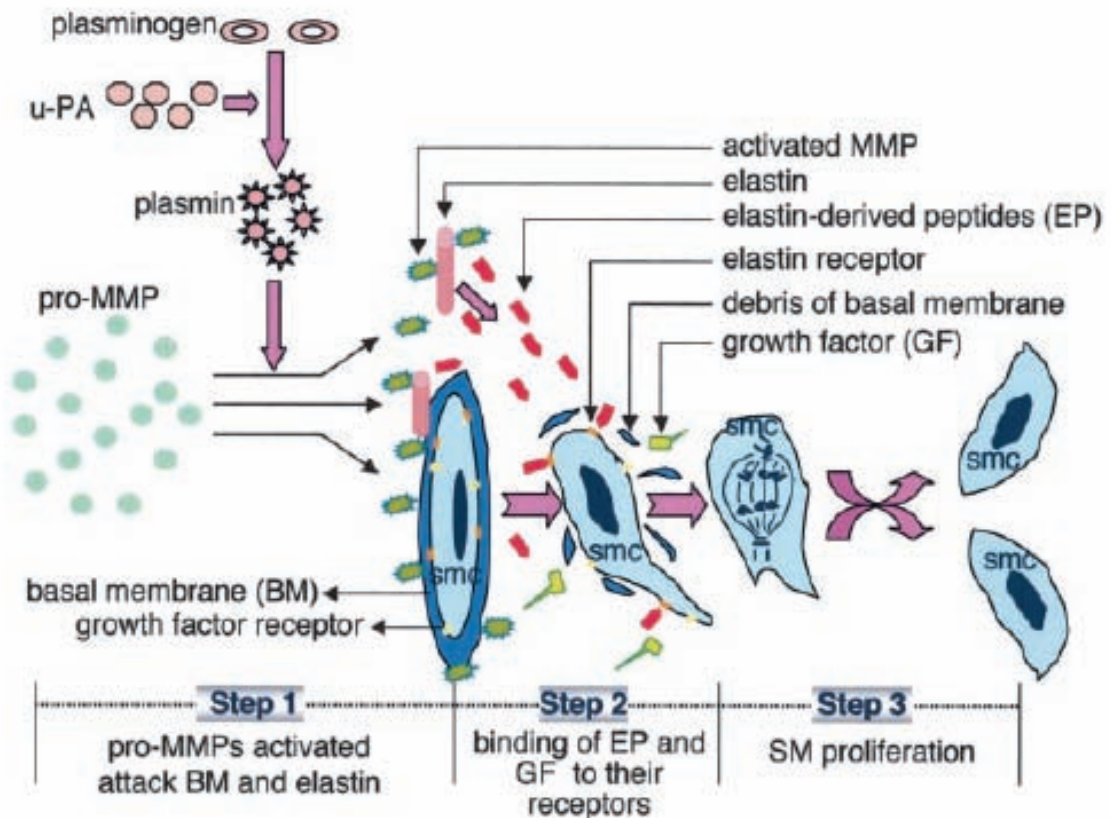


Figura 20: Diagrama demonstrando a proliferação de células musculares lisas e o remodelamento na parede do vaso na arteriogênese.

Segundo Heil M, Schaper W. Circ Res, 2004.

Num primeiro momento (step 1), ocorre a ativação da matrixmetalloproteinases(MMPs) pela plasmina. MMPs subsequentemente digerem a membrana basal (BM) e as fibras de elastina. Num segundo momento (step 2), a degradação da elastina gera peptídeos derivados da mesma (EP) que, juntamente com os fatores de crescimento, ligam-se às células musculares lisas (SMCs). Num terceiro momento (step 3), a proliferação e a migração de células musculares lisas são induzidas.

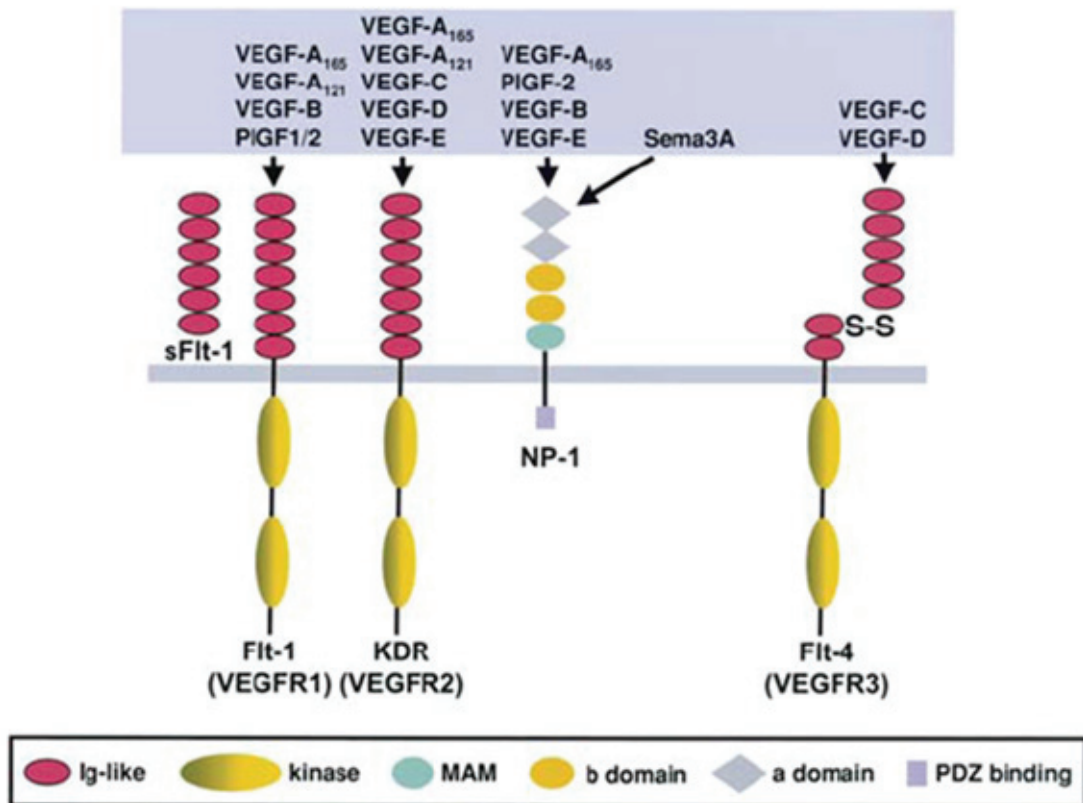


Figura 21: Diagrama demonstrando a família do VEGF e seus receptores.

Segundo Zachary I. Biochemical Society Transactions, 2003. Os receptores RTKs, Flt 1 (VEGFR1) e KDR (VEGFR2), que especificamente reconhecem o VEGF-A, possuem três segmentos (domínios). Há um domínio extracelular que contém 7 alças “imunoglobulina-like” (oval vermelho), um domínio hidrofóbico que se estende trans-membrana celular e um domínio citoplasmático que compreende uma porção kinase single (oval amarela) que é interrompida por uma região não catalítica chamada de kinase insert. O domínio extracelular do Flt1 é também expressado como proteína solúvel de um modo independente. Os VEGFs C, D e E também ligam-se ao KDR, enquanto que PIGF e o VEGF-B ligam-se somente ao Flt1. O Flt4 (VEGFR3) é um receptor relacionado aos VEGFs C e D que são submetidos à proteólise resultando em peptídeos com 120 e 75 kDa com ponte disulfídica no quinto domínio “imunoglobulina-like”. NP-1 é um receptor não RTK para VEGF 165, para a isoforma do PIGF-2, para o VEGF-B, e para o VEGF-E. NP-1 compreende uma região extracelular com MAM (meprin, AS, m-tirosinase-fosfatase, domínios a e b, uma região trans-membrana e um curto domínio citoplasmático.

