



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

**ESCOLA DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**CÉLULAS-TRONCO MONONUCLEARES E PLASMA RICO EM
PLAQUETAS NO TRATAMENTO DA ISQUEMIA DE MEMBRO INFERIOR
EM COELHOS**

PAULO RICARDO BAGGIO SIMEONI

CURITIBA

2015

Paulo Ricardo Baggio Simeoni

**CÉLULAS-TRONCO MONONUCLEARES E PLASMA RICO EM
PLAQUETAS NO TRATAMENTO DA ISQUEMIA DE MEMBRO INFERIOR
EM COELHOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para a qualificação ao título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita Souza

Co-Orientador: Prof.Dr. Julio Cesar Francisco

Curitiba

2015

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

Simeoni, Paulo Ricardo Baggio
S589c Células-tronco mononucleares e plasma rico em plaquetas no tratamento da
2015 isquemia de membro inferior em coelhos / Paulo Ricardo Baggio Simeoni ;
orientador, Luiz Cesar Guarita-Souza ; co-orientador, Julio Cesar Francisco.
-- 2015.
57 f. ; il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2015
Bibliografia: 45-56

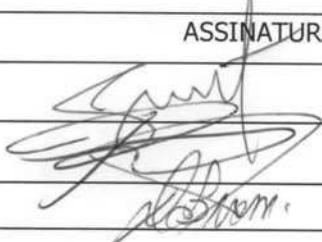
1. Isquemia. 2. Células-tronco. 3. Plaquetas (Sangue). 4. Oclusões arteriais.
I. Guarita-Souza, Luiz César. II. Francisco, Julio Cesar. III. Pontifícia
Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde. IV. Título.

CDD 20. ed. – 610

ATA DA SESSÃO FECHADA DO EXAME DE QUALIFICAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

Exame de Qualificação de Dissertação – Número: **144**

Aos treze dias do mês de novembro de 2015, às 17hs e 00min, reuniu-se a Banca Examinadora, composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita Souza PUCPR – Presidente	
Prof. Dr. Ricardo Corrêa da Cunha - UP	
Prof. Dr. Dalton Bertolim Precoma - PUCPR	

Designada para a avaliação da Qualificação da Dissertação sob o título provisório "**CELULAS-TRONCO MONONUCLEARES E PLASMA RICO EM PLAQUETAS COMO ADJUVANTES NA REVASCULARIZAÇÃO DE ISQUEMIA DE MEMBRO INFERIOR EM COELHOS**" do mestrando **Paulo Ricardo Baggio Simeoni**, ano de ingresso 2013 no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os pareceres a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita Souza

Parecer: APROVADO

Prof. Dr. Ricardo Corrêa da Cunha

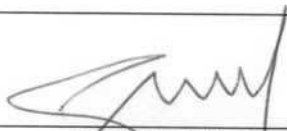
Parecer: APROVADO

Prof. Dr. Dalton Bertolim Precoma

Parecer: APROVADO

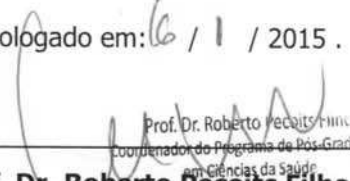
Parecer Final: _____

Observações da Banca Examinadora:



Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita Souza
Presidente da Banca Examinadora

Homologado em: 16 / 11 / 2015 .



Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Escola de Medicina - PUCPR

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr Luiz Cesar Guarita Souza, pela confiança e sua disponibilidade e obrigado por me ensinar o compromisso em contribuir para a ciência.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Júlio Cesar Francisco por sua colaboração, compreensão, incentivo neste trabalho.

À minha família, minha mãe Erina Baggio Simeoni e aos meus irmãos (Fabiola, Priscila e Rossana Baggio Simeoni) agradeço por todo incentivo mesmo à distância e por sua capacidade de acreditar e investir em mim.

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	2
2	JUSTIFICATIVA.....	6
3	OBJETIVOS.....	8
3.1	Objetivo geral.....	8
3.2	Objetivos específicos.....	8
4.	REVISÃO DA LITERATURA.....	10
4.1	Doença Vacular Periférica.....	12
4.1.1	Definição.....	12
4.1.2	Epidemiologia.....	13
4.1.3	Confirmando a presença e a etiologia estabelecida da doença vascular periférica.....	14
4.1.4	Tratamento da doença vascular periférica.....	15
4.1.5	Tratamento Farmacológico.....	15
4.1.6	Tratamento Cirúrgico.....	16
4.1.7	Programa de Exercício.....	16
4.1.8	Terapia Celular.....	17
4.2.	Células- Tronco.....	19
4.2.1	Plasma Rico em Plaquetas PRP.....	22
5	ARTIGO.....	25
6	CONCLUSÕES.....	43
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	45

Anexo – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais de Experimentação.....	57
--	-----------

RESUMO

Introdução: A terapia celular utilizando células-tronco derivadas da medula óssea podem gerar células progenitoras vasculares que contribuem para neoangiogênese e melhora da circulação sanguínea em modelos de lesão vascular periférica.

Objetivo: Avaliar o efeito das células tronco mononucleares da medula óssea (CMMO) associada ao plasma rico em plaquetas (PRP) promove vascularização colateral em membros inferiores isquêmicos em coelhos.

Método: Foram induzidos a isquemia latera esquerda (n=30) coelhos machos da raça Nova Zelândia. Os animais randomizados e divididos em quatro grupos. Foram implantados um total de 10^6 CMMO + PRP. O fluxo sanguíneo foi monitorado por Doppler nos animais isquêmicos e controle. Análise histológica de densidade capilar dos membros isquêmicos foram realizados 30 dias após a indução de isquemia. Os cortes histológicos do músculo gastrocnêmio isquêmico mostraram que índice capilar (capilar da fibra muscular) foi maior no grupo implantado com CMMO+ PRP do que no grupo controle(salina).

Conclusão: Este estudo demonstrou que o implante de CMMO+PRP em membros isquêmicos efetivamente induz a formação de vasos colaterais, sugerindo que esta terapia celular é uma nova estratégia para terapêutica para a doença arterial periférica.

Palavras-chave: Isquemia; doença arterial periférica; células-tronco mononucleares; plasma rico plaquetas.

ABSTRACT

Introduction: Cell therapy using stem cells derived from bone marrow can generate vascular progenitor cells that contribute to neoangiogenesis and improves blood circulation in peripheral vascular injury models.

Objective: The purpose of this study was to determine whether autologous bone marrow mononuclear stem cell (BMCs) associated with platelet rich plasma (PRP) transplantation improves collateral vessels in a rabbit ischemic limb model.

Methods: Unilateral hindlimb ischemia was surgically induced in New Zealand White rabbits (n = 30). The animals were randomized into four groups. A total of 10^6 BMCs + PRP were intramuscularly implanted into each ischemic limb. Blood flow was monitored by Doppler in the ischemic and control animals. Histological analysis of capillary density in the ischemic limbs were performed 30 days after the ischemia induction.

Results: Histological sections of ischemic gastrocnemius muscle showed that capillary index (capillary/muscle fiber) was greater in the BMCs + PRP implantation group than in the control (saline) group.

Conclusions: This study demonstrated that implantation of BMCs + PRP into ischemic limbs effectively induces collateral vessel formation, suggesting that this cell therapy is useful as a novel strategy for therapeutic peripheral arterial disease.

Keywords: Ischemia; peripheral arterial disease; mononuclear stem cell; platelet rich plasma.

1 INTRODUÇÃO

A doença vascular periférica (DVP) teve um enfoque especial nos últimos anos, sendo reconhecido como um problema de saúde pública em virtude ao crescente número de pessoas afetadas. Nos Estados Unidos, estimam-se que oito milhões de americanos sofrem de DVP, com claudicação intermitente sendo a maior prevalência após aos 50 anos de idade(1).

Ao passo que no Brasil essa incidência é de 21,6% em pessoas com mais de 60 anos. Mais especificamente, com relação às veias varicosas ou varizes, estima-se uma prevalência de 58% para as mulheres e 38% para os homens(2).

A DVP promove limitações de locomoção, que podem comprometer a realização de atividades físicas da vida diária uma vez que a doença participa em muitos fatores de riscos, sendo o fator mais importante relacionado à evolução de úlcera no pé(3, 4).

Na maior parte dos casos, os portadores de DVP são do sexo masculino tendo como principal manifestação clínica da doença a claudicação intermitente, definida como dor nas pernas, que piora com a marcha e melhora após a interrupção da mesma (5, 6).

Os avanços terapêuticos disponíveis para o tratamento da DVP ainda são limitados e paliativos, evidenciando assim a necessidade do desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas. Portanto é de suma importância que o angiologista e/ou cirurgião vascular esteja familiarizado

com os conceitos fisiopatológicos e as opções terapêuticas da especialidade(7).

Por outro lado, a necessidade de novas modalidades terapêuticas com a finalidade de melhorar a qualidade de vida do paciente portador de vasculopatia periférica se torna necessária.

