

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Gabriel Leonel Marasco

**FATOR DE CRESCIMENTO DE HEPATÓCITOS COMO ALVO PARA
TERAPIA GÊNICA NO TRATAMENTO DA DOENÇA ARTERIAL
PERIFÉRICA**

São Paulo

2016

Gabriel Leonel Marasco

**FATOR DE CRESCIMENTO DE HEPATÓCITOS COMO ALVO PARA
TERAPIA GÊNICA NO TRATAMENTO DA DOENÇA ARTERIAL
PERIFÉRICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Prof.^a Dr.^a Beatriz Helena Pizarro De Lorenzo, como requisito parcial para obtenção do título em Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2016

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Marasco, Gabriel Leonel

Fator de crescimento de hepatócitos como alvo para terapia gênica no tratamento da doença arterial periférica / Gabriel Leonel Marasco. -- São Paulo : Centro Universitário São Camilo, 2016.

45 p.

Orientação de Beatriz Helena Pizarro de Lorenzo

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação),
Centro Universitário São Camilo, 2016.

1. Aterosclerose 2. Doença arterial periférica 3. Hepatócitos 4.
Terapia Genética I. Lorenzo, Beatriz Helena Pizarro de II. Centro

Marasco, G.L. **Fator de crescimento de hepatócitos como alvo para terapia gênica no tratamento da doença arterial periférica.** 2016. 45f. Dissertação (Bacharelado em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2016.

A doença arterial periférica (PAD) é uma desordem cardiovascular que afeta de 3% a 10% da população, podendo aumentar para 15% a 20% em pessoas acima de 70 anos. A aterosclerose é indicada como a principal causa da PAD. O estreitamento das artérias pela formação de placas ateroscleróticas compromete o fluxo sanguíneo para os tecidos e, se o fluxo sanguíneo se tornar insuficiente para manter a demanda metabólica tecidual, o paciente irá apresentar quadros de dores fortes, úlceras e/ou gangrena no membro afetado ocasionando a riscos de perda do membro ou até a morte. Atualmente não há tratamentos específicos para PAD, os tratamentos farmacológicos existentes visam controlar os fatores de risco da doença para impedir sua progressão, quando não funcionam, o paciente é submetido a processos cirúrgicos de revascularização, porém, 20% a 30% dos pacientes não podem ser submetidos a tais processos e, com isso, são encaminhados para a amputação do membro. Dentre os pacientes encaminhados para amputação, 20% podem morrer antes mesmo do procedimento. Por esses fatos este estudo teve como objetivo analisar a terapia gênica como uma forma de terapia específica para PAD, para isso, foram feitas pesquisas na base de dados Pubmed e na biblioteca Pe. Inocente Radrizzani. A terapia gênica seria uma boa alternativa para o tratamento da PAD, pois pode induzir e/ou aumentar a neovascularização do membro pela expressão de fatores angiogênicos, reestabelecendo seu fluxo sanguíneo e sua funcionalidade. O fator de crescimento de hepatócitos (HGF) é um importante fator pró-angiogênico, capaz de estimular a formação de novos vasos sanguíneos e conseqüentemente aumentar o fluxo sanguíneo. Em estudos pré-clínicos de terapia gênica utilizando HGF para o tratamento de PAD o grupo tratado mostrou uma melhora significativa no fluxo sanguíneo e densidade capilar do membro isquêmico quando comparados ao grupo controle. Além dos resultados promissores dos estudos pré-clínicos, estudos clínicos vêm mostrando que a terapia gênica utilizando HGF foi capaz de diminuir a área de úlceras, aumentar o índice tornozelo-braquial sugerindo um aumento na angiogênese e diminuir a dor em descanso dos pacientes. Mesmo os resultados mostrarem progresso na elaboração de uma terapia específica para PAD, ainda são necessários mais estudos clínicos para comprovar sua eficácia terapêutica.

Palavras-chave: Doença arterial periférica. DAP. Isquemia de membro. Neovascularização. Angiogênese. Vasculogênese. Arteriogênese. Terapia gênica. Vetores virais. Vetor retroviral. Vetor lentiviral. Vetor adenoviral. Vetores não virais. Vetor plasmidial. Entrega de genes. Fator de crescimento de hepatócitos. HGF. Terapia gênica utilizando HGF.

Marasco, G.L. **Hepatocyte growth factor used in gene therapy for peripheral artery disease**. 2016. 45f. Dissertation (Bachelor's degree in Biomedicine) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2016.

Peripheral artery disease (PAD) is a cardiovascular disorder that affects 3% to 10% of the population, reaching 15% to 20% in people above 70 years. Atherosclerosis is indicated as principal cause of PAD. The narrowing of arteries by the formation of atheroma plaques commits tissues irrigation and, if the blood flow turns up to be insufficient for maintaining the metabolic tissue demand, the patient will present severe pain, ulcers and/or gangrene on affected limb causing risks to amputate it or even dying. Currently there are no specific treatments for PAD. Pharmacological treatments available aim to control the risk factors of the disease to prevent its progression. If they don't work the patient is submitted to surgical revascularization process but 20% to 30% of these patients are not eligible for this surgical process and then they are directed to amputation. Among the patients directed to amputation, 20% can die even before the procedure. For these reasons this study had as objective to analyze the gene therapy as a possible specific therapy for PAD. In order to do so researches were made at Pubmed database and at Pe. Inocente Radrizzani library. Gene therapy would be a good alternative for treatment of PAD because it could induce and/or increase neovascularization in the limb by expressing angiogenic factors, reestablishing its blood flow and its functionality. Hepatocyte growth factor (HGF) is an important pro-angiogenic factor capable of stimulating the formation of new blood vessels and consequently increase the perfusion ratio. In Pre-clinical studies of gene therapy using HGF for the treatment of PAD the treated animal group showed significant improvement on blood flow ratio and capillary density when compared with control animal group. Besides the promising results showed in pre-clinical studies, clinical studies have shown that gene therapy using HGF was capable of reducing ulcer's area size, increase ankle-brachial index suggesting an increase in angiogenesis and decreasing the rest pain of the patients. Even though the results showed progress in the development of a specific therapy for PAD, more clinical studies to strengthen its therapeutic efficacy are necessary.

Keywords: Peripheral artery disease. PAD. Limb ischemia. Neovascularization. Angiogenesis. Vasculogenesis. Arteriogenesis. Gene therapy. Viral vectors. Retroviral vector. Lentiviral vector. Adenoviral vector. Non viral vectors. Plasmidial vector. Gene delivery. Hepatocyte growth factor. HGF. Gene therapy using HGF.

Lista de Abreviaturas

ABI	Índice tornozelo-braquial (<i>Ankle-brachial index</i>)
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial (<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>)
EPCs	Células progenitoras endoteliais (<i>Endothelial progenitors cells</i>)
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos (<i>Hepatocyte growth factor</i>)
NO	Óxido nítrico (<i>Nitric oxide</i>)
SCID	Imunodeficiência combinada grave (<i>Severe combined immunodeficiency disease</i>)
SDF-1 α	Fator 1 derivado do estroma (<i>Stromal cell-derived factor 1</i>)
TcPO ₂	Medida transcutânea da pressão parcial de oxigênio (<i>Transcutaneous oxygen pressure</i>)
VAS	Escala visual analógica (<i>Visual analogue scale</i>)
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)

Sumário

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS.....	11
2.1	Objetivos gerais	11
2.2	Objetivos específicos.....	11
3	METODOLOGIA	12
4	DESENVOLVIMENTO	13
4.1	Doença arterial periférica.....	13
4.2	Neovascularização.....	15
4.2.1.	Vasculogênese.....	15
4.2.2.	Angiogênese	17
4.2.3.	Arteriogênese.....	20
4.3	Terapia gênica.....	22
4.4	Fator de crescimento de hepatócitos.....	28
5	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

A doença arterial periférica (do inglês, *peripheral artery disease*; PAD) é uma doença caracterizada pela obstrução de vasos sanguíneos levando a uma diminuição do fluxo sanguíneo. A PAD possui uma incidência de 3% a 10% da população mundial, podendo aumentar para 15% a 20% em pessoas acima de 70 anos. O principal responsável pela obstrução dos vasos sanguíneos na PAD é aterosclerose (NORGREN et al., 2007).

A PAD pode ser dividida em três grupos: isquemia crônica de membro, isquemia crônica crítica de membro e isquemia aguda de membro (NORGREN et al., 2007). A isquemia crônica de membro é caracterizada por dor, desconforto ou fadiga em um grupo de músculos do membro quando em exercício físico que durante pequenos intervalos de repouso, são amenizados. Esse quadro é denominado claudicação intermitente e ocorre porque o fluxo sanguíneo nos membros dessas pessoas é inadequado para suprir a demanda metabólica muscular envolvida no exercício (WHITE, 2007).

A isquemia crônica crítica de membro ocorre quando a redução do fluxo sanguíneo resulta em um déficit na perfusão do mesmo durante inatividade levando a dores e lesões no membro durante inércia. Nessa situação o indivíduo possui risco de perder o membro se o fluxo sanguíneo não for reestabelecido em tempo hábil (DEWEESE; LEATHER; PORTER, 1993).

Isquemia aguda de membro é caracterizada pelo surgimento de uma rápida ou repentina diminuição na perfusão do membro de modo a ameaçar a viabilidade do mesmo, fazendo com que o indivíduo sinta uma dor súbita e progressiva. A isquemia aguda pode ser causada por embolia, trombose ou reestenose pós-revascularização (NORGREN et al., 2007).

Atualmente os tratamentos para PAD são independentes do tipo de isquemia, eles são baseados no controle das doenças de base e dos fatores de risco e são feitos basicamente pela utilização de antiagregantes plaquetários e anticoagulantes. Procedimentos cirúrgicos são mais recomendados para casos mais graves da doença,

mas em 20% a 30% dos pacientes esses procedimentos não são factíveis, sendo a amputação a única alternativa (MCCANN; JAFF, 2009).

Há três mecanismos de formação de vasos: vasculogênese, angiogênese e arteriogênese. A vasculogênese é o processo de formação de vasos a partir de células precursoras endoteliais, como os angioblastos, e tem como característica a formação de uma rede primitiva de vasos pela migração dessas células precursoras para lugares distintos. A vasculogênese geralmente acontece durante o desenvolvimento embrionário, mas hoje sabe-se que ela ocorre também na fase adulta a partir de células precursoras endoteliais presentes da medula óssea (TAKAHASHI et al., 1999).

A angiogênese se refere à formação de vasos a partir de vasos pré-existentes, principalmente por um mecanismo denominado brotamento (CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001). Sua ocorrência se deve a resposta aos fatores de crescimento e certos estímulos como hipóxia, isquemia, inflamação e estímulos físicos (HO et al., 2005).

A arteriogênese é o remodelamento de vasos já existentes incorporando os pericitos e células musculares lisas fazendo com que esses vasos ganhem estabilidade, aumento de diâmetro e propriedades contráteis e elásticas (CARMELIET, 2000). Esse processo em conjunto com angiogênese e vasculogênese possui papel importante na formação da circulação colateral, mecanismo muito importante após oclusões de artérias (SCHAPER; ITO, 1996), porém, fisiologicamente, a arteriogênese possui um papel mais relevante do que os outros, pois seus vasos formados possuem um diâmetro maior (SCHOLZ; CAI; SCHAPER, 2001). Esses três mecanismos são ativados e coordenados pelos fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas conforme a necessidade fisiológica.

Existem diferentes formas desses fatores de crescimento serem entregues aos pacientes, como por exemplo, a terapia gênica. A terapia gênica visa à entrega de ácidos nucleicos terapêuticos para o paciente e tem como objetivo aumentar ou inibir a expressão de certos genes e de suas respectivas proteínas, com isso, a terapia gênica possui um amplo espectro de doenças em que se pode ser usada, pois independem do seu caráter etiológico ou genético.

Desde o primeiro estudo clínico de terapia gênica realizado em 1990 para tratar imunodeficiência combinada grave (do inglês, *severe combined immunodeficiency*

disease; SCID) com o vetor retroviral carreando o gene adenosina deaminase, o número de protocolos clínicos utilizando terapia gênica tem aumentado continuamente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Revisar terapias gênicas utilizando HGF para doença arterial periférica.

2.2 Objetivos específicos

Revisar:

- Sobre a doença arterial periférica.
- As diferentes formas de neovascularização.
- As terapias existentes para doença arterial periférica.
- Os vetores utilizados em terapia gênica.
- Os métodos de entrega de vetores não virais.
- Sobre o fator de crescimento de hepatócitos.
- Sobre os estudos pré-clínicos e clínicos utilizando HGF para o tratamento de doença arterial periférica.