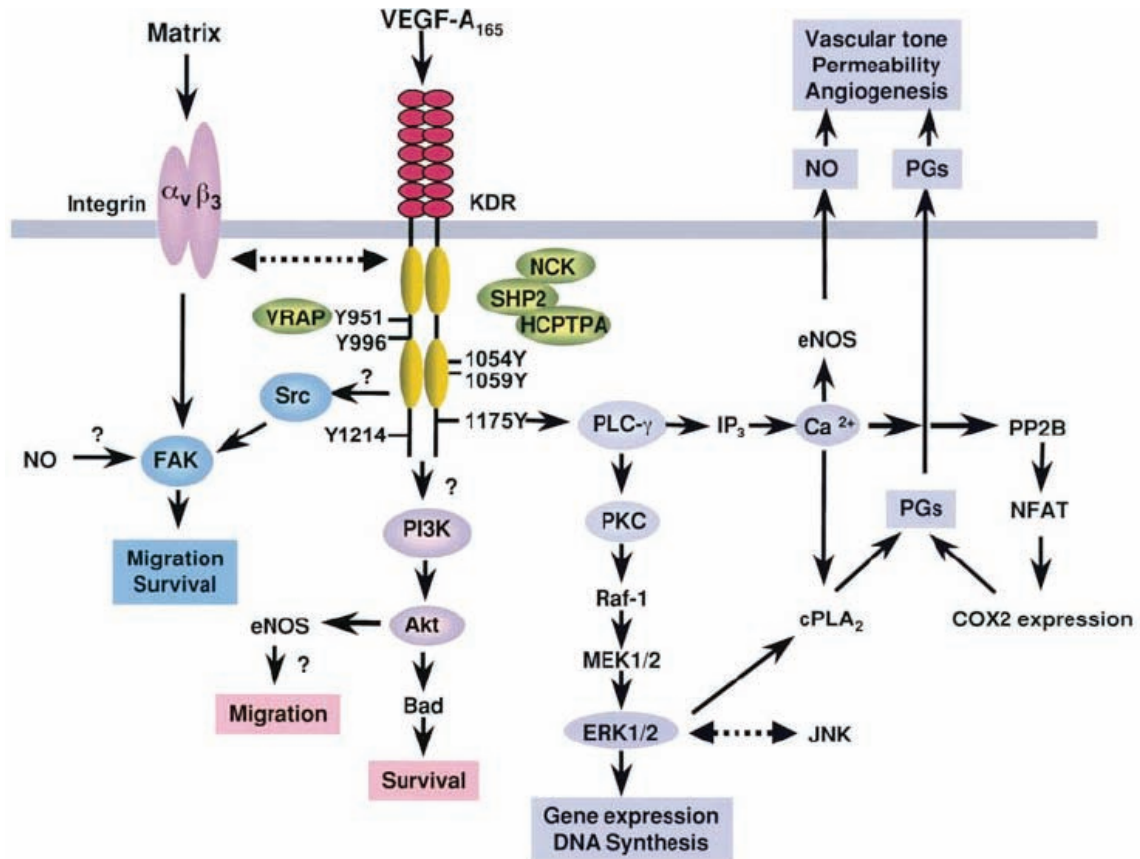


Figura 22: Diagrama evidenciando as vias de sinalização do VEGF.

Segundo Zachary I. Biochemical Society Transactions, 2003. A maioria, se não toda, sinalização biologicamente relevante do VEGF é mediada via receptores KDR. Ativação do KDR ocorre através da dimerização induzida pelo ligante e pela auto-fosforilação de múltiplos resíduos de tirosina no domínio intracelular via VRAP e via PLC-g, além de outras menos definidas atualmente. A sobrevida da célula endotelial dependente do VEGF é mediada em parte via ativação da kinase anti-apoptótica (Akt) pela PI 3-kinase (PI3K). A Akt fosforilada inibe a proteína pró-apoptótica Bad, levando a inativação da atividade da caspase. Akt, também pela fosforilação, leva a ativação da eNOS independente do cálcio. O aumento da fosforilação da tirosina da FAK, mediada em parte pela Src, é um ponto de convergência para a sinalização das vias de sobrevivência e migração celulares mediadas pelo VEGF e pelas integrinas. A interação direta entre a integrina avb3 e a KDR pode também exercer um papel nas funções de sobrevida celular do VEGF. O maior mecanismo de sinalização para a mitogênese pelo VEGF é o da via do PLC-g que resulta em hidrólise do phosphatidylinositol4,5-biphosphate, em geração de inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) e diacylglicerol e subsequente mobilização do cálcio intracelular e ativação da PKC. PKC medeia a ativação da ERKs 1/2 via Raf-1 e MEK. MEK é a via para uma maior ativação da mitogênese e da ativação da cPLA2 que, por sua vez, leva a geração de prostanóides derivados da COX (PGI2 e PGE2). Sinalização pelo cálcio também é importante para ativação da eNOS e geração do óxido nítrico, ativação da serine/threonine phosphatase, calcineurin, ativação da transcrição do fator NFAT (nuclear factor of activated T-cells) e indução da COX-2 que medeia a produção de prostanóides. As vias de sinalização convergem e ramificam-se em vários pontos, o que enfatiza o formato de uma rede de sinalização e não apenas sinalização linear. HCTPA, human cellular protein tyrosine phosphatase A.

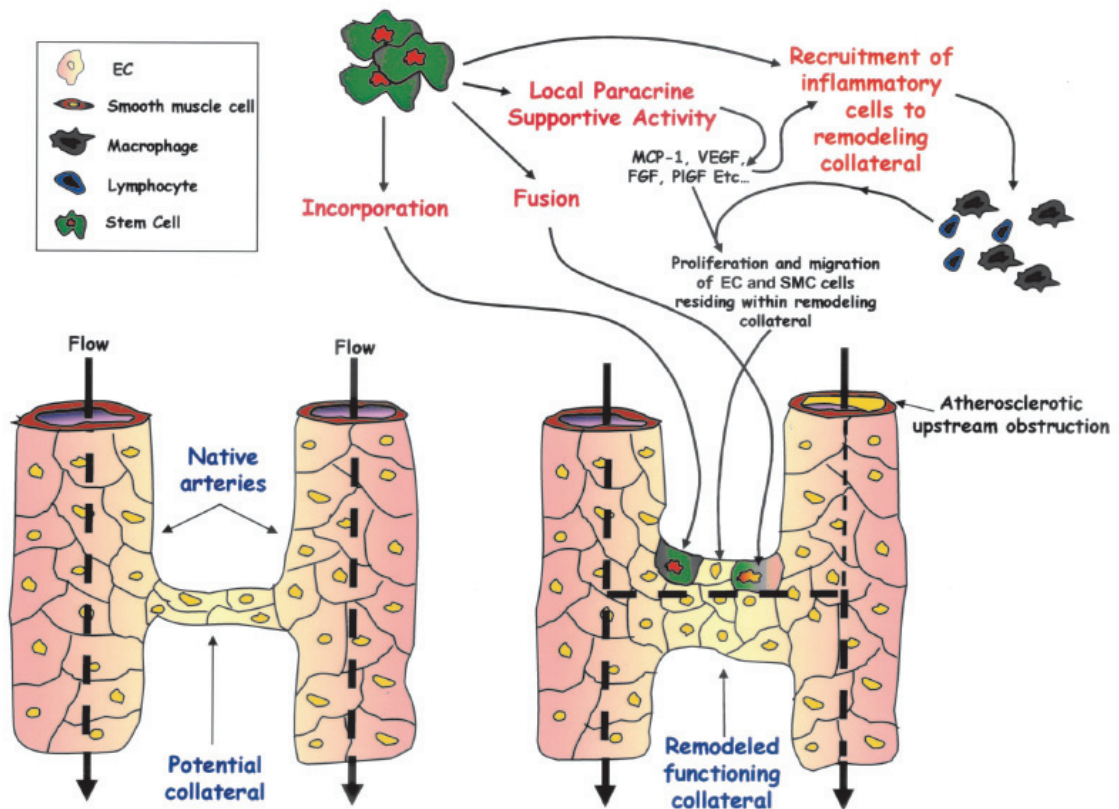


Figura 23: Mecanismo para aumentar o desenvolvimento de circulação colateral pelas células progenitoras endoteliais.