Sabe-se que as células-tronco mononucleares da medula óssea (CMMO) são células-tronco adultas indiferenciadas, capazes de autorenovação e reproduzir indefinidamente e, sobre certos estímulos, se transformar em células especializadas de diferentes tecidos ou órgãos de acordo com o meio ambiente local (8, 9).

Além disso, o uso de células-tronco mononucleares como um tratamento para doenças isquêmicas oferece a evidente vantagem de ter oferta abundante e sem possibilidade de rejeição imunológica podendo ser aplicada imediatamente sem a necessidade de isolamento celular, seleção ou passos de cultura (10).

Existem estudos em modelos experimentais na literatura que embasam a possibilidade da neovascularização em tecidos isquêmicos com o transplante as células-tronco mononucleares da medula óssea. Nosso grupo demonstrou em coelhos a capacidade de células da medula óssea induziram neoangiogenese e melhora da claudicação (11).

Contudo o plasma rico em plaquetas (PRP) revela-se como uma técnica inovadora e vantajosa que tem apresentado resultados significativos em diversos ramos da Medicina. Sendo um produto derivado de sangue

autólogo, que possui diversos fatores de crescimento provenientes dos α -grânulos plaquetários estimulam a quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, síntese de colágeno, neovascularização e deposição de matriz extracelular a partir de uma alta concentração de plaquetas em um pequeno volume de plasma(12).

Dados na literatura descrevem que existe um grande problema realacionando a mortalidade das células implantadas logo após o transplante, pois esta taxa pode alcançar níveis de até 90% em 1 semana após o implante(13). Desta forma existe uma relação direta entre o número de células implantadas e o seu benefício funcional (14).

Assim a associação de ambos os tipos celulares pode potencializar suas ações e que a terapia combinada angiogênica com o uso de células-tronco ou PRP revela-se uma alternativa terapêutica decorrente da plasticidade celular na promoção da neovascularização(15).

Este estudo tem por objetivo em avaliar o efeito das CMMO associada ao PRP na cicatrização de feridas em membros inferiores isquêmicos de coelhos e avaliar sua eficiência para futuros tratamentos baseada em terapia celular.

2 JUSTIFICATIVA

Baseado no fato de que as células-tronco mononucleares da medula óssea (CMMO) apresentaram resultados favoráveis em modelos isquemia de membro inferior aguda, a associação das CMMO e o plasma rico em plaquetas pode apresentar os mesmos resultados?

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito das células tronco mononucleares da medula óssea (CMMO) associada ao plasma rico em plaquetas (PRP) na oclusão arterial crônica.

3.2 Objetivos específicos

Estudar uma possível neovascularização sobre os efeitos da associação celular, 30º dias da lesão vascular do membro inferior desses animais.

- Comparar o efeito do tratamento PRP associado à CMMO entre si e com seus respectivos grupos controle.

4 REVISÃO DA LITERATURA

Uma das possibilidades de induzir uma isquemia crítica dos membros inferiores em modelos animais é através da obstrução permanente ou temporária da artéria femoral no qual interferem na organização celular do músculo gastrocnêmio.

Estudo realizado por Yuyama *et al.* em 2002, com 47 pacientes portadores de isquemia crítica unilateral, tratados com células mononucleares da medula óssea, relataram melhora significativa no índice tornozelo/braço da pressão transcutânea de oxigênio, evitando a amputação de dedos de 15 pacientes do total de vinte pacientes submetidos a terapia celular(16).

No Brasil Dalmo *et al.* em 2009 apresentaram um caso de transplante de células-tronco da medula óssea em 6 pacientes com isquemia crítica de membro inferior, com excelente resultado após 15 meses de seguimento com cicatrização das lesões e supressão total da dor em repouso(17, 18).

Pesquisadores têm estado à procura de modelos animais que apresentam lesões vasculares similares as dos seres humanos. O coelho e o rato são os que têm apresentado melhor similaridade (19).

Análises histológicas experimentais em coelhos transplantados com células-tronco mononucleares ou plasma rico em plaquetas indicam reforçar a resposta de angiogênica à isquemia em nível arteriolar e capilar, levando a um aumento significativo da circulação colateral regional(20).

É neste contexto que várias terapias estão sendo estudadas na tentativa de recuperação da doença arterial obstrutiva periférica .

Uma das perspectivas é a terapia celular associada, que possa reparar o tecido lesionado, implantando células com potencial de multiplicação e diferenciação em células contráteis e endoteliais na isquemia crítica dos membros inferiores, sugerindo uma angiogênese e uma capacidade de regeneração tecidual(21).

4.1 Doença Vascular Periférica

4.1.1 Definição

A doença vascular periférica (DVP) é caracterizada por uma isquemia dos vasos dos membros superiores e inferiores devido a obstruções existentes nas artérias(22).

As obstruções normalmente são causadas pelo acúmulo de partículas de lipídios e elementos fibrosos nas paredes dos vasos e, gradualmente vão causando um estreitamento no seu interior e como consequência a diminuição do aporte de sangue e oxigênio que irriga esses membros(23).

Recentemente introduziu-se o conceito de que, adesão de leucócitos, agregação, fibrinólise, inflamação e disfunção endotelial estão diretamente relacionados com todos os estágios da aterosclerose. Os principais fatores de risco para doença vascular periférica são: hipertensão arterial, sedentarismo, fatores genéticos, aumento do colesterol sanguíneo e, principalmente, diabetes e tabagismo (24).

4.1.2 Epidemiologia

A prevalência de doença vascular periférica (DVP) está aumentando em todo o mundo. Há uma variedade de razões para isso, incluindo o envelhecimento da população, sedentarismo, excesso de peso, hábitos tabagistas, doenças cardiovasculares e falta de tratamento adequado dos fatores de risco, como hipertensão e diabetes(24).

Nos Estados Unidos a prevalência da DVP é de 12% da população em geral, afetando de 8-12 milhões de pessoas com mais de 65 anos, afetando até 7,6 milhões de americanos(25).

Nos países em desenvolvimento, a DVP atinge 3 a 10% da população com mais de 50 anos, sendo que, na presença dos fatores de risco como o sedentarismo, diabetes e o tabagismo nos maiores de 70 anos combinado com um grande aumento nos fatores de risco de arteriosclerose ajudaram a conduzir a pandemia da doença vascular periférica (26).

No Brasil, estudos sobre a prevalência da DVP ainda são escassos, mas sabe-se que o aumento da população de idosos e a predominância de um estilo de vida que associa estresse, fumo, sedentarismo e alimentação inadequada é acompanhado pelo aumento das doenças cardiovasculares em geral (27).

Como consequência do crescimento mundial considerável com o processo natural de envelhecimento humano com arritmias, insuficiência cardíaca, insuficiência renal, icto (acidente vascular cerebral) ou obstrução

das artérias periféricas, as hospitalizações por doença vascular periférica têm aumentado durante muitos anos (28).

4.1.3 Confirmando a presença e a etiologia estabelecida da doença vascular periférica

Embora o diagnóstico da DVP, seja baseado predominantemente na história e exames (complementados por testes de laboratório padrão, arteriografia do membro inferior, angiorressonância magnética ou exames com ecodoppler duplex), o diagnóstico é sempre aparente (29).

Biomarcadores são extremamente úteis porque ainda não se sabe precisamente porque os pacientes diabéticos tem uma maior predisposição para desenvolver a doença aterosclerótica vascular. O nível do peptídeo Dímero-D plasmático e a proteína C reativa dos pacientes ajuda os médicos a determinar se a trombose venosa profunda (TVP) e/ou embolia pulmonar está presente(30).

Os pacientes com D-dímero <500 ng/ml não são susceptíveis de sofrer os eventos tromboembólicos, enquanto que a DVP é provável naqueles com níveis > 500 ng ml (31).

4.1.4 Tratamento da doença vascular periférica

4.1.5 Tratamento Farmacológico

- Anticoagulantes e Antiagregantes plaquetários

Para indicação de medicações que tenham como objetivo diminuir a incidência infarto agudo do miocárdio (IM) (infarto do coração), acidente vascular cerebral (AVC) e de fenômenos tromboembólicos. Um dos exemplos é o antiagregante plaquetário Clopidogrel que age no sangue reduzindo a chance de formação de trombos (coágulos sanguíneos) (32, 33).

- Uso de Inibidores da Fosfodiesterase

Os inibidores da fosfodiesterase III atuam reduzindo a degradação da adenosina monofosfato (AMP) cíclico, produzindo inibição da agregação plaquetária e vasodilatação. O Cilostazol pode reduzir os níveis lipídicos do sangue em pacientes promovendo redução nos triglicérides de 29,3 mg/dL (15%) e aumento de 4,0 mg/dL (cerca de 10%) na lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), com influência na função cardiovascular(32, 34)

- Derivado da dimetilxantina

Dentre os agentes que melhora as propriedades do fluxo sanguíneo, a pentoxifilina tem sido a mais estudada. A pentoxifilina é um derivado da dimetilxantina, usado como agente vasodilatador periférico, hemorreológico, que promove à inibição da fosfodiesterase e ao aumento resultante do AMP

cíclico nos glóbulos vermelhos. Consequentemente, a pentoxifilina melhora a microcirculação nutritiva em áreas com comprometimento do fluxo sanguíneo (32, 33).