3 METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão bibliográfica narrativa. Para isso, foi realizado um levantamento bibliográfico na base de dados Pubmed e na biblioteca Pe. Inocente Radrizzani. Os descritores utilizados serão: *Peripheral artery disease. PAD. Limb ischemia. Neovascularization. Angiogenesis. Vasculogenesis. Arteriogenesis. Gene therapy. Viral vectors. Retroviral vector. Lentiviral vector. Adenoviral vector. Non viral vectors. Plasmidial vector. Gene delivery. Hepatocyte growth factor. HGF. Gene therapy using HGF.*

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 Doença arterial periférica

A doença arterial periférica (do inglês, *peripheral artery disease*; PAD) é uma desordem cardiovascular caracterizada pelo estreitamento de artérias periféricas com consequente obstrução de vasos sanguíneos e redução do aporte sanguíneo para região, principalmente dos membros inferiores (BELCH et al., 2003; STEHOUWER et al., 2009). Clinicamente, a redução do fluxo sanguíneo para o membro isquêmico pode ser tanto assintomática como sintomática. Quando sintomática, o paciente pode apresentar câimbras e/ou dor no membro durante exercício, e, em casos mais graves, o paciente também pode apresentar dor em repouso e dano tecidual (CONTE et al., 2015; MASCARENHAS et al., 2014; PATEL et al., 2015).

De acordo com recentes diretrizes da Associação Americana do Coração (AHA-*American Heart Association*), a aterosclerose é indicada como a principal causa da PAD sendo que, apesar dos membros inferiores serem preferencialmente afetados, pode também acometer as artérias periféricas dos membros superiores, cabeça, estômago e rins (COOKE; CHEN, 2015).

A redução do fluxo sanguíneo no membro pode ser parcial ou total. Quando parcial, o fluxo arterial mantém aporte sanguíneo suficiente para viabilidade celular. Caso o fluxo sanguíneo diminua muito, poderá acarretar na morte dessas células. No caso de isquemia parcial, o paciente pode ser assintomático ou apresentar dores durante a caminhada, condição conhecida como claudicação intermitente (PATEL et al., 2015). Quando a obstrução é total, o fluxo sanguíneo para o tecido torna-se insuficiente, impedindo a manutenção da integridade tecidual. A forma mais grave de obstrução recebe o nome de isquemia crônica crítica de membro, onde nem os mecanismos compensatórios, como formação de vasos colaterais, consegue suprir a demanda nutritiva do membro e com isso os pacientes apresentam intensa dor em repouso, úlceras e/ou gangrena (ARONOW, 2004; BAPTISTA-SILVA, 2004; MASCARENHAS et al., 2014).

A PAD possui uma incidência de 3% a 10% da população, podendo aumentar para 15% a 20% em pessoas acima de 70 anos. Possui 500 a 1000 novos casos por milhão de habitantes a cada ano na Europa e na América do Norte (NORGREN et al., 2007). O “Projeto Corações do Brasil”, realizado nas grandes regiões urbanas do país,

mostrou uma incidência para a PAD de 10,5% (MAKDISSE et al., 2008) e em São Paulo essa incidência é de 36,4% em indivíduos acima de 75 anos (MAKDISSE et al., 2007). Além da idade, foi visto que os homens possuem duas vezes mais chance de desenvolver a doença do que as mulheres (CRIQUI; ABOYANS, 2015).

O desenvolvimento da PAD possui alguns fatores de risco, dentre eles podemos destacar fumo, diabetes, hipertensão e hiperlipidemia. O fumo é o fator de risco que mais contribui para o desenvolvimento da doença sendo que, em paciente fumantes, a incidência triplica em relação a pacientes não fumantes (CRIQUI; ABOYANS, 2015). Posteriormente, o segundo maior fator de risco é o diabetes. Foi visto que um aumento de 1% de hemoglobina glicada (HbA1c) corresponde a um aumento de 26% na incidência da doença. Em paciente com diabetes, a PAD é mais agressiva e possui um progresso mais acelerado do que em pacientes não diabéticos, refletindo um maior índice de amputação do membro nesses pacientes (THIRUVOIPATI; KIELHORN; ARMSTRONG, 2015). Em terceiro lugar, tem-se a hipertensão: na população hipertensa, 6,9% dos pacientes apresentam PAD. Outro fator de risco é a hiperlipidemia, onde cada 10mg a mais no total de colesterol corresponde a um aumento de 5% a 10% na probabilidade de desenvolver essa doença (CRIQUI; ABOYANS, 2015). Apesar de existirem mecanismos fisiológicos de compensação, como o aumento de vasos colaterais tanto em número como em diâmetro na tentativa de promover uma revascularização, estudos clínicos e pré-clínicos indicam que essa revascularização é insuficiente para recuperação total do membro afetado em indivíduos com PAD (ARONOW, 2004; MUKHERJEE; EAGLE, 2010). Atualmente não existe tratamento específico para a PAD, sendo, os tratamentos existentes, voltados para controle dos fatores de risco para diminuir o índice de amputação do membro.

O tratamento pode ser tanto por meio da mudança de hábitos como farmacológico. As mudanças de hábito envolvem o controle e/ou cessamento do tabagismo, aumento de atividades físicas e redução da ingestão de alimentos ricos em lipídeos e carboidratos. No tratamento farmacológico, são utilizadas drogas anti-hipertensivas e/ou terapias utilizando antiagregantes plaquetários e vasoativos. O uso dos inibidores da ECA (enzima conversora de angiotensina) mostrou diminuição em 22% eventos cardiovasculares em pacientes com PAD. Outra forma existente de melhorar a qualidade de vida do paciente e prevenir a amputação do membro é a

intervenção cirúrgica, como por exemplo, a angioplastia (SCHULTE; KIESELBACH; VON STRANDMANN, 2015).

No entanto, 20% a 30% dos pacientes com isquemia crônica crítica não podem passar pelo tratamento de revascularização e, quando as terapias farmacológicas e/ou as técnicas de revascularização são ineficientes, esses pacientes são encaminhados para amputação do membro (LAWALL; BRAMLAGE; AMANN, 2010). Dentre os pacientes encaminhados para amputação, 20% podem morrer antes mesmo do procedimento (ANNEX, 2013; NORGREN et al., 2007; SINGH et al., 1996; VAN ROYEN et al., 2001). Por esses motivos, o estudo de novas formas de terapia é essencial.

4.2 Neovascularização

A neovascularização é um processo imprescindível para o reparo de lesões, tendo papel importantíssimo para conter a progressão da isquemia tecidual (HERSHEY et al., 2001).

Quando se fala de neovascularização em indivíduos adultos, os três conceitos principais são vasculogênese, angiogênese e arteriogênese, os quais possuem funções diferentes dentro de um processo integrado fundamental para o reparo tecidual pós-isquêmico (ASAHARA et al., 1997; LIMAN; ENDRES, 2012; VAN WEEL et al., 2008)

4.2.1. Vasculogênese

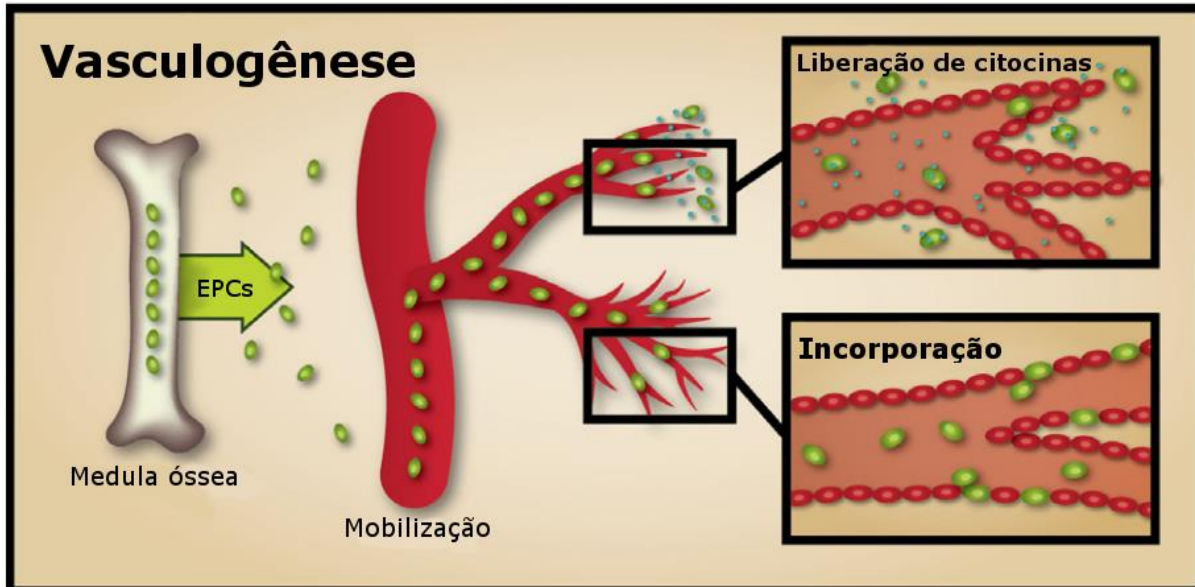
A vasculogênese é um processo caracterizado pelo surgimento de novos vasos a partir de células progenitoras endoteliais (do inglês, endothelial progenitor cells; EPCs) e angioblastos. Acreditava-se que este processo ocorria somente durante a fase embrionária; porém, o fato de indivíduos adultos possuírem EPCs circulantes sugere que a vasculogênese também pode ocorrer durante a fase adulta (ASAHARA et al., 1997).

Atualmente sabe-se que as EPCs presentes na circulação do indivíduo adulto são oriundas da medula óssea (TEPPER et al., 2005) ou da reserva tecidual local (FANG et al., 2012). Além de serem capazes de migrar para o tecido-alvo, essas células têm capacidade de diferenciarem-se em células endoteliais funcionais

(ASAHARA; KAWAMOTO, 2004; CARMELIET, 2003). Em condições fisiológicas normais, o número de EPCs circulante é relativamente pequeno, sendo um total de 0,01% das células circulantes (KHOO; POZZILLI; ALISON, 2008). No entanto, esse número aumenta expressivamente quando ocorre um trauma vascular ou devido à hipóxia tecidual (ADAMS et al., 2004).

As EPCs encontram-se na medula óssea e são mobilizadas para circulação periférica sob estímulo e modulação por diversas moléculas. Dentre elas, podemos citar o fator 1 derivado do estroma (do inglês, *stromal cell-derived factor 1*; SDF-1 α) (ASAHARA; KAWAMOTO, 2004; BALAJI et al., 2013). O SDF-1 α é um fator quimiotático que estimula a adesão de EPCs, por aumentar a expressão de integrinas e ativar metaloproteinasas (MMP9), por meio do receptor CXCR4. Assim, a migração das células da medula óssea para circulação periférica é estimulada (CERADINI et al., 2004; DE FALCO et al., 2004; TILLING; CHOWIENCZYK; CLAPP, 2009). Após um evento isquêmico, por exemplo, essas células são mobilizadas da medula óssea para o tecido afetado onde atuarão diretamente ou indiretamente na promoção da vasculogênese (BALAJI et al., 2013). Neste caso, as EPCs contribuem indiretamente quando atuam de forma parácrina, liberando fatores angiogênicos como o próprio SDF-1 α e óxido nítrico (do inglês, *nitric oxide*; NO), por exemplo (CAIADO et al., 2008; LANDMESSER et al., 2004). Também podem atuar de maneira direta, quando diferenciam-se em células endoteliais maduras e, conseqüentemente, incorporam-se à parede dos vasos (Figura 1) (SUKMAWATI et al., 2016).

Figura 1 – Processo de vasculogênese. O tecido isquêmico libera citocinas que atuam na ativação e mobilização das células progenitoras endoteliais da medula óssea para o sangue periférico e tecidos, onde participam da formação de novos vasos sanguíneos. Essa participação deve-se à capacidade das EPCs de produzirem citocinas angiogênicas e de se incorporarem em vasos sanguíneos pré-existentes.