Segundo Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Epstein SE. *Circ Res*, 2004. Observa-se dois vasos de condutância paralelos e interconetados por um vaso colateral. Está representada apenas a camada de células endoteliais sem as células musculares lisas e a camada adventícia. (1) Suporte: células progenitoras secretam múltiplas citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas que podem facilitar a arteriogênese por (a) influenciar a matriz extracelular na medida que esta é o meio de condução para o desenvolvimento de colaterais, (b) inibir a apoptose das células endoteliais e musculares lisas e estimular sua migração e proliferação e (c) recrutar células proarteriogênicas e progenitoras. (2) Incorporação: células progenitoras podem incorporar-se diretamente em colaterais que estão se desenvolvendo e contribuir fisicamente para a formação das mesmas. (3) Fusão: fusão de células progenitoras com células específicas dos tecidos tem sido demonstrada, mas os dados disponíveis não sugerem sua contribuição para a formação de colaterais.

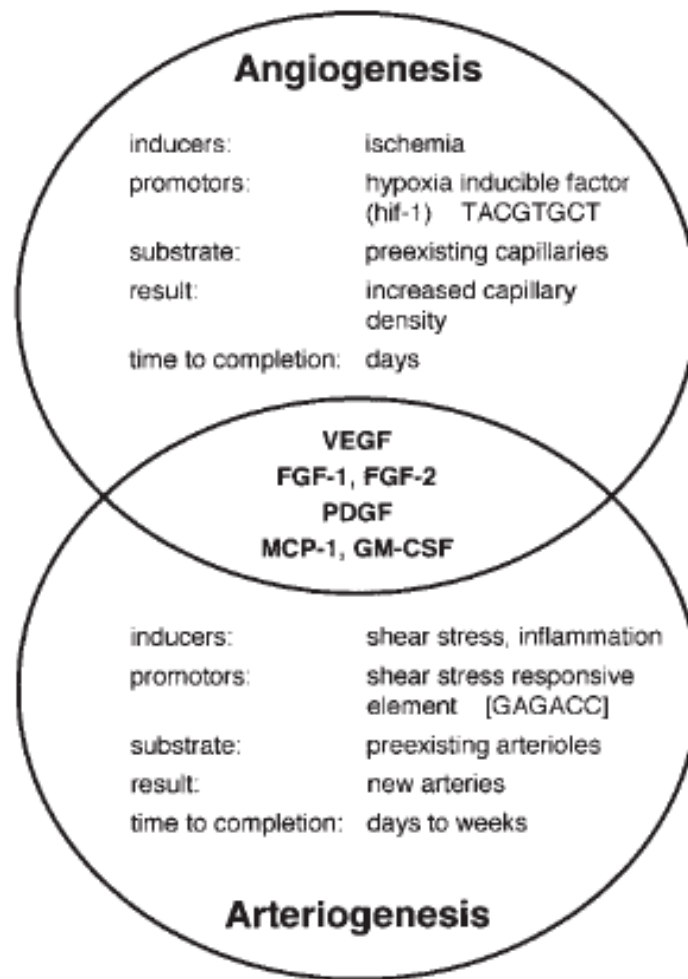


Figura 24: Integração entre os mecanismos da angiogênese e da arteriogênese. Segundo Buschmann I, Schaper W. News Physiol Sci, 1999.

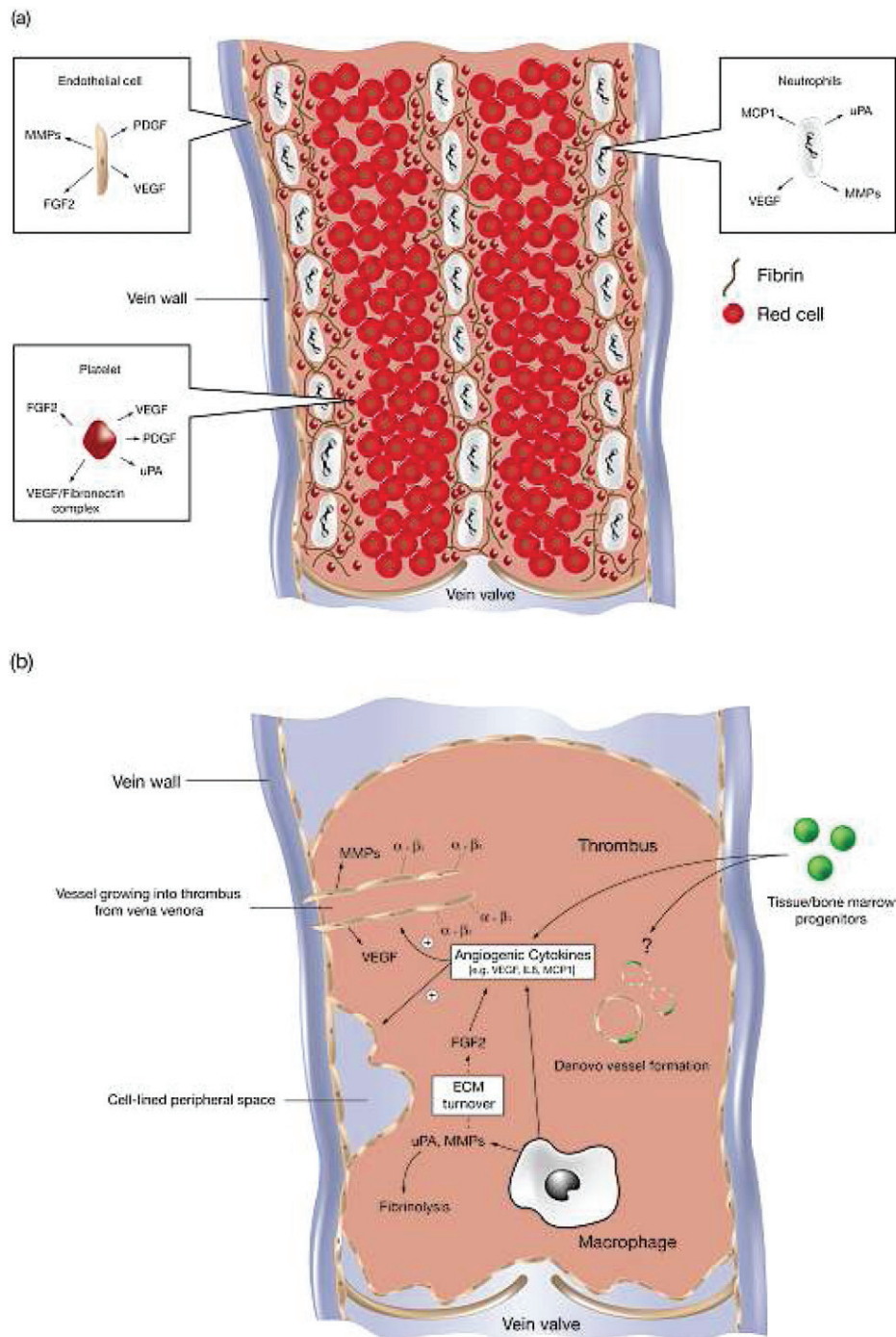


Figura 25: Mecanismos implicados na resolução do trombo venoso.