4.1.6 Tratamento Cirúrgico

- Revascularização angioplastia transluminal percutânea

Nesta intervenção, é inserido um catéter na artéria femoral propiciando maior rapidez e reprodutibilidade, fácil localização pelo maior calibre do vaso, então um pequeno balão situado na sua extremidade é insuflado para abrir o vaso estenosado. Frequentemente, um implante metálico denominado “stent” é utilizado como armação de suporte da parede da artéria depois de esta ser aberta com o balão. Em casos mais críticos, deve desviar cirurgicamente a corrente sanguínea do vaso estenosado com uma secção de uma veia retirada da perna ou com um enxerto sintético (35).

4.1.7 Programas de exercício

Os estudos demonstraram que prescrição de exercícios para pessoas com condições crônicas visa aumentar o desempenho físico promovendo a saúde e, melhorar a qualidade de vida. O programa de exercícios para promover benefícios aos portadores de DVP deve ter uma

duração de pelo menos 30 minutos todos os dias por um período de seis meses e fazer parte do tratamento da doença (36).

O exercício tem sido registrado como uma estratégia simples e promissora, muitas pessoas preferem a marcha ajudando a manter a capacidade de funcionamento dos membros livres de dor. Pode igualmente experimentar andar de bicicleta (estacionária ou normal) e o nado, para melhora do metabolismo músculo-esquelético, facilitando a utilização do oxigênio e permitindo maior capacidade de desempenho em atividades físicas (37).

4.1.8 TERAPIA CELULAR

Das linhagens de células-tronco somáticas estudadas até o momento, as CMMO são as que apresentam maior plasticidade podendo originar tecidos mesodermis e não mesodermis (38). Acredita-se que as CMMO originam outras células por transdiferenciação, ou seja, elas alterariam sua expressão gênica para a de uma linhagem celular completamente diferente, originando tipos celulares distintos (39). Outra proposta é de que elas podem fusionar-se a uma célula alvo adulta, assumindo o padrão de expressão gênica da célula a qual se uniu, o que favorece sua utilização na terapia celular *in vivo*.

Tateishi-Yuyama e colaboradores em 2002, publicaram o primeiro estudo clínico utilizando células-tronco autólogas mononucleares da medula

óssea em 52 pacientes com isquemia crônica dos membros. Baseando-se em modelos experimentais de isquemia de membro inferior de estudos anteriores, demonstraram eficácia e a segurança do método e sua capacidade de diferenciação angiogênica.

Este mesmo autor relata que após o transplante das CMMO houve uma melhora significativa da dor em repouso desses pacientes, assim como o fechamento de feridas isquêmicas (16).

O estudo multicêntrico randomizado TRAFFIC (recombinante fator de crescimento fibroblástico-2 para claudicação intermitente) em fase II, demonstrou que a terapêutica angiogênica com fator de crescimento vascular (FGF-2) recombinante via intra-arterial apresentaram resultados não significativos estatisticamente com relação ao desfecho primário; a amputação, entretanto, demonstrou melhora em relação a catrização das feridas (40).

Nas últimas décadas diversos estudos têm sido publicados, citando os resultados *in vitro* e *in vivo*, considerando a relevância do potencial do uso das células-tronco autólogas (fração mononucleares da medula óssea) no transplante em doença arterial periférica de membros inferiores (41).

A literatura afirma que em resposta à isquemia crítica o número de células endoteliais progenitoras circulantes aumenta e são atraídas para os sítios de isquemia, contudo esses resultados apresentados com a terapia celular ainda representa uma dificuldade a ser transposta.

4.2 Células-Tronco (CT)

Células-tronco são definidas como células não especializadas que possui capacidade de proliferação indefinida, auto renovação e de se diferenciarem em tecidos especializados; sendo que, nos últimos anos, suas propriedades e funções têm sido largamente estudadas quanto à embriogênese dos organismos vivos, ao câncer, à cicatrização tecidual e à regeneração (42).

As CT possuem capacidade de se diferenciar de acordo com o meio ambiente local. As células da medula óssea podem sofrer dois processos de diferenciação: as células mononucleares indiferenciadas e as multinucleares (43, 44).

As células-tronco presentes na frações mononucleares (CMMO) constituem uma linhagem de células-tronco adultas, somáticas e podem ser encontradas na medula óssea e no sangue periférico, apresentando grande plasticidade, podendo se diferenciar em qualquer tipo celular, sendo responsáveis pela manutenção e reparação dos tecidos (45, 46) .

Dentre as CMMO, as células hematopoiéticas são funcionalmente definidas como células capazes de reconstruir e manter todas as linhagens sanguíneas como (linfócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, células vermelhas e plaquetas) e possuem determinados marcadores de membrana como por exemplo Sca-1, c-Kit, e CD 34+ (47).

As células-tronco mesenquimais (CTMs), podem ser encontradas na medula óssea, no tecido muscular, pele e no tecido adiposo, sendo caracterizadas pelo seu potencial de diferenciação em células musculares, hepatócitos, osteócito, tecido adiposo, condrócitos e estroma, apesar de representarem menos de 0,01% das células nucleadas da medula óssea, essas células são facilmente expandidas *in vitro* por demonstrarem ter a capacidade de diferenciação em diversos tecidos quando cultivadas em meios de cultura apropriados (48, 49).

Em condições adequadas de cultivo, estas células exibem morfologia fibroblastóide com características de adesão em substrato plástico, autorrenovação e diferenciação em tipos celulares distintos (45, 46, 50), podem ser expandidas por até 40 gerações e mantendo a capacidade pluripotente, embora a taxa de mitose diminua e a probabilidade de mutação aumente, o que limita seu uso clínico nestas condições (51).

Existem dois tipos de células-tronco: as células-tronco embrionárias e as células-tronco adultas.

As células-tronco embrionárias são encontradas em estágios iniciais pós-fertilização, por volta do 4º ao 5º dia, derivadas da camada interna do blastocisto, podendo ser classificadas como totipotentes ou pluripotentes, conforme seu potencial de diferenciação. Durante a embriogênese, linhagens celulares distintas são formadas por essas células pluripotentes. Atualmente, também há a possibilidade de se produzirem embriões, através da clonagem para fins terapêuticos (52).

Apesar de as células-tronco embrionárias terem mostrado a sua real capacidade de diferenciação em vários tipos celulares, não devemos esquecer que ainda permanecem grandes limitações para seu uso (53).

As células-tronco adultas da medula óssea são consideradas células multipotentes e com capacidade de diferenciação mais limitada, não tendo por isso, capacidade de formar todos os tipos de tecido de um indivíduo, apesar de recentemente ter sido relatado que o potencial de diferenciação dessas células é bem maior do que se pensava anteriormente. Estas células podem ser extraídas de diversos tecidos adultos, tais como: medula óssea, sangue, placenta, fígado, sistema nervoso, epitélio, cordão umbilical, etc (54).

Estas células apresentam condições vantajosas pela simplicidade do procedimento em que células extraídas da medula óssea podem ser isoladas e transplantadas no defeito ósseo, considerado um procedimento pouco invasivo e não requer que o paciente seja imunossuprimido (55).

Muitos estudos necessitam ser realizados para melhorar a compreensão dos fatores de crescimento e quais suas interações, efeitos e mecanismos, como também compreender o fenômeno de migração das células ao ambiente de cicatrização (56). Assim, dentre os diversos meios de terapia celular, o tratamento regenerativo a partir do transplante autólogo de células-tronco mononucleares apresenta-se como uma promissora alternativa aos métodos regenerativos periodontais convencionais (41, 57).

4.2.1 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

O PRP é um concentrado de plaquetas preparado através da centrifugação obtido a partir do sangue autólogo do paciente e também é conhecido como plasma enriquecido de plaquetas (PeRP), concentrado plaquetário (PRC) ou gel de plaqueta autólogo (58).

Diversos estudos demonstram que os fatores de crescimento presentes (FCs) no PRP como o PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), TGF- α e TGF- β (fatores de crescimento de transformação α e β) são citosinas provenientes do sangue com importante papel na proliferação e diferenciação, quimiotaxia e angiogênese celular (59, 60).

Os diversos FCs presentes no PRP criam a expectativa como opção terapêutica, que quando introduzidos no local da lesão, recrutam células envolvidas na diferenciação e proliferação celular promovendo a reparação tecidual (61).

Entre os efeitos teciduais dos FCs no PRP observa-se peptídeos sinalizadores responsáveis pela regulação do metabolismo celular, que desencadeiam a ativação sobre leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, fibroblastos e estimuladores dos processos celulares de mitogênese, nas células endoteliais e musculares lisas, estimulando a angiogênese (62, 63).