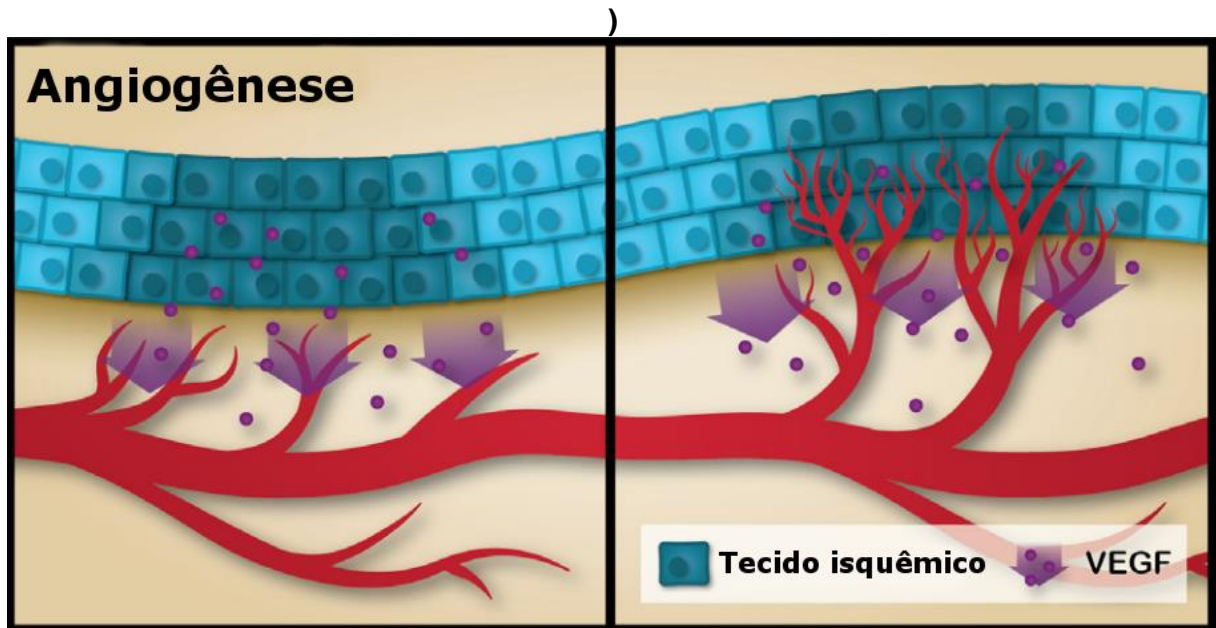


Fonte: Adaptado de (COOKE; LOSORDO, 2015)

4.2.2. Angiogênese

A angiogênese, também chamada de neovascularização, é caracterizada pelo crescimento de novos capilares a partir de vasos pré-existentes (ANNEX, 2013; DRAGNEVA; KORPISALO; YLÄ-HERTTUALA, 2013). O principal estímulo para a angiogênese em portadores da doença arterial periférica é a hipóxia, que estimula a liberação de fatores pró-angiogênicos no tecido isquêmico, como o fator de crescimento do endotélio vascular (do inglês, *vascular endothelial growth factor*, VEGF) (Figura 2) (HEIL et al., 2006; WAHLBERG, 2003). Os vasos recém formados contribuem para o suprimento de oxigênio e nutrientes no tecido isquêmico e devolvem a funcionalidade do membro afetado pela isquemia (DRAGNEVA; KORPISALO; YLÄ-HERTTUALA, 2013).

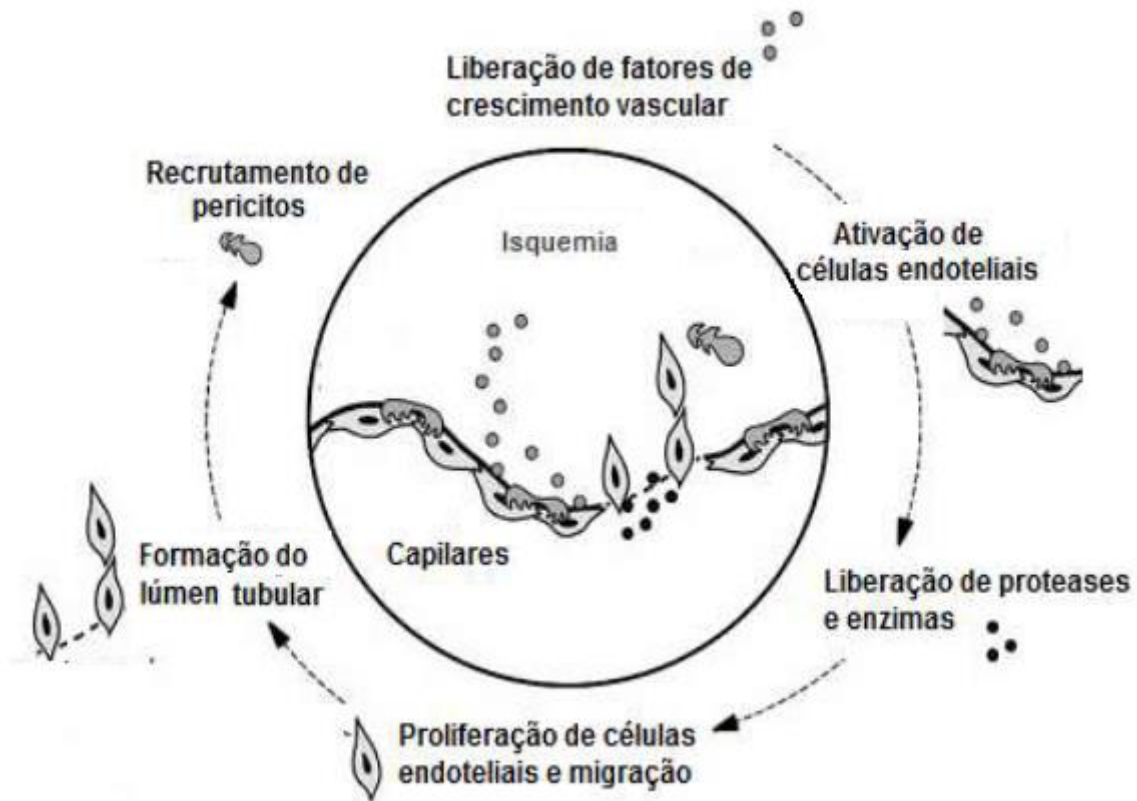
Figura 2 – Processo de angiogênese. O tecido isquêmico libera fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) em resposta à hipóxia.



Fonte: Adaptado de (COOKE; LOSORDO, 2015)

O processo de angiogênese segue uma sequência coordenada de eventos que requerem o aparecimento temporal de células e de moléculas específicas (LIEKENS; DE CLERCQ; NEYTS, 2001). Quando há um estímulo desencadeador da resposta angiogênica, primeiramente ocorre a alteração na adesão entre células endoteliais adjacentes e entre estas e pericitos (células perivasculares que envolvem os vasos sanguíneos) (SCHLINGEMANN et al., 1991). As células endoteliais ativadas produzem novas moléculas, como enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular e da membrana basal (MOSES, 1997; STETLER-STEVENSON, 1999). Em seguida, as células migram para o sítio de origem do estímulo angiogênico e formam pequenos capilares. Posteriormente, as células endoteliais proliferam. Esse processo leva ao alinhamento destas células e à formação do lúmen tubular do vaso (Figura 3) (ANNEX, 2013; BUSSOLINO; MANTOVANI; PERSICO, 1997; PAPETTI; HERMAN, 2002).

Figura 3 – Esquema ilustrando a seqüência de eventos desencadeados em um processo angiogênico. A isquemia tecidual leva a liberação de fatores de crescimento vascular responsáveis pela ativação das células endoteliais, quando ativadas, liberam enzimas que degradam a matriz extracelular possibilitando sua migração, proliferação e a formação de novos vasos.



Adaptado de (LAWALL; BRAMLAGE; AMANN, 2010)

Durante o processo de maturação e estabilização do novo vaso, uma nova membrana basal é produzida pela produção e depósito de novos componentes da matriz extracelular. Somado a isso, os pericitos migram para o local do vaso recém-formado onde, após se associarem à superfície das células endoteliais, exercem funções para prover suporte estrutural e contribuir para o controle do crescimento deste. Os vasos recém-formados conectam-se a outros vasos, novos ou pré-existentes, reestabelecendo o fluxo sanguíneo. Os novos vasos podem permanecer ou sofrer regressão, caso não sejam mais necessários (BECK; D'AMORE, 1997; GRIFFIOEN; MOLEMA, 2000).

4.2.3. Arteriogênese

A arteriogênese promove o desenvolvimento de vasos colaterais a partir de arteríolas pré-existentes, processo denominado crescimento *de novo* (HEIL et al., 2006). O desenvolvimento de vasos colaterais também ocorre pelo remodelamento de ramos arteriais pouco perfundidos (SCHAPER, 2009) e é, principalmente estimulado, por forças mecânicas e/ou pelo processo inflamatório. Em casos de pacientes com PAD, esses processos poderiam ajudar na recuperação da perfusão sanguínea (DEINDL et al., 2001; SCHAPER; SCHOLZ, 2003; TROIDL; SCHAPER, 2012; VAN ROYEN et al., 2001a).

A arteriogênese é caracterizada pelo remodelamento de ramos arteriais pouco perfundidos. O estímulo inicial é o estresse de cisalhamento, que leva a um aumento do calibre de vasos a partir da estimulação da migração e proliferação de células endoteliais e murais (Figura 4). Neste contexto, o endotélio é ativado por forças mecânicas e começa a produzir quimiocinas, fatores de crescimento, óxido nítrico sintase (do inglês, *endothelial nitric oxide synthase*; eNOS) e moléculas de adesão, como ICAM-1 e VCAM, as quais favorecem o recrutamento de leucócitos para região isquêmica, principalmente monócitos (SCHOLZ et al., 2003). No tecido, os monócitos se diferenciam em macrófagos e produzem fatores de crescimento que estimulam a proliferação de células endoteliais e murais, levando ao aumento do diâmetro de vasos colaterais pré-existentes (CAI; SCHAPER, 2008; SCHAPER; SCHOLZ, 2003). Quando a arteriogênese ocorre pelo processo *de novo*, o surgimento de vasos colaterais é consequência da migração e proliferação de células endoteliais e de musculatura lisa da parede de arteríolas pré-existentes, formando uma nova rede arteriolar. Por esse motivo, esse processo é considerado análogo à angiogênese, diferindo apenas que ocorre a partir de arteríolas (HEIL; SCHAPER, 2007).

Figura 4 – Processo de arteriogênese. A obstrução do vaso gera um aumento no estresse de cisalhamento, estimulando a arteriogênese. Com isso, haverá aumento do calibre dos vasos próximos, com o objetivo de reestabelecer o fluxo sanguíneo adequado.



Fonte: Adaptado de (COOKE; LOSORDO, 2015)

Após a obstrução do fluxo sanguíneo arterial, a força de cisalhamento ativa o endotélio, promovendo a liberação de NO que, por sua vez, atua nas células da musculatura lisa, levando-as ao relaxamento e conseqüente vasodilatação arterial. Além disso, também há o estímulo das células endoteliais para produzirem VEGF (ANDO; YAMAMOTO, 2009; EGGINTON, 2011; HUDLICKA; BROWN, 2009).

Em modelos animais foi mostrado que o processo de arteriogênese promove o aumento de 2 a 20 vezes o diâmetro de arteríolas pré-existentes (VAN ROYEN et al., 2001). Um estudo mostra que esse processo pode restaurar a condição vascular normal em animais isquêmicos que sofreram oclusão da artéria femoral (CAI; SCHAPER, 2008). Esse dado corrobora a observação clínica, onde uma porcentagem muito pequena de pacientes com PAD são assintomáticos para isquemia por terem formado uma nova rede de vasos, o que permitiu suprir as necessidades do tecido (Figura 5) (DIEHM et al., 2007).

Figura 5 – Angiografia mostrando o remodelamento da rede vascular após obstrução da artéria femoral. Angiografia feita por ressonância magnética com contraste. A seta grossa indica a obstrução da artéria femoral e a seta fina mostra a artéria femoral profunda. A figura mostra a diferença entre a artéria femoral profunda normal (lado direito) e a que sofreu remodelamento após obstrução da artéria femoral (lado esquerdo).



Fonte: (ANNEX, 2013)

4.3 Terapia gênica

A terapia gênica seria uma boa opção de tratamento para PAD, pois pode induzir e/ou aumentar a neovascularização no membro isquêmico, reestabelecendo o fluxo sanguíneo e devolvendo sua funcionalidade. Ela tem como objetivo a transferência de genes exógenos para o paciente, que pode amplificar ou inibir a atividade de genes e suas proteínas. Desta forma, a terapia gênica pode ser aplicada para a maioria das doenças, independentemente do seu caráter etiológico, genético ou adquirido (HAN., 2007).