Segundo Modarai B, Burnand KG, Humphries J, Waltham M, Smith A. *Thromb Haemost* 2005. (a) no trombo fresco: glóbulos vermelhos são aprisionados entre camadas de fibrina, plaquetas e neutrófilos. As células que se encontram dentro deste trombo secretam enzimas proteolíticas, fatores de atração quimiotáticos, fatores de crescimento que promovem neovascularização e remoção das fibrina. (b) no trombo em resolução: camadas de células provenientes da parede do vaso cobrem espaços periféricos que se formam. Isto é mediado por uma variedade de enzimas proteolíticas, fatores de crescimento, fatores quimiotáticos de atração e adesinas. Células progenitoras derivadas dos tecidos e da medula óssea pode contribuir para este processo. Macrófagos são recrutados em número abundante e secretam citocinas e fatores de crescimento que promovem angiogênese e remodelamento da matriz extracelular.

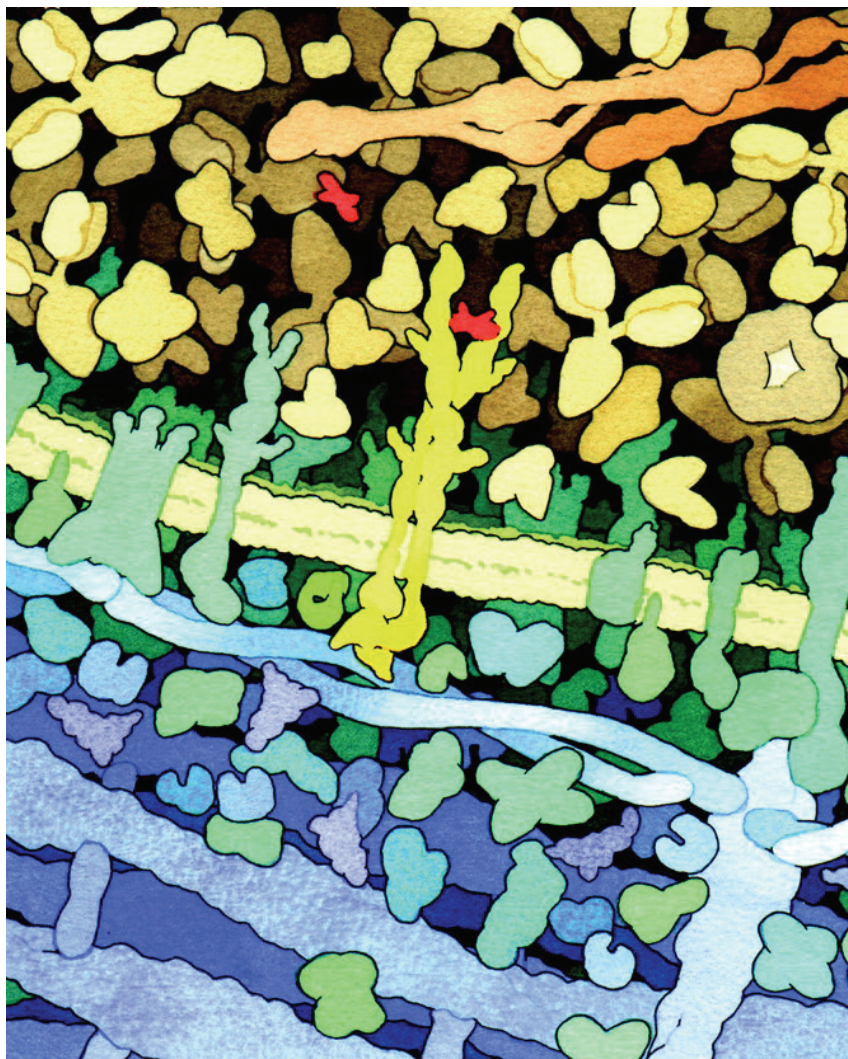


Figura 26: Representação da molécula do VEGF:

Em vermelho, ligado à molécula do receptor, em amarelo, na superfície externa da célula endotelial. A porção do receptor dentro da célula é uma enzima tirosina-quinase com duas “regiões quinases” onde são adicionados grupos fosfatos. O reconhecimento destes grupos fosfatos pelo aparato sinalizador do interior da célula inicia o processo da angiogênese. Stem Cells, 2003.

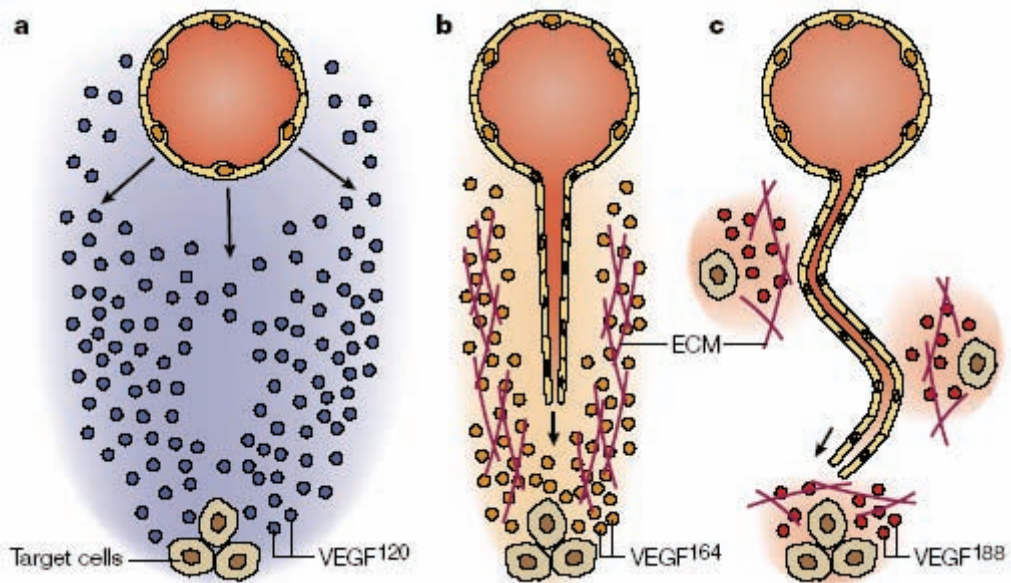


Figura 27: Papel do VEGF ligado à matriz extracelular na ramificação vascular.

Há um gradiente de "longo alcance" do VEGF que permite que as células endoteliais mantenham seu curso em direção às células-alvo; há também um gradiente "curto alcance" do VEGF ligada à matriz extracelular que baliza a migração passo a passo ao longo do caminho. (a) Na ausência de VEGF 164 e 188 ligados à heparina, o balizamento de curto alcance promovido pelo VEGF 120 é insuficiente. Este é livremente difundível, caoticamente distribuído e falha em produzir um gradiente de "longo-alcance" que sirva como guia. (b) O VEGF 164 promove gradientes de "curta ação" guiados pela matriz e também de "longa ação" que permite ao vaso enviar longos brotos em direção ao alvo. (c) Quando somente o VEGF 188 está presente e ligado à matriz extracelular não existe atração de "longo alcance" e as células endoteliais são guiadas erroneamente por curtas distâncias. ECM, matrix extracelular. Carmeliet P. Nature Review 2003.

