

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**BIANCA PRANDI CAMPAGNARO**

**EFEITO DA HIPERTENSÃO RENOVASCULAR  
2R1C SOBRE AS CÉLULAS TRONCO DA  
MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS**

VITÓRIA  
2008

BIANCA PRANDI CAMPAGNARO

**EFEITO DA HIPERTENSÃO RENOVASCULAR  
2R1C SOBRE AS CÉLULAS TRONCO DA  
MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvana dos Santos Meyrelles

VITÓRIA  
2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca da EMESCAM, ES, Brasil)

---

C186e Campagnaro, Bianca Prandi.  
Efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre as células  
tronco da medula óssea de camundongos / Bianca Prandi  
Campagnaro. – 2008.  
140f. : ilust.

Orientadora: Silvana dos Santos Meyrelles.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito  
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Hipertensão renovascular. 2. Genotoxicidade. 3. Células –  
Tronco. 4. Angiotensina II. I. Meyrelles, Silvana dos Santos. II.  
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da  
Saúde. III. Título.

CDU:61

---

**BIANCA PRANDI CAMPAGNARO**

**EFEITO DA HIPERTENSÃO RENOVASCULAR  
2R1C SOBRE AS CÉLULAS TRONCO DA  
MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 11 de agosto de 2008.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvana dos Santos Meyrelles  
Orientadora

---

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez  
Examinador Interno

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sônia Alves Gouvêa  
Examinador Externo

A meus amados pais, Gilson e Delza, e meu irmão, Rodolfo, que sempre apoiaram minhas decisões, me ensinaram a ter iniciativa, perseverança e trilhar meu caminho com alegria, honestidade, confiança e amor.

Ao meu querido namorado, Dudu, pelo amor, carinho, amizade, companheirismo, cumplicidade e incentivo incondicionais.

Essa conquista também é de vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pela presença constante em minha vida, pelo auxílio nas minhas escolhas e por me confortar nas horas difíceis.

À Clarissa, pela amizade, apoio, compreensão, carinho, bom humor, incentivo, paciência, preocupação em todos os momentos e por me acompanhar e ajudar na realização dos experimentos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvana dos Santos Meyrelles, pela orientação neste trabalho, pelo incentivo em todas as etapas do meu desenvolvimento como pesquisadora, pelos importantes ensinamentos, pelo apoio, confiança, por acreditar em mim e me proporcionar esta experiência enriquecedora: meu reconhecimento, gratidão, admiração e respeito.

Ao Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez, pelo incentivo, confiança, otimismo, dedicação, apoio e sugestões, sempre oportunas, nesta fase tão importante e enriquecedora da minha vida.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues, pela atenção nos momentos em que o procurei e auxílio na aquisição e análise dos dados da citometria de fluxo.

Ao CNPq, pela bolsa concedida e a FAPES/PRONEX, pelo apoio financeiro para execução deste projeto.

Aos professores convidados para compor a banca examinadora, Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Alves Gouvêa, pelas valiosas contribuições para melhoria deste trabalho.

A todo o pessoal do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a execução desse trabalho, seja pela ajuda ou por uma palavra de amizade.

*“Se a motivação é pura e sincera, todo o resto vem por si.”*

*Dalai Lama.*

## RESUMO

Estudos mostram que o número de algumas populações de células de medula óssea se encontra alterado em diferentes doenças cardiovasculares. A angiotensina II, além de um potente vasoconstritor, regula o crescimento e proliferação celular, atua como imunomodulador indutor de respostas inflamatórias e é capaz de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, levando ao estresse oxidativo. Apesar de alguns estudos relatarem que algumas doenças cardiovasculares afetam diferentes populações de células da medula óssea, pouco se sabe a respeito dos efeitos da hipertensão renovascular induzida por clipagem de um dos rins, a qual é angiotensina-II dependente, sobre estas células. Por isso, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da hipertensão renovascular 2R1C sobre o número e a genotoxicidade das células tronco de medula óssea de camundongos *in vivo*. Para isso, camundongos C57 machos (21-24g) foram aleatoriamente separados em dois grupos Sham (n=10) e 2R1C (n=10). A hipertensão foi induzida no grupo 2R1C pela colocação de um clipe de aço ao redor da artéria renal esquerda. O grupo Sham foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a colocação do clipe. Após 14 dias, os animais tiveram sua artéria carótida cateterizadas para medidas da pressão arterial e frequência cardíaca. Em seguida, os animais foram eutanasiados, a medula óssea removida dos fêmures e tíbias e as células mononucleares isoladas, contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular verificada. A identificação e quantificação das duas populações de células tronco da medula óssea foi realizada por imunofenotipagem. Uma alíquota das células mononucleares foi incubada com os anticorpos CD117-FITC e CD90.2-PE (5 $\mu$ l/10<sup>6</sup>células) e com seus controles isotípicos. Em seguida as células tronco hematopoiéticas e mesenquimais foram quantificadas por citometria de fluxo. Para o estudo da genotoxicidade, as células mononucleares (2x10<sup>4</sup> células) foram misturadas com *low melting point agarose* e espalhadas sobre lâminas previamente cobertas com *normal melting point agarose* que foram colocadas em solução de lise. Em seguida, as lâminas foram dispostas na cuba, cobertas com tampão de desenrolamento alcalino e, posteriormente, submetidas à eletroforese, neutralizadas, fixadas e coradas com brometo de etídio para análise em microscópio de fluorescência. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM e variações percentuais em relação ao grupo controle. A análise