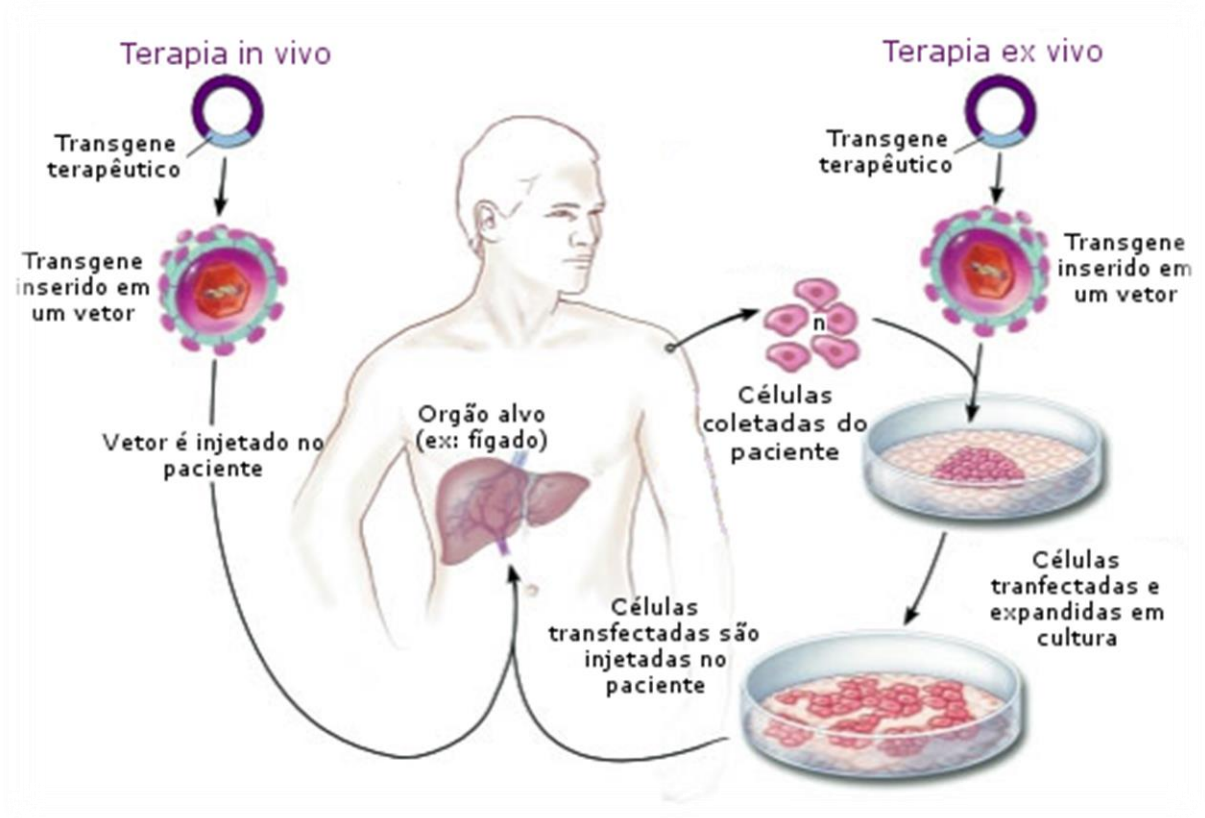
Existem dois tipos de técnicas utilizadas na terapia gênica: a germinativa, que se caracteriza pela integração de genes exógenos ao genoma das células germinativas, e, dessa forma, as mudanças induzidas pela terapia seriam herdadas pelas próximas gerações (MATTHEWS; CURIEL, 2007), e a somática, onde os genes

são transferidos para as células somáticas do paciente, e as mudanças não são herdadas por gerações futuras (BANK, 1996).

Para garantir que o gene seja inserido na célula alvo (processo chamado de “entrega” do gene), deve ser utilizado um carreador de molécula denominado vetor (GARDLÍK et al., 2005). O vetor ideal deve ser específico, capaz de entregar genes do tamanho necessário para a terapia em questão, passar despercebido pelo sistema imune e ser produzido e purificado em grandes quantidades com o menor preço possível. Após introduzido no paciente, não deve gerar alergias nem resposta inflamatória e deve expressar o gene pelo tempo necessário para chegar ao efeito desejado (MISRA, 2013).

A terapia gênica pode ser dividida em dois tipos: *ex vivo* e *in vivo*. Na *ex vivo*, células são coletadas do paciente e mantidas *in vitro*. Então, os vetores são utilizados para a entrega do gene (transfecção do gene). Após transfecção, as células são reintroduzidas no paciente para que produzam a proteína necessária para combater a doença. Na *in vivo*, os vetores são introduzidos no paciente para que a transfecção ocorra em seu próprio organismo (Figura 6) (ROMANO; PACILIO; GIORDANO, 1999).

Figura 6 – Terapia gênica *ex vivo* e *in vivo*. Na terapia *ex vivo*, células são coletadas, transfectadas e expandidas *in vitro* e então devolvidas para o paciente. Já na terapia *in vivo*, o vetor é injetado diretamente no paciente e a transfecção ocorre em seu próprio organismo.



Fonte: Adaptado de (COLLINS; THRASHER, 2015)

Existem diversos tipos de vetores que podem ser classificados em dois grandes grupos: vetores virais e não virais. Os vetores virais são provenientes de vírus geneticamente modificados, onde os genes patogênicos são removidos e o gene que deve ser expresso nas células é inserido. Dessa forma, o vírus perde sua capacidade patogênica e adquire a função de carrear e entregar material para as células alvo (WALTHER; STEIN, 2000).

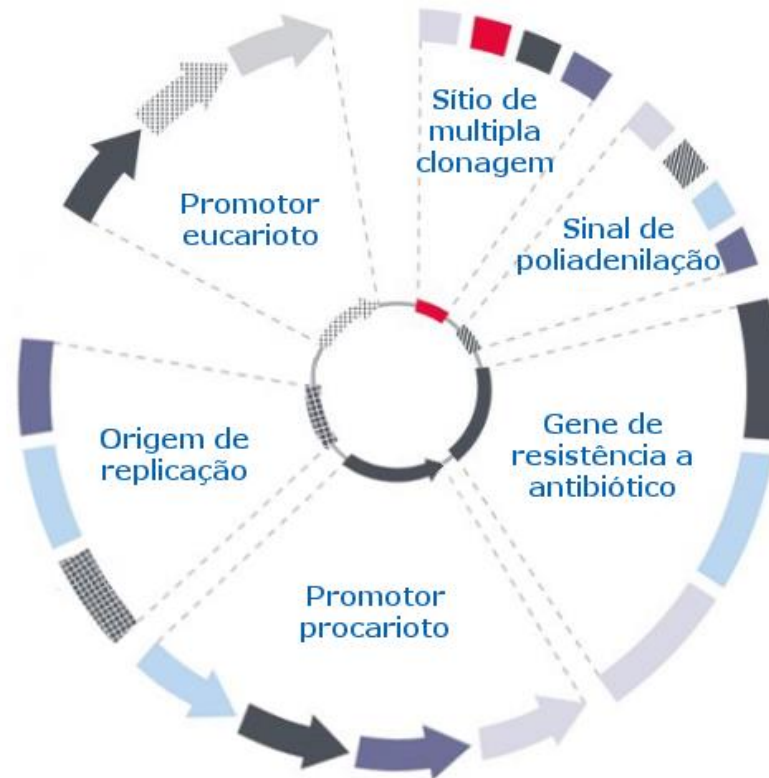
Os retrovírus foram os primeiros utilizados como vetores na terapia genica. Esses possuem genoma de RNA, convertido em DNA dupla fita devido à ação da enzima transcriptase reversa. O material viral é integrado à sequência no DNA genômico da célula devido à ação da enzima integrase (MISRA, 2013). Apesar de os retrovírus serem usados em terapias genicas até os dias de hoje, eles apresentam alguns problemas. O principal deles é que o vírus pode integrar seu genoma em qualquer região do DNA da célula hospedeira, podendo gerar uma mutagênese

insercional, caso interrompa algum outro gene. Caso a integração ocorra dentro da sequência de um gene relacionado à divisão celular, pode-se culminar com a formação de um tumor (BAUM et al., 2003). Os vetores lentivirais são muito semelhantes aos retrovirais, porém são preferidos quando o objetivo da terapia envolva transfecção de células com baixo poder replicativo. Isso ocorre devido sua característica de infectar tanto células em divisão quanto células que não estejam em divisão (LEWIS; HENSEL; EMERMAN, 1992; WEINBERG et al., 1991).

Os adenovírus, por sua vez, são uma classe de vírus com genoma composto por duas fitas de DNA e geralmente são responsáveis pela gripe comum. A diferença principal em relação aos retrovírus e lentivírus é que, durante infecção, seu genoma não é integrado ao DNA do hospedeiro. Uma vez que o genoma do adenovírus está dentro do núcleo, os genes de seu DNA começam a ser transcritos como qualquer outro gene e, pelo fato de não ocorrer integração, problemas relacionados a esse processo não são mais observados. Porém, esse tipo de vetor possui maior facilidade de ser reconhecido pelo sistema imune do hospedeiro, e as grandes quantidades de vírus necessárias para o tratamento podem gerar uma resposta inflamatória indesejável (MISRA, 2013; VORBURGER; HUNT, 2002).

Tendo em vista as desvantagens dos vetores virais, os pesquisadores começaram a procurar alternativas mais seguras para entrega dos genes exógenos, e, com isso, os vetores não virais ganharam foco. O vetor plasmidial é um DNA dupla fita circular, extra cromossômico, capaz de se autorreplicar. Geralmente são compostos por sequências procariotas e eucariotas. A origem de replicação e gene de resistência a antibiótico são sequências procariotas responsáveis pela amplificação do vetor em bactérias. As eucariotas, por sua vez, são responsáveis pela expressão do transgene em células eucariotas e são constituídas por sequência de poliadenilação, promotor e gene de interesse inserido no sítio de múltipla clonagem. (Figura 7) (PRAZERES; MONTEIRO, 2014).

Figura 7 – Principais características do vetor plasmidial. O vetor plasmidial possui sequências procariotas e eucariotas. As procariotas são compostas por: origem de replicação, promotor procarioto e gene de resistência a antibiótico. As eucariotas, por sua vez, são compostas por: promotor eucarioto, sítio de poliadenilação e gene exógeno inserido no sítio de múltipla clonagem.



Fonte: Adaptado de (GeneArt™ Plasmid Construction Service, Thermo Fischer Scientific, 2016)

A entrega desses plasmídeos para o núcleo das células do paciente, com subsequente expressão do transgene, é uma etapa crítica no processo da terapia (PRAZERES, 2011). No entanto, essa entrega é dificultada porque as moléculas de DNA encontram uma série de barreiras até sua chegada no núcleo, como capilares, espaços intersticiais, fluídos corporais, citoplasma, fagócitos mononucleares, componentes sanguíneos, pH ácido, plasma e endonucleases celulares, membranas celulares, endossomos, lisossomos e poros nucleares estreitos (GRIGSBY; LEONG, 2010; NISHIKAWA; HUANG, 2001). Dessa forma, a eficiência da terapia é dependente de métodos de entrega adequados para superar essas barreiras e garantir que uma quantidade significativa de plasmídeo chegue no núcleo e expresse o gene de interesse.

Os métodos de entrega do plasmídeo foram surgindo e sendo aprimorados com o passar do tempo. Inicialmente, os plasmídeos eram injetados diretamente no músculo juntamente com uma solução salina (WOLFF et al., 1990). Porém, mesmo sendo um método simples, barato e seguro, a eficiência de expressão do transgene era inferior em comparação

com outras metodologias de entrega (WOLFF; BUDKER, 2005). Essa baixa eficiência pode ser melhorada pela formação de campos magnéticos gerados por pulsos de alta energia, via eletroporação. Esses campos magnéticos desestabilizam a membrana celular e forçam a passagem dos plasmídeos carregados negativamente pelos poros e pelo citoplasma (DENET; VANBEVER; PRÉAT, 2004; ESCOFFRE et al., 2009). Outros autores associam a entrada dos plasmídeos pela membrana desestabilizada por difusão passiva (CHIARELLA et al., 2008) ou pela formação de vesículas que são endocitadas (FAURIE et al., 2010).