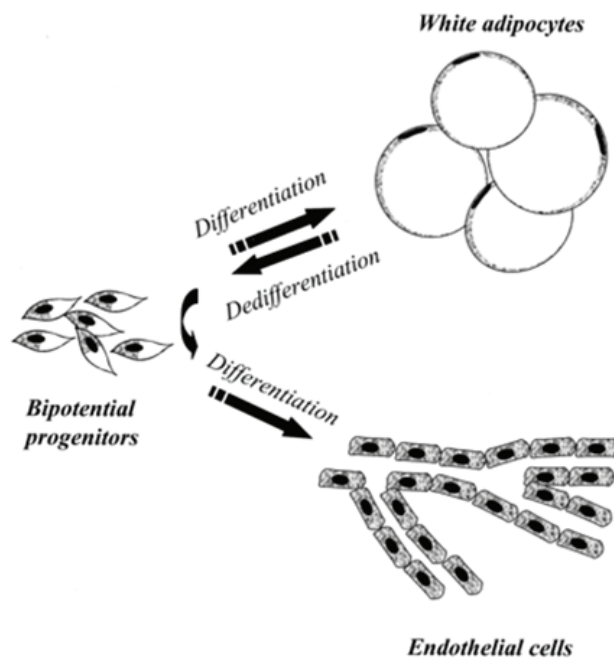


Figura 28: Diagrama demonstrando a plasticidade da linhagem de células adiposas em se diferenciar em células endoteliais.

As células progenitoras dos adipócitos tem a habilidade para diferenciarem-se em adipócitos e para adquirir um fenótipo de célula endotelial. As células maduras podem desdiferenciar-se e reverter a um fenótipo bipotencial. Segundo Planat-Bernard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Sailan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Pénicaud L, Casteilla L. *Circulation*, 2004.

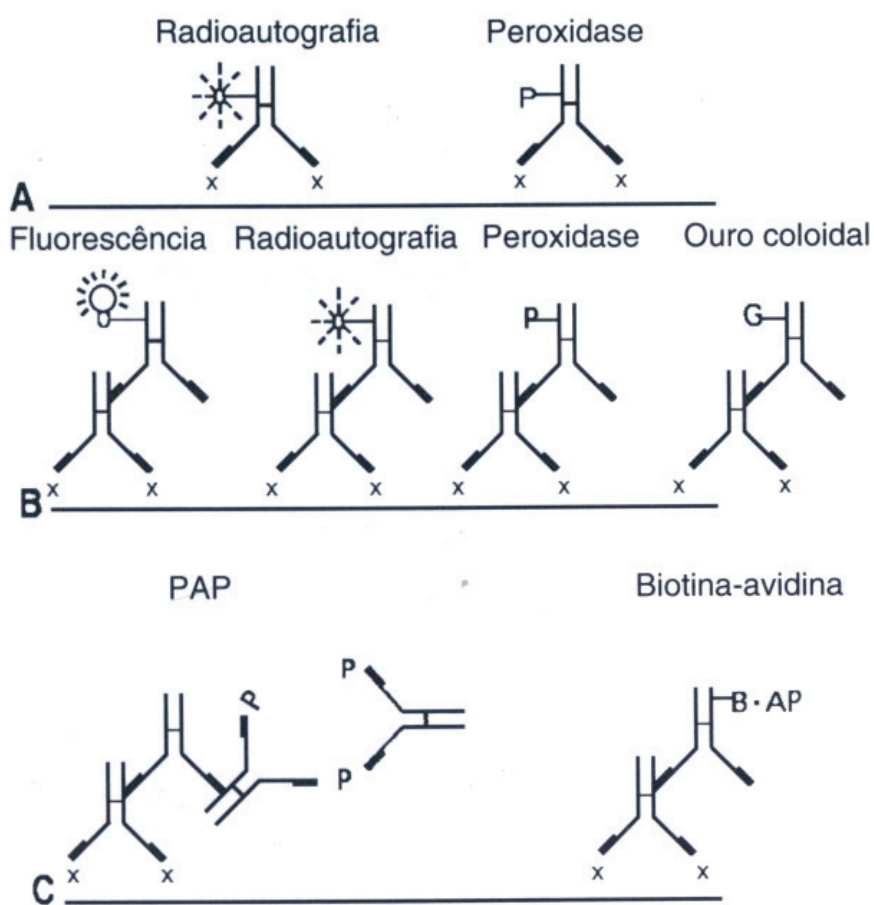


Figura 29: Esquema representando diferentes procedimentos imunohistoquímicos. A: métodos diretos em uma etapa; B e C: procedimentos indiretos ou de vários passos. PAP, peroxidase-antiperoxidase. Segundo De Robertis, 2003.

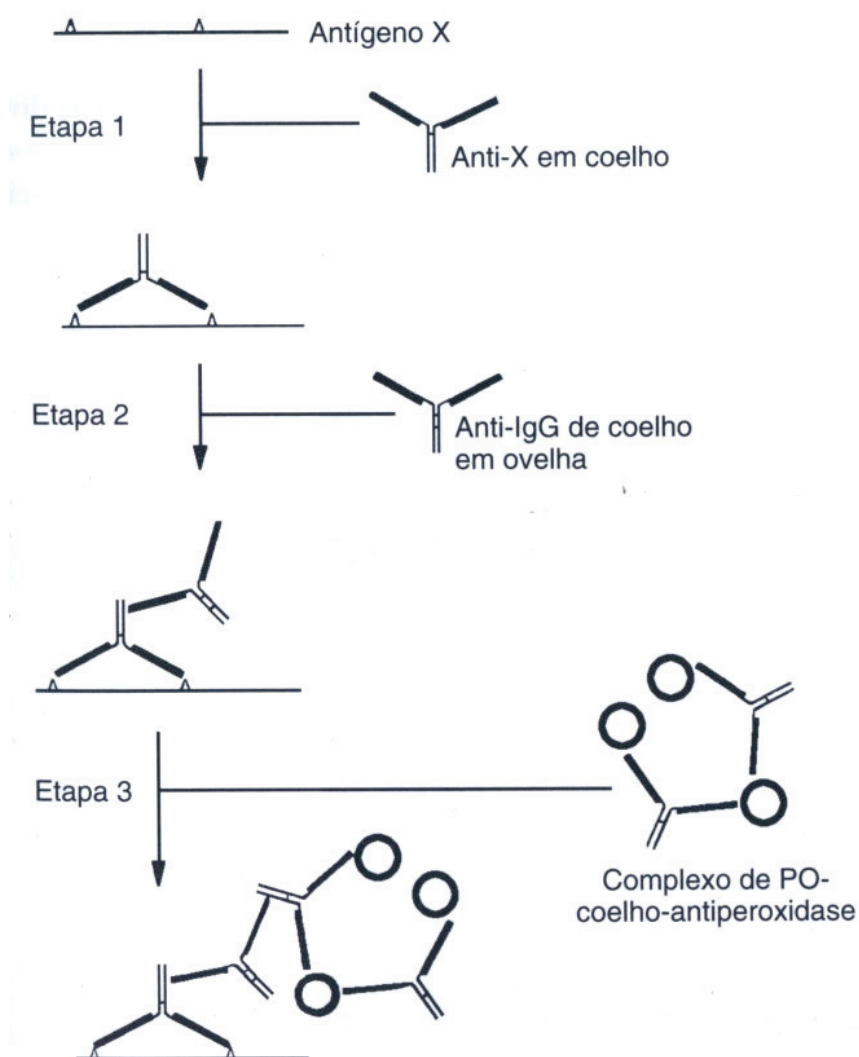


Figura 30: Esquema ilustrativo do método peroxidase-antiperoxidase (PAP): Depois das etapas etapas 1 e 2 que são semelhantes às da figura, na etapa 3 introduz-se o complexo coelho-PAP. Na etapa seguinte, a enzima é revelada pelo método DAB (diaminobenzidina e H₂O₂). Segundo De Robertis, 2003.