O efeito terapêutico do PRP é decorrente principalmente da degranulação dos grânulos α contidos nas plaquetas, que ocorre principalmente na primeira hora e que continua aproximadamente por sete dias, período de vida das plaquetas (64).

O procedimento do uso do PRP inicia com a aplicação das plaquetas no local lesionado ativando os FCs que provocam aumento da transcrição gênica e produção de proteínas as quais se aderem ao colágeno formando um tampão plaquetário, desencadeando a proliferação e diferenciação celular.

O resultado da ação conjunta dos FCs derivados das plaquetas é a sinalização para que as células mesenquimais e epiteliais migrem para o local, sofrendo divisão mitótica e estimulando a síntese de matriz e colágeno, acarretando cicatrização mais rápida e eficiente (63).

Estudos publicados em medicina e na odontologia envolvendo a aplicação PRP vem sendo usado há algum tempo, particularmente em procedimentos cirúrgicos maxilofaciais, pé e perna diabética, cirurgia cardíaca e vasculares, na reparação óssea, neurocirúrgicos e de cirurgia plástica (65).

Na maior parte destes estudos foram demonstrados resultados positivos e encorajadores. Existem vários protocolos para obtenção do PRP para moldar-se na concentração plaquetária ideal e maior liberação de FCs, fatores que são os responsáveis imediatos pelo processo cicatricial(66).

É indispensável a escolha de protocolo baseado em análises quantitativa e qualitativa de plaquetas para ter-se sucesso clínico. Há vários protocolos de centrifugação que concentram e capturam as plaquetas, visando a obtenção do PRP(16).

**Attenuation of hindlimb ischemia after associated autologous
transplantation of bone marrow mononuclear cells and platelet rich
plasma.**

Paulo R. B. Simeoni¹ • Julio C. Francisco^{1,2,4*} • Rossana B. Simeoni¹ • Marco
A. Cardoso^{2,3} • Ricardo C. Cunha⁴ • Bassam F. Mogharbel² • Joao C.
Minozzo^{1,2} • Vivian F. do Amaral¹ • José R. Faria-Neto¹ • Katherine A. T.
Carvalho² • Luiz C. Guarita-Souza¹

¹ Pontifícia Universidade Católica do Paraná, ² Instituto de Pesquisa Pelé
Pequeno Príncipe, ³ Universidade Federal do Paraná, ⁴ Universidade
Tecnológica Federal do Paraná, – Curitiba – Paraná – Brasil

Correspondence to:

* Julio Cesar Francisco

Cell Therapy and Biotechnology in Regenerative Medicine Research. The
Pelé Pequeno Príncipe Institute- Child and Adolescent Health Research -Av.
Silva Jardim, 1632, Curitiba – PR, Brasil CEP 80250-060

Email: julio.francisco@pucpr.br

ABSTRACT

Objective: The purpose of this study was to determine whether autologous bone marrow mononuclear stem cell (BMCs) associated with platelet rich plasma (PRP) transplantation improves peripheral collateralization in a rabbit ischemic limb model.

Methods: Unilateral hindlimb ischemia was surgically induced in New Zealand White rabbits (n = 30). A total of 10^6 BMCs + PRP were intramuscularly implanted into each ischemic limb. Blood flow was monitored by Doppler in the ischemic and control animals. Histological analysis of capillary density in the ischemic limbs was performed 30 days after the ischemia induction.

Results: Histological sections of ischemic gastrocnemius muscle showed that capillary index (capillary/muscle fiber) was greater in the BMCs + PRP implantation group 30 days after the ischemia induction than in the saline group.

Conclusions: This study demonstrated that implantation of BMCs + PRP into ischemic limbs effectively induces collateral vessel formation, suggesting that this cell therapy is useful as a novel strategy for therapeutic peripheral arterial disease.

Keywords: Angiogenesis; Cell therapy; Hindlimb ischemia; PRP; BMCs.

Introduction

Obstructive Peripheral Arterial Occlusive Disease (PAOD) of the inferior members is a worldwide health problem and its prevalence is estimated in 27 million of people in Europe and North America (1).

PAOD development is a multifactorial process with a variety of severe manifestations as ischemic rest pain, ulcerations, and gangrene increasing the risk of claudication, poor wound healing, limb amputation, and stroke (2). The therapy for PAOD has increased in the last decades with the introduction of regenerative therapy. The use of stem-cells, vascular endothelial growth factor (VEGF), and fibroblast growth factor FGF significantly improved symptoms and hemodynamics variables in the treated limbs, as reported in the literature (3).

Bone marrow mononuclear cells (BMCs) or Platelet rich plasma (PRP) therapies are delivered locally into affected tissues and can contribute to the regeneration of ischemic tissues and enhance the neovascularization of ischemic hindlimbs through both, cellular and paracrine mechanisms (4) (5).

Preclinical studies suggest that BMCs transplantation in ischemic limbs increase the number of collateral vessels and are dependent of the supply of endothelial progenitor cells and multiple angiogenic factors (6). Accordingly, the objective of this study is to analyses the effects of associated transplant of BMCs and PRP on PAOD therapy.

Materials and Methods

Schedule of the Study

Time schedule of the study is shown in Fig. 1.

Animals

Thirty New Zealand male rabbits (1.5Kg - 2.0Kg) were used. The animals were kept in cages under controlled conditions of temperature and light-dark cycle of 12 h, with free access to food and water. The Animal Experimentation Ethics Committee of the Pontificia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) approved all experimental protocols used in this study (596).

Experimental Design and Animal Hindlimb Ischemia Model

The rabbits (n=30) were subjected to unilateral limb ischemia and randomly divided into 3 groups (n=10/group). No rabbit died during the experimentation. The control group received saline, the GPRP group received autologous PRP, and the GBM+PRP group received autologous BMCs and PRP. The saline, PRP alone or BMCs + PRP were administered into the ischemic muscles 7 days after surgery. Animals were anesthetized as described before (7). The left femoral artery was completely excised from its proximal origin to its bifurcation formed by the saphenous and popliteal arteries, as previously described (8, 9). A total of 5×10^6 BMCs and PRP was injected intramuscularly in treated animals into 3 different sites of the gastrocnemius muscles at the medial thigh of the ischemic hindlimbs (10). The rabbits were euthanized 30 days after the intramuscular injection by an

intravenous overdose of pentobarbital. The hindlimbs were opened and gastrocnemius muscles were isolated.

Preparation of PRP and Doppler vascular Analysis

8–15 mL of central auricular artery blood were collected and harvested 7 days after surgery using heparin as anticoagulant, according to the method previously reported (11). Rabbit GBM was aspirated from the right iliac crest. BMCs were isolated by centrifugation through a Histopaque density gradient Sigma (St Louis, USA) according to Boyum (12). After centrifugation, cell analysis was conducted by cell counting and fluorescence activated cell sorting (FACS). Cell counting was performed using an automatic blood counter Sysmex XE2100 (Co, Kobe, Japan). BMCs phenotypes were detected by flow cytometry, using FACS Calibur (Becton Dickinson, USA). All antibodies for flow cytometric analysis were purchased from Biolegend (San Diego, CA). The vascular evaluations were performed before hindlimb ischemic surgery and 30 days after saline, PRP alone or BMCs + PRP administration.

Muscle Histology and Immunohistochemistry (IHC)

Hindlimbs of euthanized rabbits were dissected and muscle tissue specimens were harvested and fixed in formalin. Histopathologic analysis of the gastrocnemius muscle in the medial thigh was performed. Specimens were paraffin embedded and cut into 5 µm slices. The morphometric analyses were performed through the program IN Cell Investigator™ software (GE

Healthcare, USA). The angiogenesis was measure by IHC positively stained vessels using anti-human CD31 (Molecular Probes, USA.) antibody conjugated with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). The total amount of vascularization was determined as the number of capillaries per fiber in 4 to 6 fields/muscle.

Statistical analysis

Statistical significance was evaluated by the Tukey-Kramer method for multiple comparisons after the confirmation of data variances equality by the Brown-Forsythe test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Data are shown as mean $\pm$ SE and were performed using GraphPad Prism v.6.0 (GraphPad Software, Inc) software.

Results

The rabbits used in the present study showed no adverse effects related to surgery or therapy combined. Within 3 days of femoral excision, rabbits were noted to have mild pallor of the hindlimb compared to the sham operated, as well as small (2 mm) superficial skin ulceration on the plantar surface of the left paw with no evidence of critical limb ischemia, infection or gangrene. Both pallor and ulceration qualitatively improved over the course of the study, with no clear difference among groups.

Analysis of the total nuclei amount per fiber showed a significantly increase in cell number in the GPRP group when compared to the saline group

(47.66 ± 18.06 vs. 13.83 ± 7.53 , $p < 0.05$ and was significantly greater in the GBM+PRP group than in the saline group (93.60 ± 28.63 vs. 13.83 ± 7.53 , respectively; $p < 0.01$ vs. saline) fig. 2.