O método de bombardeamento de partículas é um dos mais efetivos de entrega para células e tecidos, sendo utilizado um dispositivo denominado *gene gun*. Uma vez que o dispositivo é acionado, gases são pressurizados, propulsionando os plasmídeos que estão associados às micropartículas metálicas para o órgão ou tecido alvo. As micropartículas ejetadas penetram na pele e atravessam a membrana, citoplasma e núcleo das células. Como micropartícula, o ouro tem sido o metal mais utilizado na prática clínica (DEAN; FULLER; OSORIO, 2003; DEAN; HAYNES; SCHMALJOHN, 2005; VILLEMEJANE; MIR, 2009).

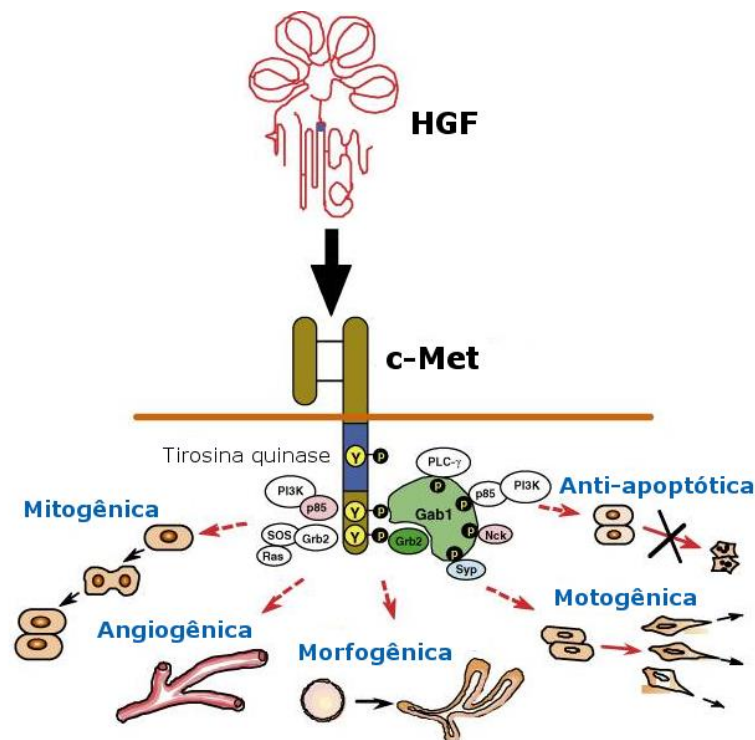
Existem técnicas que associam os plasmídeos a lipídeos catiônicos e polímeros. A metodologia é baseada na interação eletrostática entre os plasmídeos e os lipídeos catiônicos (TEMPLETON et al., 1997) ou polímeros (FARRELL et al., 2007). Como resultado dessa interação, os plasmídeos condensam e adquirem um tamanho muito menor do que os não associados e o envelope catiônico formado favorece a sua internalização por fagocitose (PRAZERES; MONTEIRO, 2014). Diferente das metodologias descritas anteriormente, quando os plasmídeos são associados à micro e nanopartículas, sua liberação ocorre gradualmente e de forma duradoura no tecido (ARAL; AKBUGA, 2003; BASARKAR et al., 2007; JONES et al., 1997). As partículas carregadas com plasmídeos podem ser injetadas por via subcutânea ou intramuscular, sendo fagocitadas por macrófagos e/ou células dendríticas e transportadas para o linfonodo, onde os plasmídeos serão gradualmente liberados (SINGH et al., 2000).

Apesar de a entrega dos plasmídeos ser uma etapa crucial da terapia, a escolha do transgene é tão importante quanto. No caso de uma terapia gênica para doença arterial periférica, é ideal a escolha de genes que estão de alguma forma relacionados com a neovascularização, para que quando entregues ao paciente, consigam formar uma nova rede sanguínea, capaz de voltar a suprir a demanda metabólica do membro afetado.

4.4 Fator de crescimento de hepatócitos

O fator de crescimento de hepatócitos (do inglês, *hepatocyte growth factor*, HGF) foi primeiramente descrito por sua capacidade de promover intensa proliferação de hepatócitos (NAKAMURA; TERAMOTO; ICHIHARA, 1986). É um dímero composto por uma subunidade- α (69kDa) e uma subunidade- β (34kDa) ligadas por uma ligação dissulfeto (NAKAMURA; MIZUNO, 2010) e seu receptor é denominado c-Met. Este é composto por uma cadeia- α de 50kD e uma cadeia- β de 145kD (BOTTARO et al., 1991) e é expresso por células endoteliais, músculo liso e células progenitoras endoteliais (WOJAKOWSKI et al., 2004). A cadeia- α é extracelular enquanto que a cadeia- β é uma subunidade transmembrana contendo um domínio tirosina quinase intracelular. A ligação entre HGF e c-Met leva à fosforilação do domínio intracelular e resulta em uma série de atividades biológicas diferentes, incluindo atividades mitogênicas, motogênicas, morfogênicas, angiogênicas e anti-apoptóticas (BIRCHMEIER; GHERARDI, 1998; NAKAMURA, 1991) (Figura 8).

Figura 8 – Interação entre HGF e c-Met. Quando há ligação entre o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e seu receptor, c-Met, podemos observar atividades mitogênicas, angiogênicas, morfogênicas, motogênicas e anti-apoptóticas.



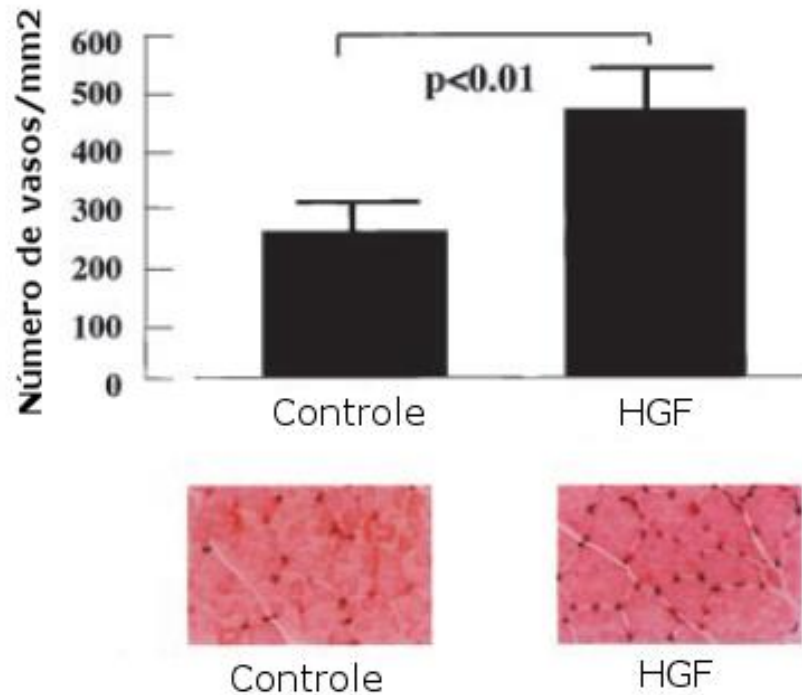
Fonte: Adaptado de (NAKAMURA; MIZUNO, 2010)

Dentre outros fatores, o HGF é um importante fator pró-angiogênico capaz de estimular a formação de novos vasos sanguíneos e aumentar o fluxo sanguíneo (BUSSOLINO et al., 1992; GRANT et al., 1993). Sua característica angiogênica se deve à sua ação direta ou indireta em células endoteliais e células da musculatura lisa. O HGF está relacionado com a diminuição de apoptose (NAKAGAMI et al., 2000, 2001; YAMAMOTO et al., 2001) e aumento de proliferação e migração de células endoteliais. Esse aumento é observado quando o HGF induz a liberação de VEGF-A por células da musculatura lisa (VAN BELLE et al., 1998), que, por sua vez, aumenta a permeabilidade vascular (WEIS; CHERESH, 2005) gerando edema e também está relacionado com o aumento da expressão de moléculas de adesão (NG; ADAMIS, 2005), o que pode levar a uma inflamação exacerbada. Por outro lado, o HGF diminui a permeabilidade vascular e a expressão de moléculas de adesão pelo endotélio (BIRUKOVA et al., 2009; LIU et al., 2002; SINGLETON et al., 2007), e, com isso, os efeitos adversos do VEGF-A estarão compensados.

Os mecanismos por trás da interação entre o HGF e as células da musculatura lisa não foram totalmente elucidados; porém, durante angiogênese, o HGF possui papel importante na estabilização de vasos recém-formados. Ele medeia a interação de angiopoietina com seu receptor (Tie2), recrutando células de musculatura lisa para as células endoteliais e auxiliam no processo de maturação vascular (KOBAYASHI et al., 2006). Devido a suas propriedades angiogênicas, o HGF tem sido amplamente estudado como tratamento de doença arterial periférica.

Em modelos animais, a terapia gênica usando HGF e vetor plasmidial demonstrou eficácia em aumentar significativamente a angiogênese (HAYASHI et al., 1999; HIRAOKA et al., 2003; KOIKE et al., 2003; MORISHITA et al., 1999). Primeiro, os efeitos angiogênicos da terapia gênica com HGF foram analisados em modelos animais de isquemia de membro. Os animais que receberam o tratamento com o vetor plasmidial contendo o HGF humano mostraram um aumento significativo no fluxo sanguíneo e da densidade capilar nos membros isquêmicos quando comparados com os animais controle (TANIYAMA et al., 2001) (Figura 9).

Figura 9 – Efeito do tratamento utilizando HGF no número de vasos por milímetro cúbico de músculo dos camundongos. Essa figura mostra o aumento do número de vasos nos músculos dos camundongos tratados 5 semanas após tratamento em comparação ao grupo controle.

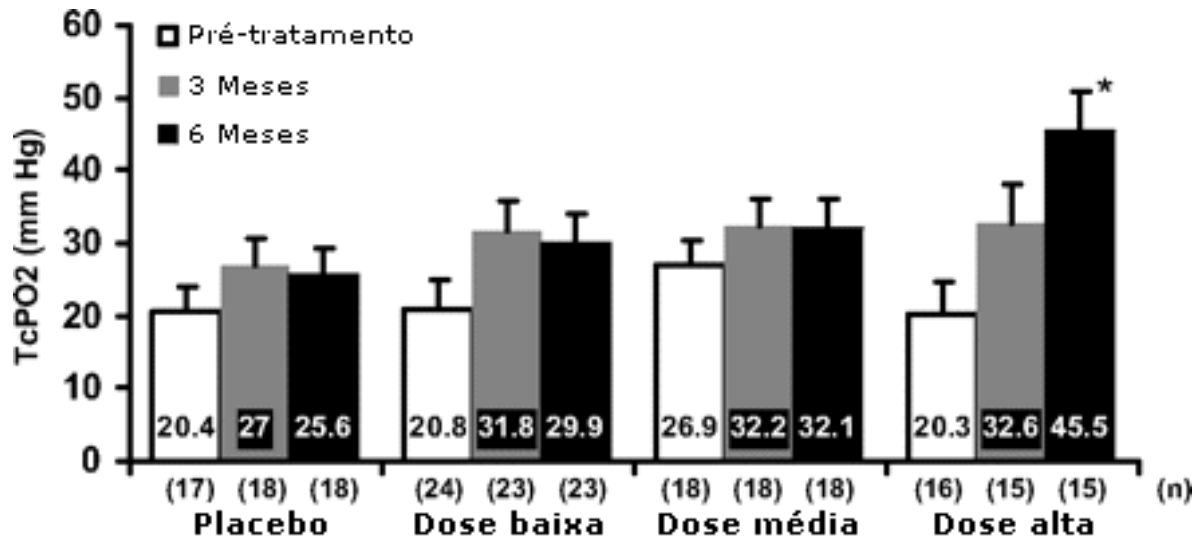


Fonte: Adaptado de (TANIYAMA et al., 2001)

Tendo em vista os resultados promissores em modelos animais, estudos clínicos utilizando HGF humano e vetores plasmidiais foram iniciados. O vetor utilizado nesses estudos, pVAXI, foi especialmente elaborado para fins clínicos (MIYAZAWA et al., 1993). Atualmente, cinco estudos clínicos foram completados, os quais mobilizaram um total de 207 pacientes com PAD nos Estados Unidos e Japão (SUZUKI et al., 2016).