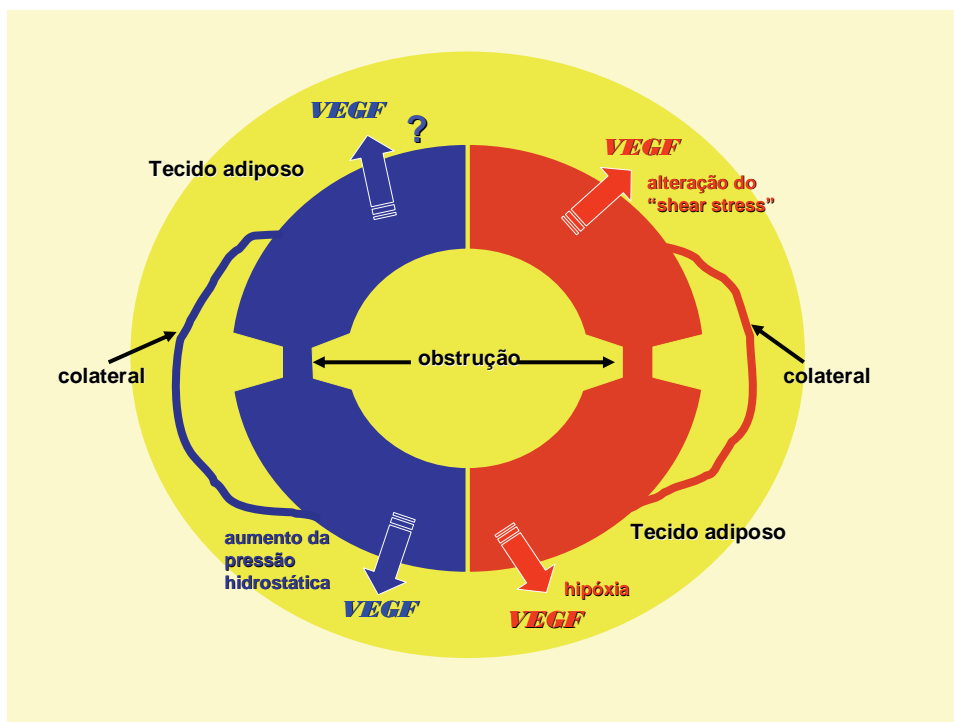


Figura 31: Circularidade do sistema cardiovascular:

(vermelho, arterial e azul, venoso); a expressão do VEGF a partir da necessidade de formar novos vasos e/ou abrir colaterais; mecanismos envolvidos (hipóxia, alteração do “shear stress” e aumento da pressão hidrostática; tecido adiposo circunjacente ao sistema; mecanismo para expressão do VEGF pós oclusão do sistema venoso interrogado (alteração do “shear stress”?)). A expressão no lado arterial é igual a do lado venoso após a obstrução do fluxo sanguíneo?



Figura 32: Indução anestésica com Halotano.



Figura 33: Anestesia com Tiletamina + Zolazepam.



Figura 34: Evisceração dos órgãos intra-abdominais após a laparotomia.

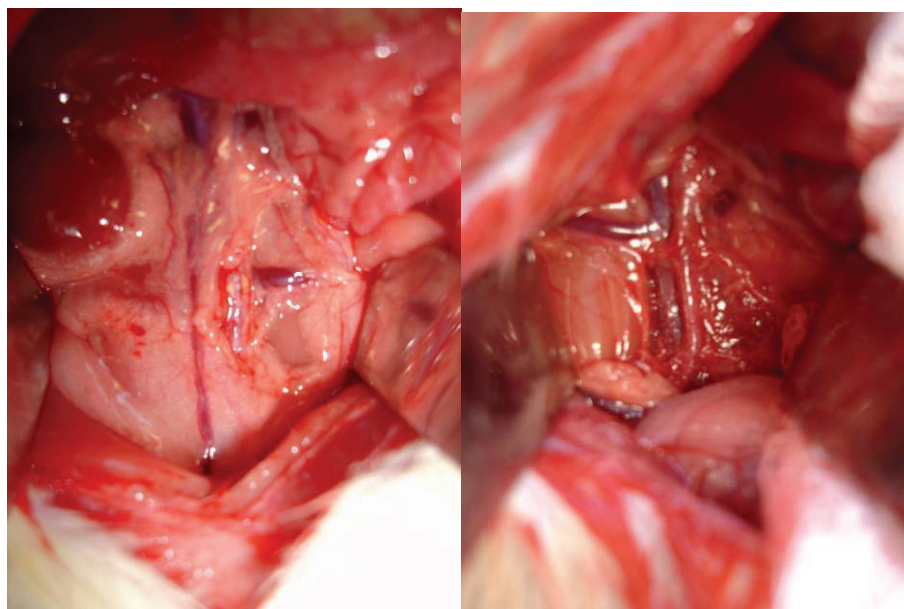


Figura 35: Retroperitônio antes (E) e após (D) a dissecação para exposição da aorta e da cava infrarenais.