More capillaries were detected in the ischemic muscle of GBM+PRP group when compared with that in the control group at day 30 after cells therapy implantation or saline injection (Fig.3). Capillary density score of the ischemic hindlimb were significantly increase in the GPRP group than in the saline group ($2.3 \times 10^6 \pm 1.0 \times 10^6$ vs. $1.9 \times 10^6 \pm 5.2 \times 10^5$ $p < 0.05$ and GBM+PRP group than in the saline group ($3.31 \times 10^6 \pm 1.6 \times 10^6$ vs. $1.9 \times 10^6 \pm 5.2 \times 10^5$, respectively; $p < 0.05$ vs. saline).

Discussion

Tissue Engineering provides a variety of strategies to effective therapeutic angiogenesis as the local delivery of cells or bioactive factors that could promote angiogenic mechanisms in vivo (13). Our results show that the combined treatment with BMCs and PRP can enhance collateral vessel formation by improving cell proliferation.

Autologous BMCs, when transplanted in the hindlimb, can differentiate into smooth muscle cells and endothelial cells (14). Different growth factors in PRP have diverse roles in angiogenesis and restoration of blood flow after hindlimb ischemia and may offer a suitable microenvironment for BMCs to promote proliferation and differentiation (5, 15). According to our data, we can suggest that the combined therapy using GBM+PRP participated in angiogenesis by the secretion of trophic factors.

Yang et al. reported that both types of cells, BMCs and PRP, can divide and proliferate in the transplanted region and differentiate into corresponding cells under local microenvironment so as to replace injured cells(16). Regarding clinical efficiency, preclinical studies have indicated that a variety of growth factors promote the development of collateral arteries, a concept called therapeutic angiogenesis (15).

The histological findings showed an increase in capillary density after BMSc + PRP therapy in hindlimb ischemia, demonstrated via IHC staining and accompanied by an augmentation in cell nuclei amount (confirmed via DAPI staining).

Our finding indicate that the combination of BMCs + PRP results in a significantly better healing effect on ischemic hindlimbs when compared to the other 2 groups tested. However, the beneficial effect of PRP therapy alone appears to be transient since the histological assessment of ischemic repair was not significantly different 30 days after cell transplantation, when compared to control group (fig.2). Several researchers believe that endothelial progenitor cells included in BMCs differentiated into endothelial cells and, after transplantation in the injury region, contributes to cell survival and angiogenesis (17, 18).

Autologous BMCs and PRP are a rich source of growth factors that stimulates angiogenesis in ischemic muscle (19). Moreover, angiogenic factors, including VEGF and epithelial growth factor (EGF), are also released from injured tissue recruiting BMCs to replace injured tissue (20, 21).

Previous studies similarly demonstrated that there is an additional contribution derived from BMCs or PRP progenitors which are mobilized in the setting of limb or myocardial ischemia, migrate to ischemic tissue, and are actively incorporate into new vessels (22). In preclinical ischemic animal model, it is suggested that collateral vessels might need to be induced for weeks or months before the newly formed vasculatures mature (23).

Our data concurs with the findings mentioned above supporting the hypothesis that PRP, in combination with BMCs, have a modulating effect on angiogenesis through the growth factors involved in wound healing (24).

In the present study, we demonstrated that BMCs + PRP possesses pro-angiogenic properties in hindlimb ischemia in rabbits through the increase in the amount of peripheral collateral vessels and mature vasculatures formed ($p < 0.01$) 30 days after the cells implantation.

Of course, other mechanisms involved in collateral vessels function such as migration, muscle formation, and regeneration might also exist. However, it is unclear whether a persistent angiogenic stimulus is required or not to reverse the ischemia in clinical setting.

We believe that there is a direct relationship between the number of transplanted cells via intramuscular route and the functional effect, corroborating the findings of the other authors (25, 26).

The increase in the number of cell nuclei in rabbits treated with combined therapy (BMCs + PRP group), when compared with saline group, also indicates a less significative loss of muscle fiber with preservation of capillaries (fig.2). This finding is in agreement with recent studies that have

shown in vivo and in vitro functional recovery of ischemic diseases promoted by BMCs therapy, revealing their efficiency and safety. (6, 27, 28).

In conclusion, the combined treatment with BMCs and PRP offers a potential option for therapeutic angiogenesis in limb ischemia. This study provides evidence that action between growth factors and cytokines released from BMCs and PRP are capable of inducing mature blood vessel formation.

Acknowledgements

We thank The Pelé Pequeno Principe Institute for Flow Cytometric Analysis.

References

1. Fowkes FG, Rudan D, Rudan I, Aboyans V, Denenberg JO, McDermott MM, et al. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet*. 2013 Oct 19;382(9901):1329-40. PubMed PMID: 23915883.
2. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Journal of vascular surgery*. 2007 Jan;45 Suppl S:S5-67. PubMed PMID: 17223489.
3. Belch J, Hiatt WR, Baumgartner I, Driver IV, Nikol S, Norgren L, et al. Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia. *Lancet*. 2011 Jun 4;377(9781):1929-37. PubMed PMID: 21621834.

4. Jadowiec C, Brenes RA, Li X, Lv W, Protack CD, Collins MJ, et al. Stem cell therapy for critical limb ischemia: what can we learn from cell therapy for chronic wounds? *Vascular*. 2012 Oct;20(5):284-9. PubMed PMID: 23086986. Pubmed Central PMCID: 3675650.
5. Fujita M, Horio T, Kishimoto S, Nakamura S, Takikawa M, Nakayama T, et al. Effects of platelet-rich plasma-containing fragmin/protamine microparticles in enhancing endothelial and smooth muscle cell growth and inducing collateral vessels in a rabbit model of hindlimb ischemia. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2013 Jan;101(1):36-42. PubMed PMID: 23161557.
6. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002 Aug 10;360(9331):427-35. PubMed PMID: 12241713.
7. Elizana Rasera JCF, Rossana Simeoni, Gustavo Bono, Ana Helena Willrich Rasera, Cristina Pellegrino Baena, Katherine Athayde Teixeira de Carvalho, Ricardo Cunha, Rafael Michel de Macedo, Vivian Ferreira do Amaral, Marcia Olandoski, Jose, Guarita-Souza¹ RF-NaLC. Bone Marrow Mononuclear Stem Cell Transplant in Acute and Chronic Arterial Insufficiency in Rabbits. *J Clin Exp Cardiol* 2012;S 11:2-8.
8. Mikami S, Nakashima A, Nakagawa K, Maruhashi T, Iwamoto Y, Kajikawa M, et al. Autologous bone-marrow mesenchymal stem cell implantation and endothelial function in a rabbit ischemic limb model. *PloS*

one. 2013;8(7):e67739. PubMed PMID: 23861797. Pubmed Central PMCID: 3701528.

9. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *The Journal of clinical investigation*. 1998 Jun 1;101(11):2567-78. PubMed PMID: 9616228. Pubmed Central PMCID: 508846.

10. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, Duan J, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*. 2001 Feb 13;103(6):897-903. PubMed PMID: 11171801.

11. Cunha RC, Francisco JC, Cardoso MA, Matos LF, Lino D, Simeoni RB, et al. Effect of platelet-rich plasma therapy associated with exercise training in musculoskeletal healing in rats. *Transplantation proceedings*. 2014 Jul-Aug;46(6):1879-81. PubMed PMID: 25131059.

12. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation Supplementum*. 1968;97:77-89. PubMed PMID: 4179068.

13. Lawall H, Bramlage P, Amann B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. A critical appraisal. *Thrombosis and haemostasis*. 2010 Apr;103(4):696-709. PubMed PMID: 20174766.

14. Mendez-Otero R, de Freitas GR, Andre C, de Mendonca ML, Friedrich M, Oliveira-Filho J. Potential roles of bone marrow stem cells in stroke

therapy. *Regenerative medicine*. 2007 Jul;2(4):417-23. PubMed PMID: 17635049.

15. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):242-8. PubMed PMID: 11001067.

16. Yang M, Sheng L, Zhang TR, Li Q. Stem cell therapy for lower extremity diabetic ulcers: where do we stand? *BioMed research international*. 2013;2013:462179. PubMed PMID: 23586040. Pubmed Central PMCID: 3613085.

17. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001 Jun 12;103(23):2776-9. PubMed PMID: 11401930.

18. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*. 2001 Aug 28;104(9):1046-52. PubMed PMID: 11524400.

19. Imoukhuede PI, Dokun AO, Annex BH, Popel AS. Endothelial cell-by-cell profiling reveals the temporal dynamics of VEGFR1 and VEGFR2 membrane localization after murine hindlimb ischemia. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2013 Apr 15;304(8):H1085-93. PubMed PMID: 23376830. Pubmed Central PMCID: 3625905.

20. Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tatenos M, et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *The Journal of experimental medicine*. 2001 May 7;193(9):1005-14. PubMed PMID: 11342585. Pubmed Central PMCID: 2193424.
21. Steed DL. Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity ulcers. *Plastic and reconstructive surgery*. 2006 Jun;117(7 Suppl):143S-9S; discussion 50S-51S. PubMed PMID: 16799381.
22. Hargrave B, Li F. Nanosecond Pulse Electric Field Activated-Platelet Rich Plasma Enhances the Return of Blood Flow to Large and Ischemic Wounds in a Rabbit Model. *Physiological reports*. 2015 Jul;3(7). PubMed PMID: 26197934.
23. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Epstein SE. Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences. *Circulation research*. 2004 Aug 20;95(4):354-63. PubMed PMID: 15321945.
24. Ting AE, Mays RW, Frey MR, Hof WV, Medicetty S, Deans R. Therapeutic pathways of adult stem cell repair. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2008 Jan;65(1):81-93. PubMed PMID: 18032062.
25. Pouzet B, Vilquin JT, Hagege AA, Scorsin M, Messas E, Fiszman M, et al. Factors affecting functional outcome after autologous skeletal myoblast transplantation. *The Annals of thoracic surgery*. 2001 Mar;71(3):844-50; discussion 50-1. PubMed PMID: 11269463.

26. Cruz-Martinez P, Pastor D, Estirado A, Pacheco-Torres J, Martinez S, Jones J. Stem cell injection in the hindlimb skeletal muscle enhances neurorepair in mice with spinal cord injury. *Regenerative medicine*. 2014;9(5):579-91. PubMed PMID: 25372077.
27. Motukuru V, Suresh KR, Vivekanand V, Raj S, Girija KR. Therapeutic angiogenesis in Buerger's disease (thromboangiitis obliterans) patients with critical limb ischemia by autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells. *Journal of vascular surgery*. 2008 Dec;48(6 Suppl):53S-60S; discussion S. PubMed PMID: 19084740.
28. Atashi F, Jaconi ME, Pittet-Cuenod B, Modarressi A. Autologous platelet-rich plasma: a biological supplement to enhance adipose-derived mesenchymal stem cell expansion. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2015 Mar;21(3):253-62. PubMed PMID: 25025830. Pubmed Central PMCID: 4346379.

Figure Legends

Figure 1. Time Schedule of the study.

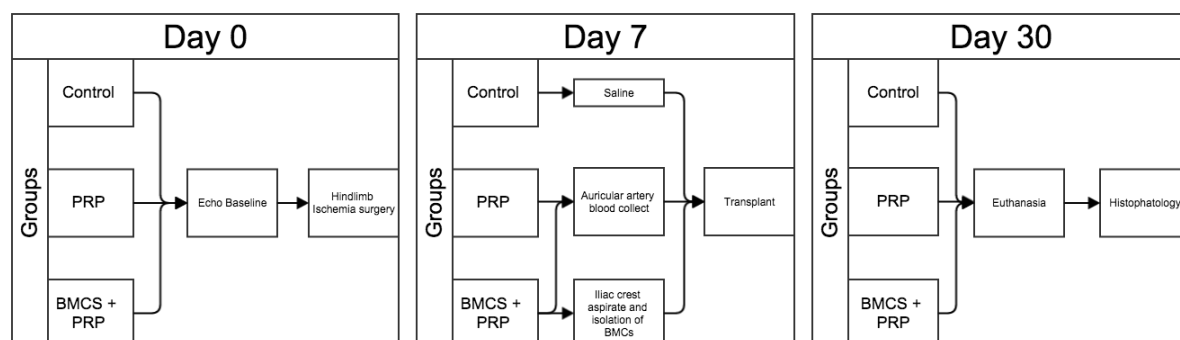


Figure 2. Phase contrast images of the gastrocnemius muscles after injection of saline, A, phase contrast images of the gastrocnemius muscles after injection of bone marrow mononuclear cells (BMNCs) and platelet rich plasma (PRP), B, Fluorescence micrographs of the gastrocnemius muscles after injection of (BMNCs) and (PRP) labeled with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) marker. B and C, D, myofiber nuclei score. Upper panels correspond to day 30 after injection to the gastrocnemius muscle. Bar: 50 μ m. *** $p<0.01$ and ** $p<0.05$.

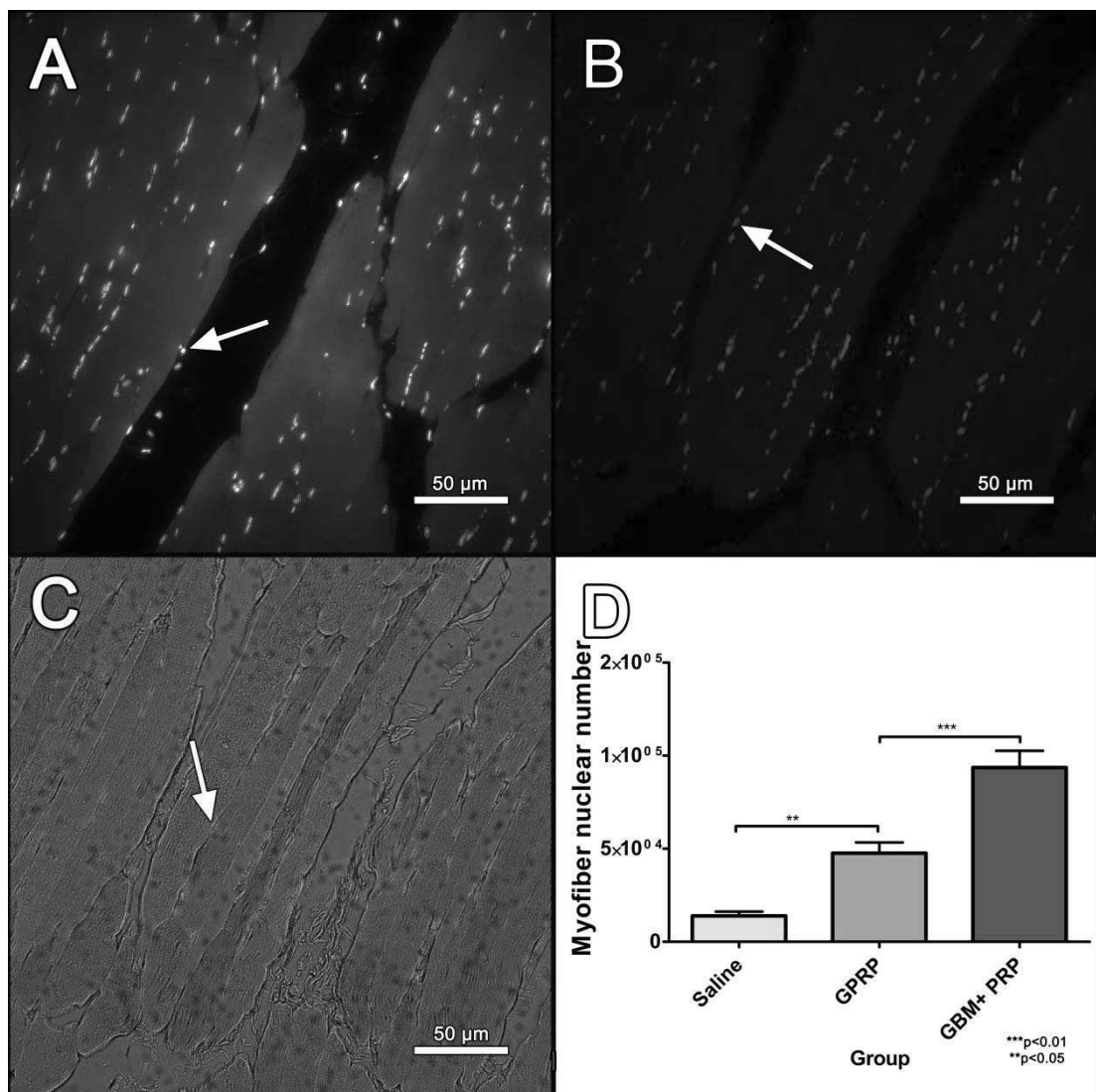
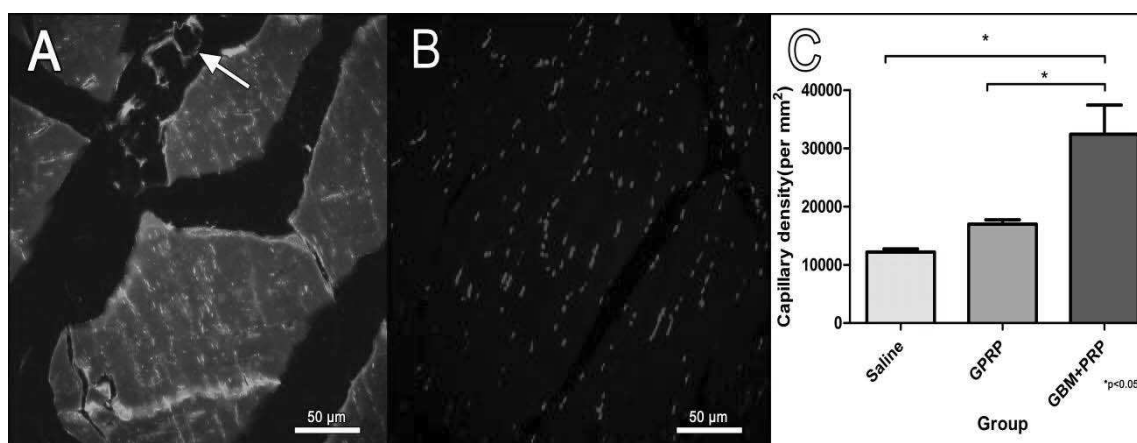


Figure 3. Effects of BMCs+PRP on capillary density in ischemic hindlimb. CD31-positive cells were stained in the gastrocnemius muscle at day 30 after induction of ischemia (A), (B) representative images of DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) capillary density was identified with capillary per field ($\times 400$ magnification, arrow, (C) Capillary score, values are mean $\pm$ SEM; $n = 10$, *means $P < 0.05$, *means $P < 0.05$. Scale bar indicated $50 \mu\text{m}$.