Powell e colaboradores (2008) foram os primeiros a conduzirem um estudo clínico nessa área. Esse estudo mostrou que a injeção via intramuscular do plasmídeo é segura para o tratamento de pacientes com PAD e mostrou um aumento da perfusão do membro isquêmico quando realizada a medida transcutânea da pressão parcial de oxigênio (do inglês, *transcutaneous oxygen pressure*; TcPO₂) (Figura 10).

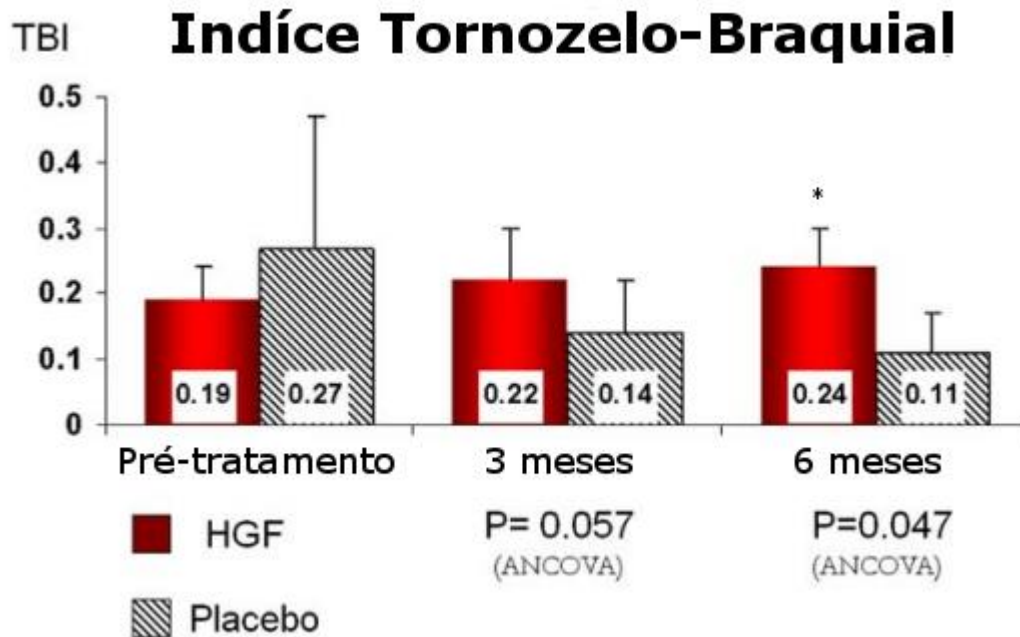
Figura 10 – Medida transcutânea da pressão parcial de oxigênio (TcPO₂) pré-tratamento, 3 e 6 meses. Essa figura mostra o aumento da medida transcutânea da pressão parcial de oxigênio(TcPO₂) observado no grupo de pacientes tratados com a dose alta 6 meses após tratamento. **p* < 0,05 vs pré-tratamento. Os dados estão mostrados como média ± erro da média.



Fonte: Adaptado de (POWELL et al., 2008)

Devido aos resultados promissores, uma nova etapa do estudo foi iniciada para melhor avaliação do tratamento. Powell e colaboradores (2010), no segundo estudo, recrutaram pacientes que possuíam claudicação intermitente para avaliar novamente a segurança do tratamento, avaliar a capacidade do tratamento de aumentar a perfusão do membro e de melhorar a cicatrização de feridas. Os pacientes selecionados foram separados em dois grupos, um grupo recebeu o placebo e o outro grupo recebeu 4mg do plasmídeo codificando HGF humano por via intramuscular nos dias 0,14 e 28. Os pacientes foram acompanhados durante 11 meses. Após 6 meses os pacientes tratados com HGF mostraram melhora significativa no índice tornozelo-braquial (do inglês, *ankle-brachial index*; ABI) quando comparados ao grupo placebo (Figura 11).

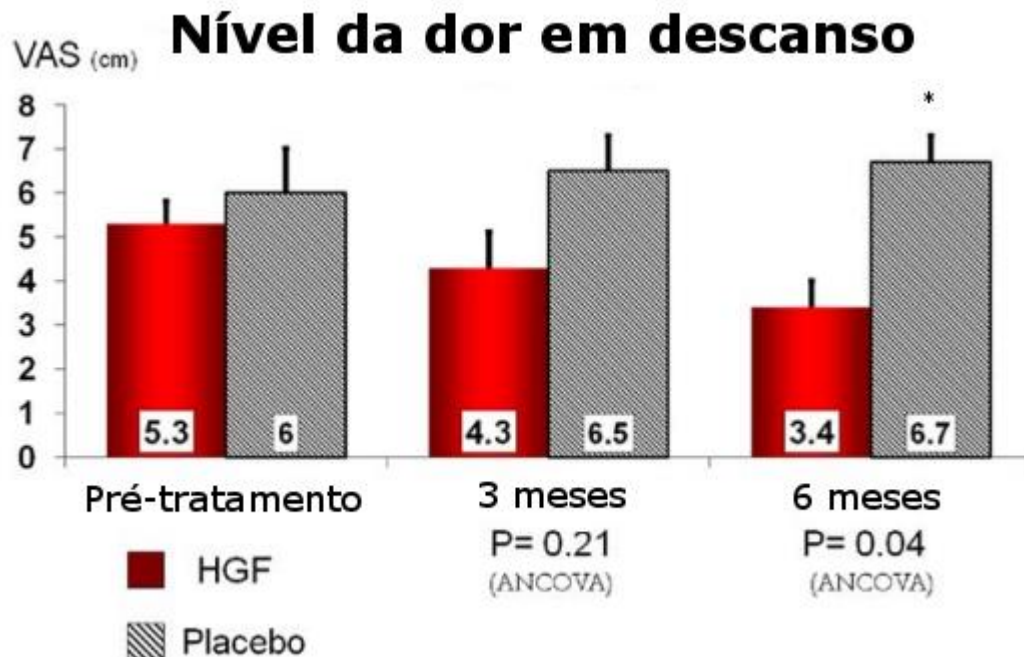
Figura 11 – Índice tornozelo-braquial pré-tratamento, 3 e 6 meses pós tratamento. Essa figura mostra o aumento do índice tornozelo-braquial (ABI) no grupo tratado com fator de crescimento de hepatócitos (HGF) enquanto que o grupo placebo mostrou piora no ABI. Após 6 meses, os resultados já foram estatisticamente significativos. * $p = 0,047$.



Fonte: Adaptado de (POWELL et al., 2010)

Utilizando a escala visual analógica (do inglês, *visual analogue scale*; VAS) para avaliar a dor em descanso, os autores mostraram ainda que o grupo tratado com HGF teve uma VAS menor do que a apresentada no começo do estudo enquanto que o grupo placebo obteve uma VAS maior do que a apresentada no começo do estudo (Figura 12).

Figura 12 – Alteração do nível de dor em descanso pré-tratamento, 3 meses e 6 meses após tratamento. A figura retrata as alterações no nível da dor em descanso quando medidas pela escala visual analógica (VAS) no grupo tratado e no grupo placebo nos tempos pré-tratamento, 3 meses e 6 meses pós-tratamento. * $p < 0,04$.

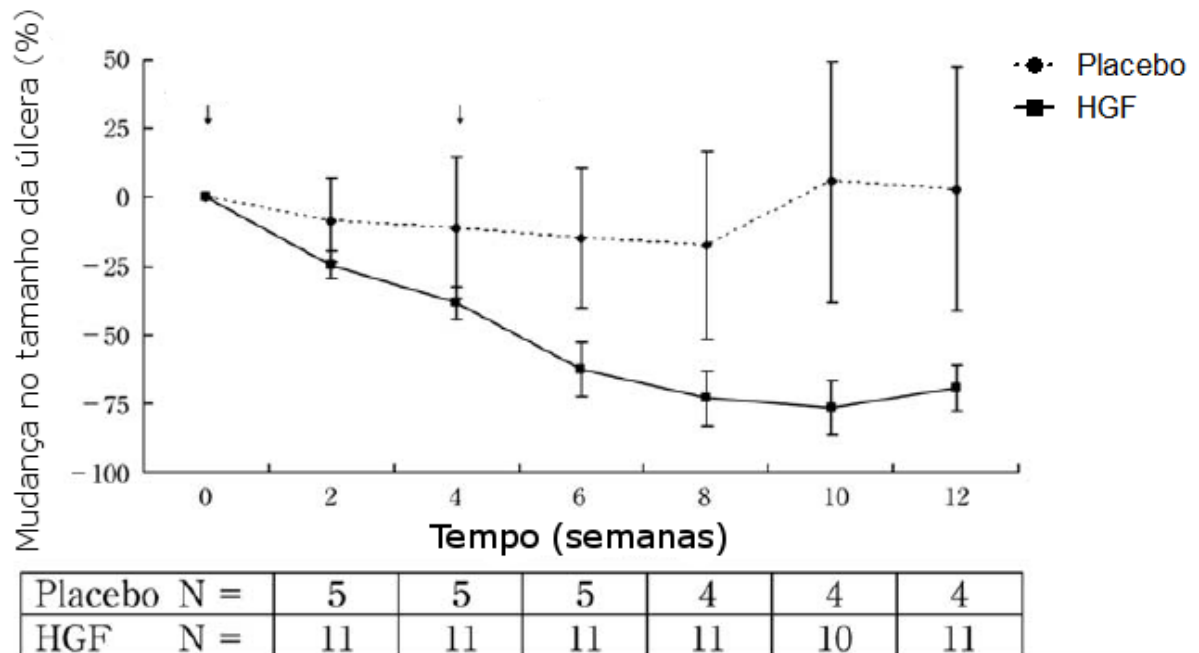


Fonte: Adaptado de (POWELL et al., 2010)

Os dados da ABI, somados aos dados da VAS, suportam o conceito de que a terapia gênica utilizando HGF é capaz de manter a perfusão do membro e reduzir a dor em descanso.

No mesmo ano, outro grupo publicou um os resultados de um estudo clínico com terapia gênica utilizando HGF (SHIGEMATSU et al., 2010). Nesse, o gene também foi injetado via intramuscular nos membros afetados; porém, o principal objetivo do grupo foi observar a ação da terapia na regeneração de úlceras geradas pela isquemia. A área das úlceras foi medida semanalmente e, após 12 semanas de acompanhamento foi possível observar que o grupo tratado mostrou maior cicatrização quando comparados ao grupo placebo (Figura 13).

Figura 13 – Alteração no tamanho das úlceras isquêmicas. A figura mostra a alteração no tamanho das úlceras isquêmicas ao longo do tempo. As setas indicam as aplicações do plasmídeo codificando fator de crescimento de hepatócitos (HGF).



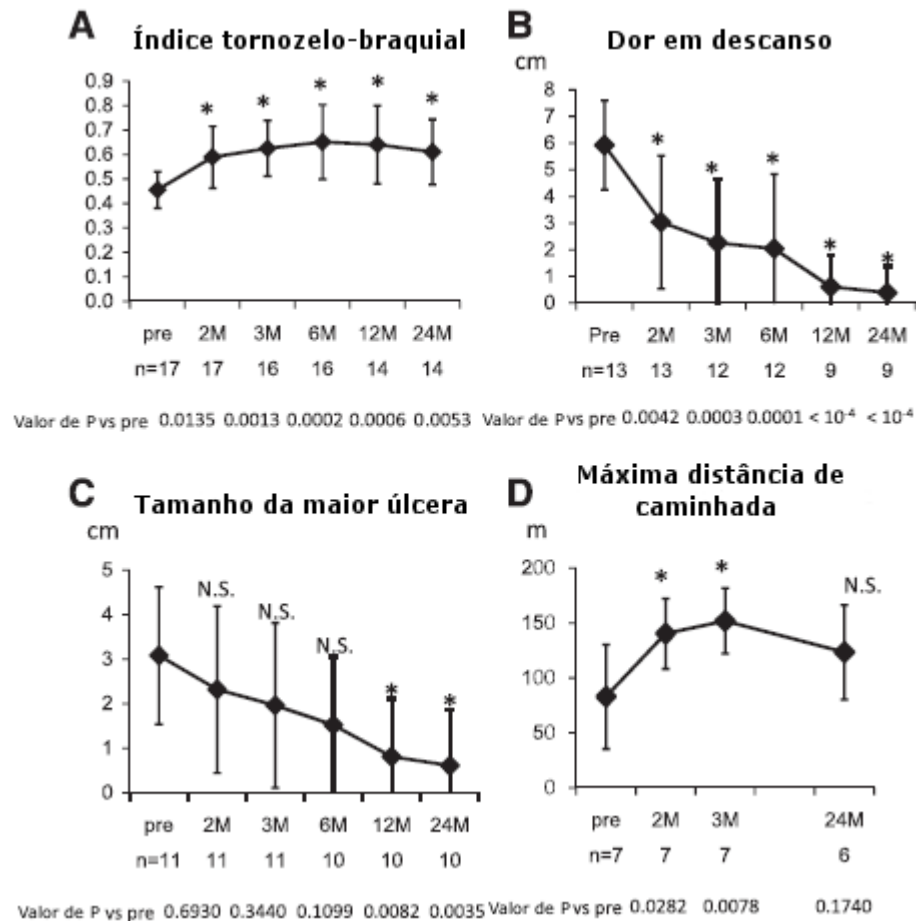
Fonte: Adaptado de (SHIGEMATSU et al., 2010).