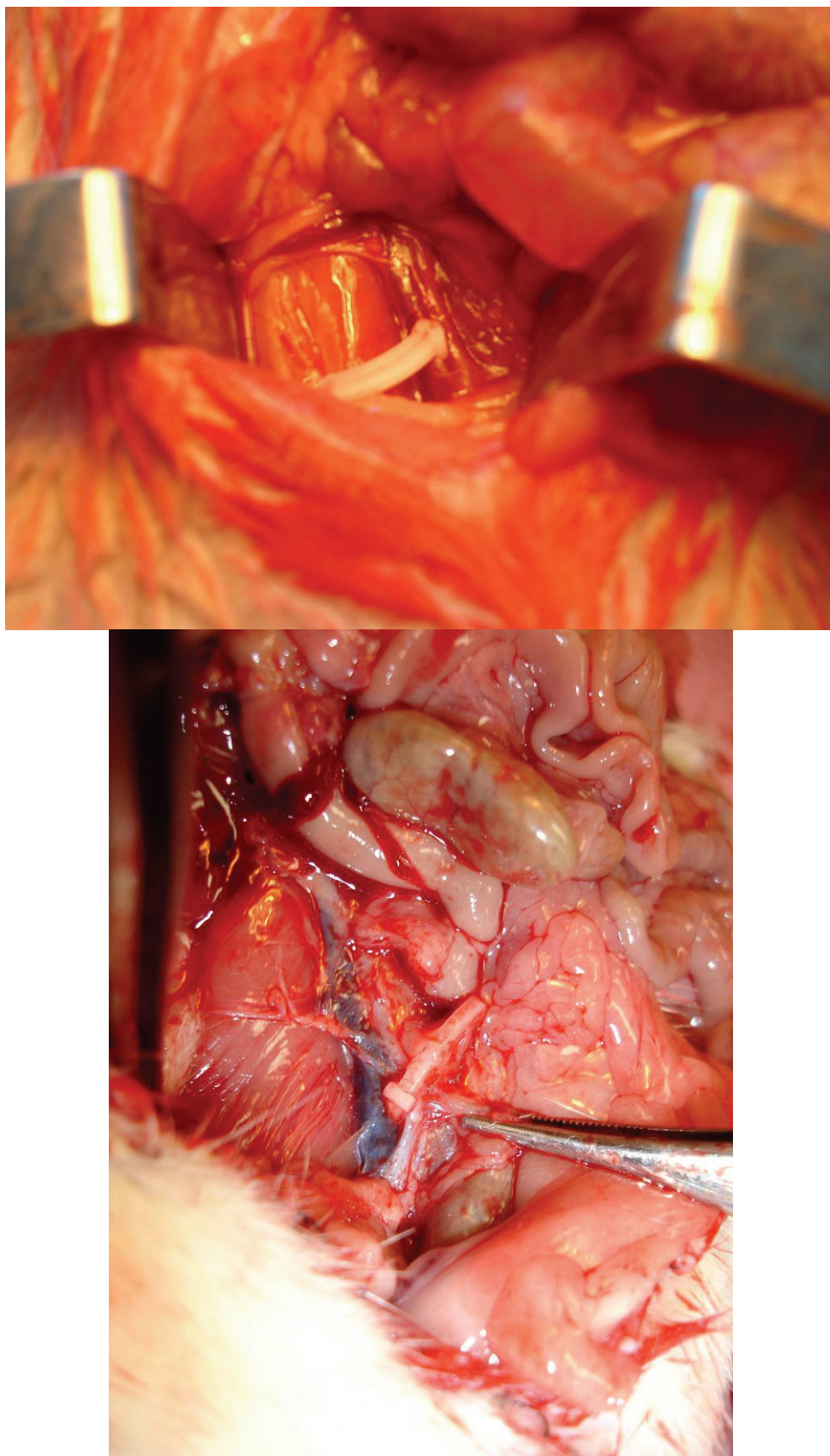


Figura 36: Clips vasculares ocluindo a veia cava infra-renal (acima) e a artéria aorta infra-renal (abaixo).

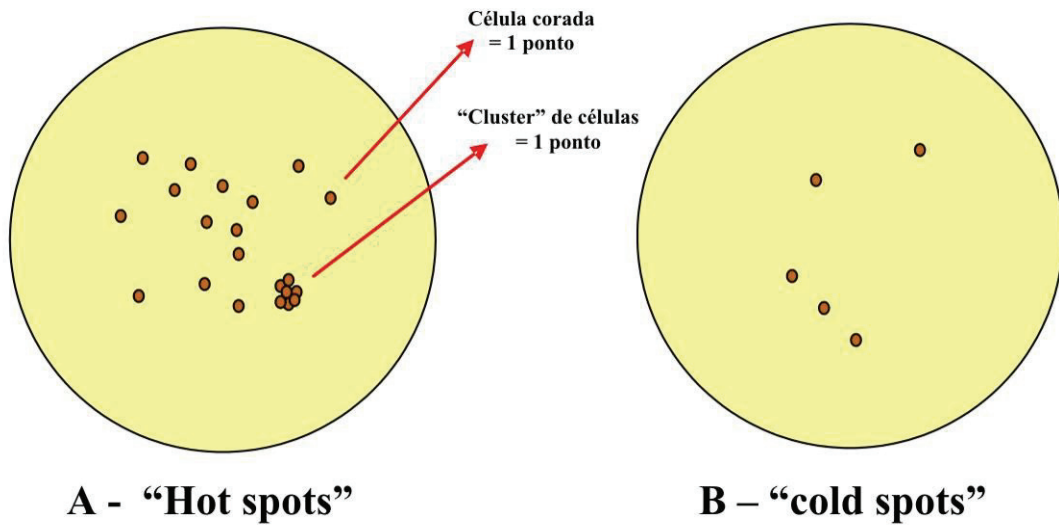


Figura 37: Esquema demonstrando as possibilidades de observação dos campos num aumento de 100 X.

A: campo considerado como “hot spots” foi escolhido e aumentado para 400 X para contagem do número de pontos. Observar que 1 “cluster” de células e 1 célula isolada foram considerados ambos igualmente como 1 ponto . Cinco destes campos foram escolhidos e contados para obtenção da média; B: campo considerado como “cold spot” foi preterido para escolha quando havia outros campos com densidade celular maior (“hot spots”). Todavia, nos casos onde a densidade de células coradas era baixa em toda a lâmina, foram incluídos para interar o número de cinco campos por animal de experimentação.

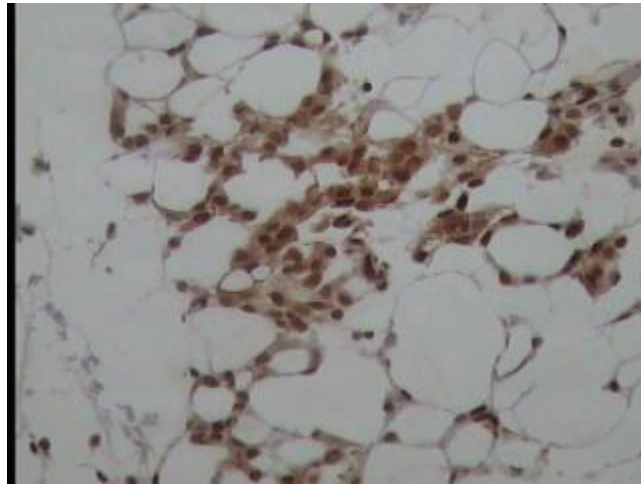


Figura 38: Campo demonstrando grande quantidade de células marcadas imunistoquimicamente (citoplasma marrom) e tecido adiposo.

A proximidade das células umas das outras determinou uma dificuldade de definição dos seus limites. Estes grupos de células foram considerados como “clusters”.

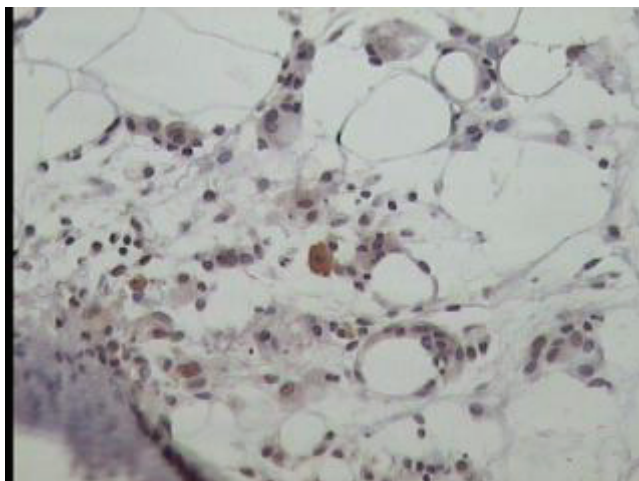


Figura 39: Campo demonstrando a presença de várias células circundadas por tecido adiposo porém com somente uma delas marcada imunoistoquimicamente próxima ao centro.

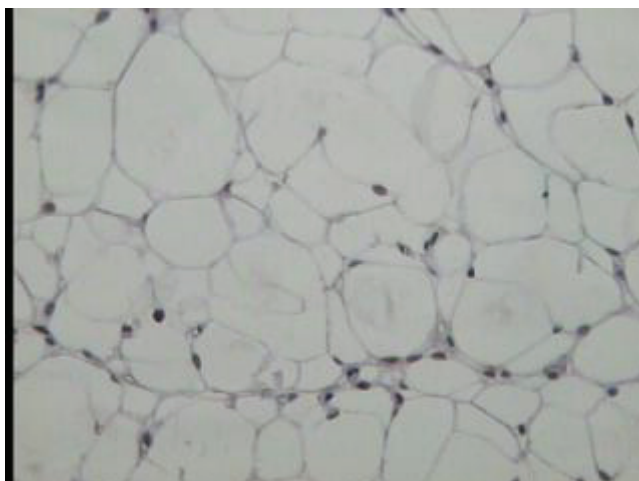


Figura 40: Campo demonstrando praticamente somente células adiposas.