6 CONCLUSÕES



Analisando-se os dados obtidos neste trabalho pode-se sugerir que:

- O tratamento combinado por meio de CMMO e PRP oferece uma opção potencial para angiogênese terapêutica na isquemia crítica de membro.
- O estudo fornece evidências de que a ação sinérgica dos fatores de crescimento e citocinas libertadas de células CMMO e PRP são capazes de induzir a vascularização

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. Selvin E, Erlinger TP. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Circulation*. 2004;110(6):738-43.
2. Makdisse M, Pereira Ada C, Brasil Dde P, Borges JL, Machado-Coelho GL, Krieger JE, et al. Prevalence and risk factors associated with peripheral arterial disease in the Hearts of Brazil Project. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2008;91(6):370-82.
3. Robertson L, Ghouri MA, Kovacs F. Antiplatelet and anticoagulant drugs for prevention of restenosis/reocclusion following peripheral endovascular treatment. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2012;8:CD002071.
4. Sinharay K, Paul UK, Bhattacharyya AK, Pal SK. Prevalence of diabetic foot ulcers in newly diagnosed diabetes mellitus patients. *Journal of the Indian Medical Association*. 2012;110(9):608-11.
5. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Journal of vascular surgery*. 2007;45 Suppl S:S5-67.
6. Mohler E, 3rd, Giri J, Acc, Aha. Management of peripheral arterial disease patients: comparing the ACC/AHA and TASC-II guidelines. *Current medical research and opinion*. 2008;24(9):2509-22.
7. Hiatt WR, Armstrong EJ, Larson CJ, Brass EP. Pathogenesis of the limb manifestations and exercise limitations in peripheral artery disease. *Circulation research*. 2015;116(9):1527-39.

8. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*. 2000;287(5457):1442-6.
9. Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Simeone BR, Francisco JC, Miyague N, Olandoski M. Functional outcome of bone marrow stem cells: mononuclear versus mesenchymal stem cells after cellular therapy in myocardial scar in Wistar rats. *Transplantation proceedings*. 2006;38(6):1953-4.
10. Botham CM, Bennett WL, Cooke JP. Clinical Trials of Adult Stem Cell Therapy for Peripheral Artery Disease. *Methodist DeBakey cardiovascular journal*. 2013;9(4):201-5.
11. Elizana Rasesa JCF, Rossana Simeoni, Gustavo Bono, Ana Helena Willrich Rasesa, Cristina Pellegrino Baena, Katherine Athayde Teixeira de Carvalho, Ricardo Cunha, Rafael Michel de Macedo, Vivian Ferreira do Amaral, Marcia Olandoski, Jose, Guarita-Souza¹ RF-NaLC. Bone Marrow Mononuclear Stem Cell Transplant in Acute and Chronic Arterial Insufficiency in Rabbits. *J Clin Exp Cardiol* 2012;S 11:2-8.
12. Liao HT, Marra K, Rubin PJ. Application of Platelet-Rich Plasma and Platelet-Rich Fibrin in Fat Grafting: Basic Science and Literature Review. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2013.
13. Muller-Ehmsen J, Whittaker P, Kloner RA, Dow JS, Sakoda T, Long TI, et al. Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2002;34(2):107-16.

14. Ghostine S, Carrion C, Souza LC, Richard P, Bruneval P, Vilquin JT, et al. Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation*. 2002;106(12 Suppl 1):I131-6.
15. Fujita M, Horio T, Kishimoto S, Nakamura S, Takikawa M, Nakayama T, et al. Effects of platelet-rich plasma-containing fragmin/protamine microparticles in enhancing endothelial and smooth muscle cell growth and inducing collateral vessels in a rabbit model of hindlimb ischemia. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2013;101(1):36-42.
16. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360(9331):427-35.
17. Mikami S, Nakashima A, Nakagawa K, Maruhashi T, Iwamoto Y, Kajikawa M, et al. Autologous bone-marrow mesenchymal stem cell implantation and endothelial function in a rabbit ischemic limb model. *PloS one*. 2013;8(7):e67739.
18. Lago. JDAJDAFECDMAROTGRAM. Células-tronco de medula óssea em isquemia crítica de membros. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2009;vol.31, suppl.1:128-39.
19. Karamanos D, Karkos C, Kambaroudis A, Kritsepi M, Papadopoulos S, Spyridis C, et al. The effect of Antithrombin-III on routine hematological and biochemical parameters in an experimental animal model of skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Hippokratia*. 2014;18(3):234-9.

20. Yamada N, Li W, Ihaya A, Kimura T, Morioka K, Uesaka T, et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor gene therapy for limb ischemia. *Journal of vascular surgery*. 2006;44(6):1322-8.
21. Suzuki H, Iso Y. Clinical application of vascular regenerative therapy for peripheral artery disease. *Biomed Res Int*. 2013;2013:179730.
22. Forbang NI, Hughes-Austin JM, Allison MA, Criqui MH. Peripheral artery disease and non-coronary atherosclerosis in Hispanics: another paradox? *Prog Cardiovasc Dis*. 2014;57(3):237-43.
23. Hedberg B, Angquist KA, Sjostrom M. Peripheral arterial insufficiency and the fine structure of the gastrocnemius muscle. *International angiology : a journal of the International Union of Angiology*. 1988;7(1):50-9.
24. Anderson JD, Epstein FH, Meyer CH, Hagspiel KD, Wang H, Berr SS, et al. Multifactorial determinants of functional capacity in peripheral arterial disease: uncoupling of calf muscle perfusion and metabolism. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(7):628-35.
25. Hirsch AT, Criqui MH, Treat-Jacobson D, Regensteiner JG, Creager MA, Olin JW, et al. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA*. 2001;286(11):1317-24.
26. Singh KP, Sharma AM. Critical limb ischemia: current approach and future directions. *J Cardiovasc Transl Res*. 2014;7(4):437-45.
27. Pereira C, Miname M, Makdisse M, Kalil Filho R, Santos RD. Association of peripheral arterial and cardiovascular diseases in familial hypercholesterolemia. *Arq Bras Cardiol*. 2014;103(2):118-23.

28. Egorova NN, Guillerme S, Gelijns A, Morrissey N, Dayal R, McKinsey JF, et al. An analysis of the outcomes of a decade of experience with lower extremity revascularization including limb salvage, lengths of stay, and safety. *Journal of vascular surgery*. 2010;51(4):878-85, 85 e1.
29. Reinecke H, Unrath M, Freisinger E, Bunzemeier H, Meyborg M, Luders F, et al. Peripheral arterial disease and critical limb ischaemia: still poor outcomes and lack of guideline adherence. *Eur Heart J*. 2015;36(15):932-8.
30. Hiatt WR, Zakharyan A, Fung ET, Crutcher G, Smith A, Stanford C, et al. A validated biomarker panel to identify peripheral artery disease. *Vasc Med*. 2012;17(6):386-93.
31. McDermott MM, Greenland P, Guralnik JM, Ferrucci L, Green D, Liu K, et al. Inflammatory markers, D-dimer, pro-thrombotic factors, and physical activity levels in patients with peripheral arterial disease. *Vasc Med*. 2004;9(2):107-15.
32. Berger JS, Hiatt WR. Medical therapy in peripheral artery disease. *Circulation*. 2012;126(4):491-500.
33. Atturu G, Homer-Vanniasinkam S, Russell DA. Pharmacology in peripheral arterial disease: what the interventional radiologist needs to know. *Semin Intervent Radiol*. 2014;31(4):330-7.
34. Liu JS, Chuang TJ, Chen JH, Lee CH, Hsieh CH, Lin TK, et al. Cilostazol attenuates the severity of peripheral arterial occlusive disease in patients with type 2 diabetes: the role of plasma soluble receptor for advanced glycation end-products. *Endocrine*. 2015.