Esses dados mostram que a terapia gênica utilizando HGF foi eficaz no tratamento de úlceras isquêmicas e o grupo relata que a terapia foi bem tolerada pelos pacientes, indicando que a terapia é segura.

Por fim, um grupo japonês publicou dois estudos clínicos sobre terapia gênica utilizando HGF. No primeiro, foi testada a segurança e a viabilidade da transferência do plasmídeo codificando HGF e, avaliou seu potencial terapêutico (MORISHITA et al., 2011). No segundo, acompanhou-se os pacientes do primeiro estudo durante 2 anos pós tratamento (MAKINO et al., 2012).

Após dois anos, os pacientes mostraram uma melhora significativa no ABI, na dor em descanso medida por VAS e na cicatrização de úlceras. Não houve diferença significativa quando medida a distância máxima de caminhada (Figura 14).

Figura 14 – Avaliação do índice tornozelo-braquial, da dor em descanso, do tamanho da úlcera e da distância máxima de caminhada após dois anos de tratamento. A, mudanças do índice tornozelo-braquial. B, dor em descanso medida pela escala visual analógica. C, tamanho das maiores úlceras. D, máxima distância de caminhada.



Fonte: Adaptado de (MAKINO et al., 2012)

Com esses resultados, os pesquisadores mostram que a terapia é segura, viável e com potencial terapêutico para o tratamento da doença arterial periférica. Porém, ainda é necessário avaliar o tratamento em um maior número de pacientes e avaliar mais especificamente sua funcionalidade.

5 CONCLUSÃO

A terapia gênica pode ser uma alternativa para o tratamento de pacientes com doença arterial periférica onde a entrega de transgenes específicos, capazes de induzir e/ou aumentar a neovascularização no membro afetado pode reestabelecer o fluxo sanguíneo do mesmo. Estudos clínicos de terapia gênica com fator de crescimento de hepatócitos na doença arterial periférica têm mostrado resultados promissores, onde vê-se um aumento no índice tornozelo-braquial e uma redução na dor em descanso e na área de úlceras dos membros afetados. Em conjunto, esses resultados mostram que a terapia foi capaz de devolver, mesmo que parcialmente, o fluxo sanguíneo mínimo para que a demanda metabólica tecidual fosse suprida. Porém, novos estudos clínicos, com maior número de participantes, são necessários para comprovar a eficácia terapêutica e a segurança dessa terapia.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, V. et al. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 24, n. 4, p. 684–90, abr. 2004.
- ANDO, J.; YAMAMOTO, K. Vascular Mechanobiology. **Circulation Journal**, v. 73, n. 11, p. 1983–1992, 2009.
- ANNEX, B. H. Therapeutic angiogenesis for critical limb ischaemia. **Nature Reviews Cardiology**, v. 10, n. 7, p. 387–396, 14 maio 2013.
- ARAL, C.; AKBUGA, J. Preparation and in vitro transfection efficiency of chitosan microspheres containing plasmid DNA:poly(L-lysine) complexes. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques**, v. 6, n. 3, p. 321–6, 2003.
- ARONOW, W. S. Management of peripheral arterial disease of the lower extremities in elderly patients. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 59, n. 2, p. 172–7, fev. 2004.
- ASAHARA, T. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 275, n. 5302, p. 964–7, 14 fev. 1997.
- ASAHARA, T.; KAWAMOTO, A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 287, n. 3, p. C572-9, 28 set. 2004.
- BALAJI, S. et al. The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing. **Advances in wound care**, v. 2, n. 6, p. 283–295, jul. 2013.
- BANK, A. Human somatic cell gene therapy. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 18, n. 12, p. 999–1007, dez. 1996.
- BAPTISTA-SILVA, J. C. C. Isquemia Crônica Crítica de Membro: Diagnóstico Clínico. **Angiologia e cirurgia vascular: guia ilustrado**, p. 1–16, 2004.
- BASARKAR, A. et al. Preparation, characterization, cytotoxicity and transfection efficiency of poly(DL-lactide-co-glycolide) and poly(DL-lactic acid) cationic nanoparticles for controlled delivery of plasmid DNA. **International journal of pharmaceuticals**, v. 343, n. 1–2, p. 247–54, 1 out. 2007.
- BAUM, C. et al. Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 101, n. 6, p. 2099–114, 15 mar. 2003.
- BECK, L.; D'AMORE, P. A. Vascular development: cellular and molecular regulation. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 11, n. 5, p. 365–73, abr. 1997.

BELCH, J. J. F. et al. Critical issues in peripheral arterial disease detection and management: a call to action. **Archives of internal medicine**, v. 163, n. 8, p. 884–92, 28 abr. 2003.

BIRCHMEIER, C.; GHERARDI, E. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. **Trends in cell biology**, v. 8, n. 10, p. 404–10, out. 1998.

BIRUKOVA, A. A. et al. Paxillin is involved in the differential regulation of endothelial barrier by HGF and VEGF. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 40, n. 1, p. 99–107, jan. 2009.

BOTTARO, D. P. et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. **Science (New York, N.Y.)**, v. 251, n. 4995, p. 802–4, 15 fev. 1991.

BUSSOLINO, F. et al. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. **The Journal of cell biology**, v. 119, n. 3, p. 629–41, nov. 1992.

BUSSOLINO, F.; MANTOVANI, A.; PERSICO, G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. **Trends in biochemical sciences**, v. 22, n. 7, p. 251–6, jul. 1997.

CAI, W.; SCHAPER, W. **Mechanisms of arteriogenesis Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, 2008.

CAIADO, F. et al. Notch pathway modulation on bone marrow-derived vascular precursor cells regulates their angiogenic and wound healing potential. **PLoS ONE**, v. 3, n. 11, 2008.

CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nature medicine**, v. 6, n. 4, p. 389–395, 2000.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature medicine**, v. 9, n. 6, p. 653–60, jun. 2003.

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

CHIARELLA, P. et al. Electroporation of skeletal muscle induces danger signal release and antigen-presenting cell recruitment independently of DNA vaccine administration. **Expert opinion on biological therapy**, v. 8, n. 11, p. 1645–57, nov. 2008.

COLLINS, M.; THRASHER, A. Gene therapy: progress and predictions. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1821, p. 20143003, 22 dez. 2015.

CONTE, M. S. et al. Society for Vascular Surgery practice guidelines for atherosclerotic occlusive disease of the lower extremities: management of asymptomatic disease and claudication. **Journal of vascular surgery**, v. 61, n. 3 Suppl, p. 2S–41S, mar. 2015.

CONWAY, E. M.; COLLEN, D.; CARMELIET, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. **Cardiovascular research**, v. 49, n. 3, p. 507–21, 16 fev. 2001.

COOKE, J. P.; CHEN, Z. A compendium on peripheral arterial disease. **Circulation research**, v. 116, n. 9, p. 1505–8, 24 abr. 2015.

COOKE, J. P.; LOSORDO, D. W. Modulating the vascular response to limb ischemia: angiogenic and cell therapies. **Circulation research**, v. 116, n. 9, p. 1561–78, 24 abr. 2015.

CRIQUI, M. H.; ABOYANS, V. Epidemiology of peripheral artery disease. **Circulation research**, v. 116, n. 9, p. 1509–26, 24 abr. 2015.

DE FALCO, E. et al. SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. **Blood**, v. 104, n. 12, p. 3472–82, 1 dez. 2004.

DEAN, H. J.; FULLER, D.; OSORIO, J. E. Powder and particle-mediated approaches for delivery of DNA and protein vaccines into the epidermis. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 26, n. 5–6, p. 373–88, out. 2003.

DEAN, H. J.; HAYNES, J.; SCHMALJOHN, C. The role of particle-mediated DNA vaccines in biodefense preparedness. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 9, p. 1315–42, 17 jun. 2005.

DEINDL, E. et al. Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. **Circulation research**, v. 89, n. 9, p. 779–86, 26 out. 2001.

DENET, A.-R.; VANBEVER, R.; PRÉAT, V. Skin electroporation for transdermal and topical delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 5, p. 659–74, 27 mar. 2004.

DEWEESE, J. A.; LEATHER, R.; PORTER, J. Practice guidelines: lower extremity revascularization. **Journal of vascular surgery**, v. 18, n. 2, p. 280–94, ago. 1993.

DIEHM, C. et al. [Importance of the ankle-brachial index (ABI) in the prevention of cardiovascular diseases. Ten questions and answers]. **Herz**, v. 32, n. 5, p. 404–9, ago. 2007.

DRAGNEVA, G.; KORPISALO, P.; YLÄ-HERTTUALA, S. Promoting blood vessel growth in ischemic diseases: challenges in translating preclinical potential into clinical success. **Disease models & mechanisms**, v. 6, n. 2, p. 312–22, mar. 2013.

EGGINTON, S. In vivo shear stress response. **Biochemical Society transactions**, v. 39, n. 6, p. 1633–8, dez. 2011.

ESCOFFRE, J.-M. et al. What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues. **Molecular biotechnology**, v. 41, n. 3, p. 286–95, mar. 2009.

FANG, S. et al. Generation of functional blood vessels from a single c-kit⁺ adult vascular endothelial stem cell. **PLoS biology**, v. 10, n. 10, p. e1001407, 2012.

FARRELL, L.-L. et al. A comparison of the effectiveness of cationic polymers poly-L-lysine (PLL) and polyethylenimine (PEI) for non-viral delivery of plasmid DNA to bone marrow stromal cells (BMSC). **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.**, v. 65, n. 3, p. 388–97, mar. 2007.

FAURIE, C. et al. Electro-mediated gene transfer and expression are controlled by the life-time of DNA/membrane complex formation. **The journal of gene medicine**, v. 12, n. 1, p. 117–25, jan. 2010.

GARDLÍK, R. et al. Vectors and delivery systems in gene therapy. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 11, n. 4, p. RA110-21, abr. 2005.

GRANT, D. S. et al. Scatter factor induces blood vessel formation in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 5, p. 1937–41, 1 mar. 1993.

GRIFFIOEN, A. W.; MOLEMA, G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 2, p. 237–68, jun. 2000.

GRIGSBY, C. L.; LEONG, K. W. Balancing protection and release of DNA: tools to address a bottleneck of non-viral gene delivery. **Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society**, v. 7 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S67-82, 6 fev. 2010.

HAYASHI, S. -I. et al. Potential Role of Hepatocyte Growth Factor, a Novel Angiogenic Growth Factor, in Peripheral Arterial Disease : Downregulation of HGF in Response to Hypoxia in Vascular Cells. **Circulation**, v. 100, n. Supplement 2, p. II-301-II-308, 9 nov. 1999.

HEIL, M. et al. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 10, n. 1, p. 45–55, 2006.

HEIL, M.; SCHAPER, W. Insights into Pathways of Arteriogenesis. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 35–42, 2007.

HERSHEY, J. C. et al. Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between capillary sprouting and arteriogenesis. **Cardiovascular research**, v. 49, n. 3, p. 618–25, 16 fev. 2001.

HIRAOKA, K. et al. Enhanced therapeutic angiogenesis by cotransfection of prostacyclin synthase gene or optimization of intramuscular injection of naked plasmid DNA. **Circulation**, v. 108, n. 21, p. 2689–96, 25 nov. 2003.

HO, T. K. et al. Critical Limb Ischemia Classification and Therapeutic Angiogenesis. **International Journal of Angiology**, v. 14, n. 2, p. 49–59, maio 2005.

HUDLICKA, O.; BROWN, M. D. **Adaptation of skeletal muscle microvasculature to increased or decreased blood flow: Role of shear stress, nitric oxide and vascular endothelial growth factor** *Journal of Vascular Research*, 2009.