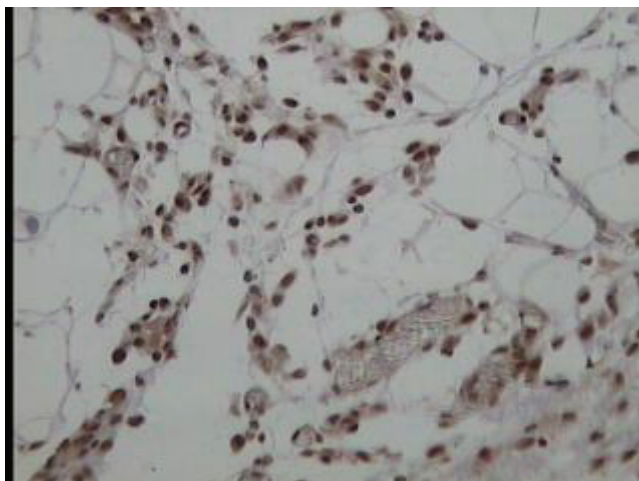


Figura 41: Outro campo demonstrando uma boa quantidade de células marcadas imunohistoquimicamente mas não tão aglomeradas, isso é, com uma melhor condição de contagem individual.

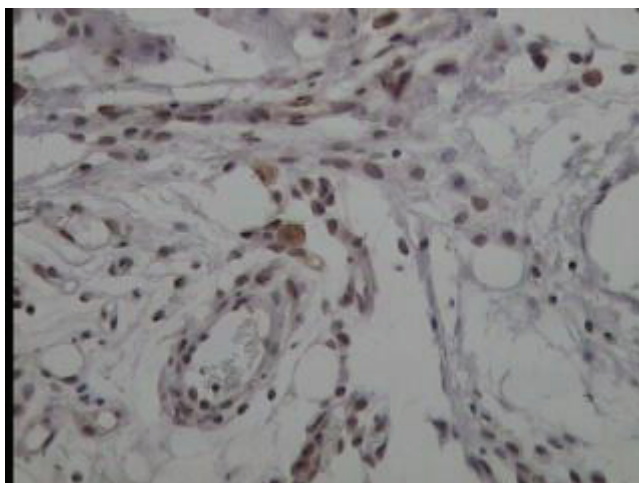


Figura 42: Campo demonstrando várias células porém poucas apresentando marcação imunohistoquímica.

Há a presença de um vaso no quadrante inferior esquerdo com células em sua parede sem apresentar marcação imunohistoquímica.

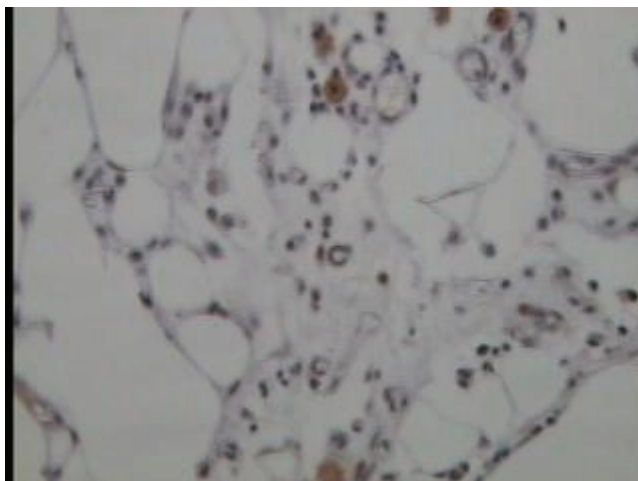


Figura 43: Outro campo demonstrando a presença de várias células porém com poucas delas exibindo marcação imunoistoquímica.

A contagem, neste caso, pode ser feita sem dificuldades, pois as mesmas apresentavam-se afastadas umas das outras.

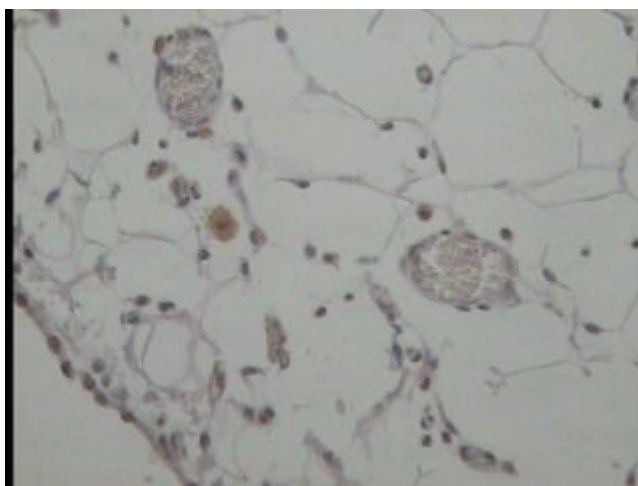


Figura 44: Campo exemplificando apenas uma célula marcada imunoistoquimicamente próxima ao centro da lâmina.

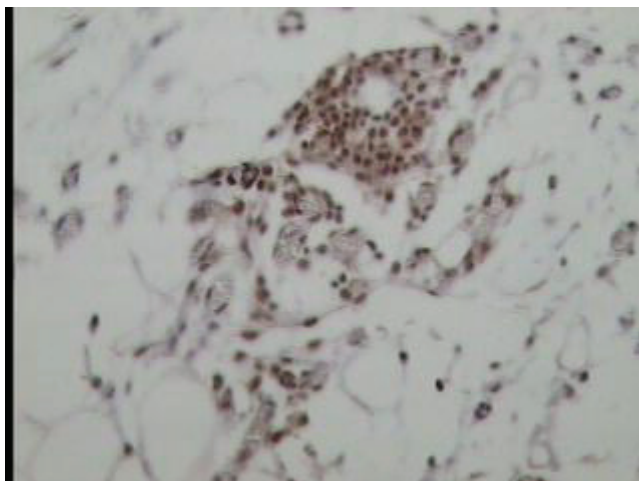


Figura 45: Campo exemplificando um aglomerado de células (“clusters”) na parte central e superior da lâmina.

Neste caso a contagem de células individuais é mais dificultosa.

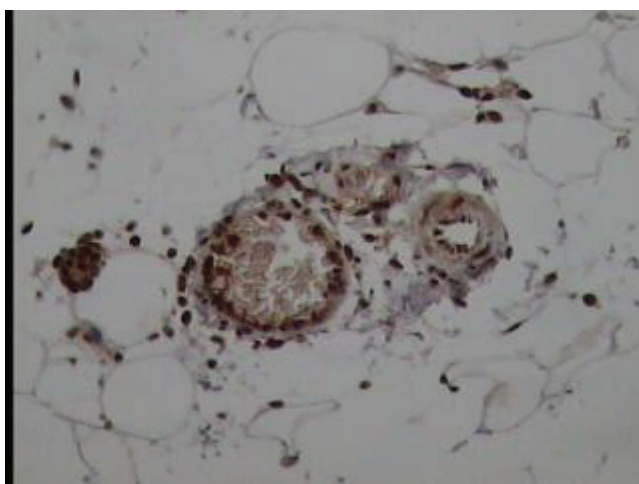


Figura 46: Campo onde aparece a parede de um vaso seccionado e com células marcadas imunoistoquimicamente.