35. Garimella PS, Hirsch AT. Peripheral artery disease and chronic kidney disease: clinical synergy to improve outcomes. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2014;21(6):460-71.
36. Chang P, Nead KT, Olin JW, Myers J, Cooke JP, Leeper NJ. Effect of physical activity assessment on prognostication for peripheral artery disease and mortality. *Mayo Clin Proc.* 2015;90(3):339-45.
37. Hiatt WR, Regensteiner JG, Hargarten ME, Wolfel EE, Brass EP. Benefit of exercise conditioning for patients with peripheral arterial disease. *Circulation.* 1990;81(2):602-9.
38. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol.* 2014;15(11):1009-16.
39. [The cellular mechanisms and regulation of metastasis formation]. *Mol Biol (Mosk).* 2014;48(2):195-213.
40. Lederman RJ, Tenaglia AN, Anderson RD, Hermiller JB, Rocha-Singh K, Mendelsohn FO, et al. Design of the therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (TRAFFIC) trial. *Am J Cardiol.* 2001;88(2):192-5, A6-7.
41. Badimon L, Vilahur G. Experimental cell therapy: the search for the best stem cell continues. *J Am Coll Cardiol.* 2014;64(16):1695-7.
42. Regenber AC, Hutchinson LA, Schanker B, Mathews DJ. Medicine on the fringe: stem cell-based interventions in advance of evidence. *Stem Cells.* 2009;27(9):2312-9.

43. Phinney DG, Isakova I. Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. *Curr Pharm Des.* 2005;11(10):1255-65.
44. Botman O, Wyns C. Induced pluripotent stem cell potential in medicine, specifically focused on reproductive medicine. *Front Surg.* 2014;1:5.
45. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.
46. Choi YH, Kurtz A, Stamm C. Mesenchymal stem cells for cardiac cell therapy. *Hum Gene Ther.* 2011;22(1):3-17.
47. Kwiatkowska-Borowczyk EP, Gabka-Buszek A, Jankowski J, Mackiewicz A. Immunotargeting of cancer stem cells. *Contemp Oncol (Pozn).* 2015;19(1A):A52-9.
48. Cipriani P, Ruscitti P, Di Benedetto P, Carubbi F, Liakouli V, Berardicurti O, et al. Mesenchymal stromal cells and rheumatic diseases: new tools from pathogenesis to regenerative therapies. *Cytotherapy.* 2015.
49. Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, Furuta M, et al. Cell transplantation: differential effects of myoblasts and mesenchymal stem cells. *Int J Cardiol.* 2006;111(3):423-9.
50. Arnhold S, Wensch S. Adipose tissue derived mesenchymal stem cells for musculoskeletal repair in veterinary medicine. *Am J Stem Cells.* 2015;4(1):1-12.

51. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000;28(8):875-84.
52. Zou L, Kidwai FK, Kopher RA, Motl J, Kellum CA, Westendorf JJ, et al. Use of RUNX2 expression to identify osteogenic progenitor cells derived from human embryonic stem cells. *Stem Cell Reports*. 2015;4(2):190-8.
53. de Miguel-Beriain I. The ethics of stem cells revisited. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;82-83C:176-80.
54. Lam AQ, Bonventre JV. Regenerating the nephron with human pluripotent stem cells. *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20(2):187-92.
55. AlAhmari LS, AlShenaifi JY, AlAnazi RA, Abdo AA. Autologous bone marrow-derived cells in the treatment of liver disease patients. *Saudi J Gastroenterol*. 2015;21(1):5-10.
56. Abetov D, Mustapova Z, Saliev T, Bulanin D. Biomarkers and signaling pathways of colorectal cancer stem cells. *Tumour Biol*. 2015;36(3):1339-53.
57. Gupta NK, Armstrong EJ, Parikh SA. The current state of stem cell therapy for peripheral artery disease. *Curr Cardiol Rep*. 2014;16(2):447.
58. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009;27(3):158-67.
59. Kuhbier JW, Reimers K, Radtke C, Vogt PM. [Regenerative therapy approaches in plastic surgery]. *Chirurg*. 2015;86(3):214-22.
60. Malahias MA, Chytas D, Babis GC, Nikolaou VS. Platelet-rich plasma guided injections: clinical application in peripheral neuropathies. *Front Surg*. 2014;1:41.

61. Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, Kita M, Sotozono C, Kinoshita S. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog Retin Eye Res.* 2000;19(1):113-29.
62. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med.* 2009;37(11):2259-72.
63. Bissell L, Tibrewal S, Sahni V, Khan WS. Growth factors and platelet rich plasma in anterior cruciate ligament reconstruction. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2014;10(1):19-25.
64. Marques FP, Ingham SJ, Forgas A, Franciozi CE, Sasaki PH, Abdalla RJ. A manual method to obtain platelet rich plasma. *Acta Ortop Bras.* 2014;22(2):75-7.
65. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2006;118(6):147e-59e.
66. Atashi F, Jaconi ME, Pittet-Cuenod B, Modarressi A. Autologous platelet-rich plasma: a biological supplement to enhance adipose-derived mesenchymal stem cell expansion. *Tissue engineering Part C, Methods.* 2015;21(3):253-62.
67. Bellini L, Banzato T, Contiero B, Zotti A. Evaluation of sedation and clinical effects of midazolam with ketamine or dexmedetomidine in pet rabbits. *Vet Rec.* 2014;175(15):372.

68. Hahn MP. Review of palliative sedation and its distinction from euthanasia and lethal injection. *J Pain Palliat Care Pharmacother*. 2012;26(1):30-9.
69. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000;407(6801):242-8.
70. Mendez-Otero R, de Freitas GR, Andre C, de Mendonca ML, Friedrich M, Oliveira-Filho J. Potential roles of bone marrow stem cells in stroke therapy. *Regenerative medicine*. 2007;2(4):417-23.
71. Yang M, Sheng L, Zhang TR, Li Q. Stem cell therapy for lower extremity diabetic ulcers: where do we stand? *BioMed research international*. 2013;2013:462179.
72. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, Duan J, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*. 2001;103(6):897-903.
73. Steed DL. Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity ulcers. *Plastic and reconstructive surgery*. 2006;117(7 Suppl):143S-9S; discussion 50S-51S.
74. Imoukhuede PI, Dokun AO, Annex BH, Popel AS. Endothelial cell-by-cell profiling reveals the temporal dynamics of VEGFR1 and VEGFR2 membrane localization after murine hindlimb ischemia. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2013;304(8):H1085-93.

75. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovascular surgery*. 2002;10(6):620-30.
76. Gillani S, Cao J, Suzuki T, Hak DJ. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle. *Injury*. 2012;43(6):670-5.
77. Renn TY, Kao YH, Wang CC, Burnouf T. Anti-inflammatory effects of platelet biomaterials in a macrophage cellular model. *Vox sanguinis*. 2015;109(2):138-47.
78. Kinoshita M, Fujita Y, Katayama M, Baba R, Shibakawa M, Yoshikawa K, et al. Long-term clinical outcome after intramuscular transplantation of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34 positive cells in patients with critical limb ischemia. *Atherosclerosis*. 2012;224(2):440-5.
79. Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation*. 1998;97(1):99-107.
80. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circulation research*. 2004;94(5):678-85.
81. Duong Van Huyen JP, Smadja DM, Bruneval P, Gaussem P, Dal-Cortivo L, Julia P, et al. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy induces distal angiogenesis after local injection in critical leg ischemia.

Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2008;21(7):837-46.

82. Nakamuta JS, Danoviz ME, Marques FL, dos Santos L, Becker C, Goncalves GA, et al. Cell therapy attenuates cardiac dysfunction post myocardial infarction: effect of timing, routes of injection and a fibrin scaffold. PloS one. 2009;4(6):e6005.

83. Coats P, Hillier C. Differential responses in human subcutaneous and skeletal muscle vascular beds to critical limb ischaemia. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2000;19(4):387-95.

84. Gigante A, Del Torto M, Manzotti S, Cianforlini M, Busilacchi A, Davidson PA, et al. Platelet rich fibrin matrix effects on skeletal muscle lesions: an experimental study. J Biol Regul Homeost Agents. 2012;26(3):475-84.

Anexo

Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais de Experimentação



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa

Curitiba, 20 de Março de 2014.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 873

TÍTULO DO PROJETO: Células-tronco mononucleares e plasma rico em plaquetas como adjuvantes na cicatrização de lesões vasculares em Ratos Wistar.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Luis Cesar Guarita Souza.

EQUIPE DE PESQUISA: Luis Cesar Guarita Souza, Júlio Cesar Francisco, Paulo Ricardo Baggio Simeoni.

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Saúde e Biociências / Pós Graduação Ciência Animal

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
<i>Rattus norvegicus</i>	Machos	300 gr	D	60

O colegiado do CEUA em reunião no dia 20/03/2014, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer:

APROVADO.

PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

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

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

Atenciosamente,

Profa. Dra. Marta Luciano Fischer

Coordenadora

Comitê de Ética no Uso de Animais.

Profª Dra. Marta Lú
Coordenadora Comitê de Ética
em 20/03/2014



Rua Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho - CEP 80.715-901 - Curitiba, Paraná - Brasil
Caixa postal 17.315 - CEP 80.242-980 - Telefone (41) 3371.2232 - www.pucpr.br