JONES, D. H. et al. Poly(DL-lactide-co-glycolide)-encapsulated plasmid DNA elicits systemic and mucosal antibody responses to encoded protein after oral administration. **Vaccine**, v. 15, n. 8, p. 814–7, jun. 1997.

KHOO, C. P.; POZZILLI, P.; ALISON, M. R. Endothelial progenitor cells and their potential therapeutic applications. **Regenerative medicine**, v. 3, n. 6, p. 863–76, nov. 2008.

KOBAYASHI, H. et al. Hepatocyte growth factor mediates angiopoietin-induced smooth muscle cell recruitment. **Blood**, v. 108, n. 4, p. 1260–6, 15 ago. 2006.

KOIKE, H. et al. Enhanced angiogenesis and improvement of neuropathy by cotransfection of human hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase gene. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 17, n. 6, p. 779–81, abr. 2003.

LANDMESSER, U. et al. Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. **Circulation**, v. 110, n. 14, p. 1933–1939, 2004.

LAWALL, H.; BRAMLAGE, P.; AMANN, B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. A critical appraisal. **Thrombosis and haemostasis**, v. 103, n. 4, p. 696–709, abr. 2010.

LEWIS, P.; HENSEL, M.; EMERMAN, M. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. **The EMBO journal**, v. 11, n. 8, p. 3053–8, ago. 1992.

LIEKENS, S.; DE CLERCQ, E.; NEYTS, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochemical pharmacology**, v. 61, n. 3, p. 253–70, 1 fev. 2001.

LIMAN, T. G.; ENDRES, M. New vessels after stroke: postischemic neovascularization and regeneration. **Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)**, v. 33, n. 5, p. 492–9, 2012.

LIU, F. et al. Hepatocyte growth factor enhances endothelial cell barrier function and cortical cytoskeletal rearrangement: potential role of glycogen synthase kinase-3beta. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 16, n. 9, p. 950–62, jul. 2002.

MAKINO, H. et al. Long-Term Follow-Up Evaluation of Results From Clinical Trial Using Hepatocyte Growth Factor Gene to Treat Severe Peripheral Arterial Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 10, p. 2503–2509, 1 out. 2012.

MASCARENHAS, J. V et al. Peripheral arterial disease. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 43, n. 1, p. 149–66, mar. 2014.

MATTHEWS, Q. L.; CURIEL, D. T. Gene therapy: human germline genetic modifications--assessing the scientific, socioethical, and religious issues. **Southern medical journal**, v. 100, n. 1, p. 98–100, jan. 2007.

MCCANN, A. B.; JAFF, M. R. Treatment strategies for peripheral artery disease. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 10, n. 10, p. 1571–86, jul. 2009.

MISRA, S. Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution. **The Journal of the Association of Physicians of India**, v. 61, n. 2, p. 127–33, fev. 2013.

MIYAZAWA, K. et al. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 14, p. 10024–8, 15 maio 1993.

MORISHITA, R. et al. Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. **Hypertension**, v. 33, n. 6, p. 1379–84, jun. 1999.

MORISHITA, R. et al. Phase I/IIa Clinical Trial of Therapeutic Angiogenesis Using Hepatocyte Growth Factor Gene Transfer to Treat Critical Limb Ischemia. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 3, p. 713–720, 1 mar. 2011.

MOSES, M. A. The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 15, n. 3, p. 180–9, 1997.

MUKHERJEE, D.; EAGLE, K. The importance of early diagnosis and treatment in peripheral arterial disease: insights from the PARTNERS and REACH registries. **Current vascular pharmacology**, v. 8, n. 3, p. 293–300, maio 2010.

NAKAGAMI, H. et al. Anti-apoptotic action of hepatocyte growth factor through mitogen-activated protein kinase on human aortic endothelial cells. **Journal of hypertension**, v. 18, n. 10, p. 1411–20, out. 2000.

NAKAGAMI, H. et al. Mitogenic and antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor through ERK, STAT3, and AKT in endothelial cells. **Hypertension**, v. 37, n. 2 Pt 2, p. 581–6, fev. 2001.

NAKAMURA, T. Structure and function of hepatocyte growth factor. **Progress in growth factor research**, v. 3, n. 1, p. 67–85, 1991.

NAKAMURA, T.; MIZUNO, S. The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. **Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences**, v. 86, n. 6, p. 588–610, 2010.

NAKAMURA, T.; TERAMOTO, H.; ICHIHARA, A. Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 17, p. 6489–93, set. 1986.

NG, E. W. M.; ADAMIS, A. P. Targeting angiogenesis, the underlying disorder in neovascular age-related macular degeneration. **Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie**, v. 40, n. 3, p. 352–68, jun. 2005.

NISHIKAWA, M.; HUANG, L. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. **Human gene therapy**, v. 12, n. 8, p. 861–70, 20 maio 2001.

NORGREN, L. et al. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease. **International angiology: a journal of the International Union of Angiology**, v. 26, n. 2, p. 81–157, jun. 2007.

PAPETTI, M.; HERMAN, I. M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 282, n. 5, p. C947-70, maio 2002.

PATEL, M. R. et al. Evaluation and treatment of patients with lower extremity peripheral artery disease: consensus definitions from Peripheral Academic Research Consortium (PARC). **Journal of the American College of Cardiology**, v. 65, n. 9, p. 931–41, 10 mar. 2015.

POWELL, R. J. et al. Results of a double-blind, placebo-controlled study to assess the safety of intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid to improve limb perfusion in patients with critical limb ischemia. **Circulation**, v. 118, n. 1, p. 58–65, 1 jul. 2008.

POWELL, R. J. et al. Safety and efficacy of patient specific intramuscular injection of HGF plasmid gene therapy on limb perfusion and wound healing in patients with ischemic lower extremity ulceration: Results of the HGF-0205 trial. **Journal of Vascular Surgery**, v. 52, n. 6, p. 1525–1530, dez. 2010.

PRAZERES, D. M. F. Delivery. In: **Plasmid Biopharmaceuticals**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011. p. 167–210.

PRAZERES, D. M. F.; MONTEIRO, G. A. Plasmid Biopharmaceuticals. **Microbiology spectrum**, v. 2, n. 6, p. 1–16, dez. 2014.

ROMANO, G.; PACILIO, C.; GIORDANO, A. Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 17, n. 4, p. 191–202, 1999.

SCHAPER, W. Collateral circulation: past and present. **Basic research in cardiology**, v. 104, n. 1, p. 5–21, jan. 2009.

SCHAPER, W.; ITO, W. D. Therapeutic targets in cardiovascular disorders. **Current opinion in biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 635–40, dez. 1996.

SCHAPER, W.; SCHOLZ, D. Factors regulating arteriogenesis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 23, n. 7, p. 1143–51, 1 jul. 2003.

SCHLINGEMANN, R. O. et al. Differential expression of markers for endothelial cells, pericytes, and basal lamina in the microvasculature of tumors and granulation tissue. **The American journal of pathology**, v. 138, n. 6, p. 1335–47, jun. 1991.

SCHOLZ, D. et al. Angiogenesis and myogenesis as two facets of inflammatory post-ischemic tissue regeneration. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 246, n. 1–2, p. 57–67, abr. 2003.

SCHOLZ, D.; CAI, W. J.; SCHAPER, W. Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease. **Angiogenesis**, v. 4, n. 4, p. 247–57, 2001.

SCHULTE, K.-L.; KIESELBACH, D.; VON STRANDMANN, R. P. CRT-304 Drug Coated Balloon (DCB) Angioplasty Versus Conventional Angioplasty for the Treatment of the Superficial Femoral Artery and PI-Segment In Pad-Patients - Updated Interim Results Of The Freeride Study. **JACC: Cardiovascular Interventions**, v. 8, n. 2, p. S33, 2015.

SHIGEMATSU, H. et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of hepatocyte growth factor plasmid for critical limb ischemia. **Gene Therapy**, v. 17, n. 9, p. 1152–1161, 15 set. 2010.

SINGH, M. et al. Cationic microparticles: A potent delivery system for DNA vaccines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 2, p. 811–6, 18 jan. 2000.

SINGH, S. et al. The costs of managing lower limb-threatening ischaemia. **European journal of vascular and endovascular surgery: the official journal of the European Society for Vascular Surgery**, v. 12, n. 3, p. 359–62, out. 1996.

SINGLETON, P. A. et al. CD44 regulates hepatocyte growth factor-mediated vascular integrity. Role of c-Met, Tiam1/Rac1, dynamin 2, and cortactin. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 42, p. 30643–57, 19 out. 2007.

STEHOUWER, C. D. A. et al. Peripheral arterial disease: a growing problem for the internist. **European journal of internal medicine**, v. 20, n. 2, p. 132–8, mar. 2009.

STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 9, p. 1237–1241, 1 maio 1999.

SUKMAWATI, D. et al. The role of Notch signaling in diabetic endothelial progenitor cells dysfunction. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 30, n. 1, p. 12–20, 2016.

SUZUKI, J. et al. Current therapies and investigational drugs for peripheral arterial disease. **Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 39, n. 4, p. 183–91, abr. 2016.

TAKAHASHI, T. et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. **Nature medicine**, v. 5, n. 4, p. 434–8, abr. 1999.

TANIYAMA, Y. et al. Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat diabetic hind limb ischemia model: molecular mechanisms of delayed angiogenesis in diabetes. **Circulation**, v. 104, n. 19, p. 2344–50, 6 nov. 2001.

TEMPLETON, N. S. et al. Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. **Nature biotechnology**, v. 15, n. 7, p. 647–52, jul. 1997.

TEPPER, O. M. et al. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment,

proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. **Blood**, v. 105, n. 3, p. 1068–77, 1 fev. 2005.

THIRUVOIPATI, T.; KIELHORN, C. E.; ARMSTRONG, E. J. Peripheral artery disease in patients with diabetes: Epidemiology, mechanisms, and outcomes. **World journal of diabetes**, v. 6, n. 7, p. 961–9, 10 jul. 2015.

TILLING, L.; CHOWIENCZYK, P.; CLAPP, B. Progenitors in motion: mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells. **British journal of clinical pharmacology**, v. 68, n. 4, p. 484–92, out. 2009.

TROIDL, K.; SCHAPER, W. Arteriogenesis versus angiogenesis in peripheral artery disease. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 28 Suppl 1, n. 1, p. 27–9, fev. 2012.

VAN BELLE, E. et al. Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor: the case for paracrine amplification of angiogenesis. **Circulation**, v. 97, n. 4, p. 381–90, 3 fev. 1998.

VAN ROYEN, N. et al. Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. **Cardiovascular research**, v. 49, n. 3, p. 543–53, 16 fev. 2001a.

VAN ROYEN, N. et al. Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. **Cardiovascular research**, v. 49, n. 3, p. 543–53, 16 fev. 2001b.

VAN WEEL, V. et al. Vascular growth in ischemic limbs: a review of mechanisms and possible therapeutic stimulation. **Annals of vascular surgery**, v. 22, n. 4, p. 582–97, 2008.

VILLEMEJANE, J.; MIR, L. M. Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications. **British journal of pharmacology**, v. 157, n. 2, p. 207–19, maio 2009.

VORBURGER, S. A.; HUNT, K. K. Adenoviral gene therapy. **The oncologist**, v. 7, n. 1, p. 46–59, 2002.

WAHLBERG, E. Angiogenesis and arteriogenesis in limb ischemia. **Journal of vascular surgery**, v. 38, n. 1, p. 198–203, jul. 2003.

WALTHER, W.; STEIN, U. Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. **Drugs**, v. 60, n. 2, p. 249–71, ago. 2000.

WEINBERG, J. B. et al. Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 174, n. 6, p. 1477–82, 1 dez. 1991.

WEIS, S. M.; CHERESH, D. A. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. **Nature**, v. 437, n. 7058, p. 497–504, 22 set. 2005.

WHITE, C. Intermittent Claudication. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n.

12, p. 1241–1250, 22 mar. 2007.

WOJAKOWSKI, W. et al. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 110, n. 20, p. 3213–20, 16 nov. 2004.

WOLFF, J. A. et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science (New York, N.Y.)**, v. 247, n. 4949 Pt 1, p. 1465–8, 23 mar. 1990.

WOLFF, J. A.; BUDKER, V. The mechanism of naked DNA uptake and expression. **Advances in genetics**, v. 54, p. 3–20, 2005.

YAMAMOTO, Y. et al. Association between carotid arterial remodeling and plasma concentration of circulating hepatocyte growth factor. **Journal of hypertension**, v. 19, n. 11, p. 1975–9, nov. 2001.