estatística foi realizada por meio de teste *t* de Student. Como esperado os animais 2R1C apresentaram níveis maiores de pressão arterial sistólica ( $182 \pm 13$  mmHg) quando comparados com os respectivos controles ( $133 \pm 2$  mmHg). A viabilidade celular (Sham:  $97\% \pm 0.54$  vs. 2R1C:  $96,75\% \pm 0.54$ ) e o número de monócitos (Sham:  $2.81 \pm 0.46$  vs. 2R1C:  $3.32 \pm 0.34$  células/ml  $\times 10^6$ ) não foram diferentes entre os dois grupos. Entretanto, os animais 2R1C apresentaram diminuição do número de células indiferenciadas ( $2.26 \pm 0.13$  células/ml  $\times 10^7$ ) e simultâneo aumento do número de linfócitos ( $1.98 \pm 0.15$  células/ml  $\times 10^6$ ) quando comparados com os animais Sham (Células indiferenciadas:  $2,66 \pm 0,11$  células/ml  $\times 10^7$ ; Linfócitos:  $1.22 \pm 0.25$  células/ml  $\times 10^6$ ). Além disso, o grupo hipertenso ( $0,41 \pm 0,16\%$ ) apresentou diminuição significativa da população células tronco hematopoiética quando comparado com os animais Sham ( $1,75 \pm 0,18\%$ ). O número de células tronco mesenquimais não apresentou diferença entre os grupos (Sham:  $2,36 \pm 0,61\%$  vs. 2R1C:  $1,48 \pm 0,22\%$ ). A análise de genotoxicidade revelou aumento da fragmentação do DNA dos camundongos hipertensos. Nossos resultados sugerem que a hipertensão renovascular 2R1C reduz o número de células tronco ao estimular a divisão assimétrica destas células, levando a sua diferenciação, o que pode ser confirmado pelo aumento do número de células inflamatórias produzidas na medula óssea. Além disso, neste modelo de hipertensão experimental ocorre aumento da produção de espécies reativas de oxigênio que são capazes de interagir com o DNA das células, fragmentando-o.

Palavras-chave: Hipertensão renovascular. 2R1C. Angiotensina II. Célula tronco. Genotoxicidade. Espécies reativas de oxigênio.

## ABSTRACT

Angiotensin II has been recognized for a long time as a powerful vasoconstrictor. In addition, several studies have attributed a variety of other biological activities to this peptide, such as, cellular growth, proinflammatory and immunomodulator effects. Moreover, high angiotensin II levels increase reactive oxygen species production. Although, some reports show that different cardiovascular diseases affect the number of several bone marrow cell populations, the effect of this peptide on these cells and DNA remains unclear. The objective of this study was to evaluate the effects of 2K1C renovascular hypertension on the number and DNA damage of bone marrow stem cells in mice. Experiments were conducted on male C57 mice (averaging 23 g), which were randomly separated in two groups: Sham (n=10) and two-kidney one-clip (2K1C, n=10). The renovascular 2K1C hypertension was induced by placing a stainless clip around the left renal artery. The Sham group was subjected to the same surgical procedure, without clip placement. Animals were studied 14 days later, when a catheter was inserted into the right carotid artery for direct arterial pressure measurements. Then, the animals were euthanized, bone marrow was flushed out of the tibiae and femurs and the mononuclear cells isolated by density-gradient centrifugation. Cells were counted using a Neubauer chamber. The identification and quantification of different bone marrow cell population were determined by immunofluorescence detection using a mixture of antibodies. Mononuclear cells were stained with CD117-FITC and CD90.2-PE ( $5\mu\text{l}/10^6$  cells). The hematopoietic and mesenchymal stem cells were quantified by flow cytometry. The level of DNA damage was determined by the Comet Assay. Cell samples were mixed with low melting point agarose, spread on slides precoated with normal melting point agarose and submerged in lysis solution. Then, comet slides were placed on an electrophoresis chamber filled with unwinding alkali buffer electrophoresed, neutralized, fixed, stained with ethidium bromide and visualized in a fluorescence microscope. Data are expressed as means $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed with Student's *t* test. \* $p < 0.05$ . As expected, blood pressure was higher in 2K1C than in Sham mice (Sham:  $133\pm 1,5$  mmHg vs. 2K1C:  $182\pm 12,5$  mmHg). Renovascular hypertension did not affect cell viability (Sham:  $97\%\pm 0,54$  vs. 2K1C:  $96\%\pm 0,54$ ) and monocyte cell number (Sham:  $2.81\pm 0,46$  vs. 2K1C:  $3.32\pm 0,34$  cells/ml  $\times 10^6$ ).

However, 2K1C mice presented a significant decrease in stem cell number ( $2.26 \pm 0.13$  cells/ml  $\times 10^7$ ) when compared with Sham ( $2.66 \pm 0.11$  cells/ml  $\times 10^7$ ) and a simultaneous increase in lymphocyte number ( $1.98 \pm 0.15$  vs.  $1.22 \pm 0.25$  cells/ml  $\times 10^6$ ), compared with Sham mice. The flow cytometry analysis showed a significant increase in hematopoietic stem cell number in hypertensive mice ( $0.41 \pm 0.16\%$ ) when compared with Sham mice ( $1.75 \pm 0.18\%$ ). The mesenchymal stem cell number did not show difference between the groups (Sham:  $2.36 \pm 0.61\%$  vs. 2K1C:  $1.48 \pm 0.22\%$ ). The comet assay showed that 2K1C mice presented high to severe DNA damage, while Sham mice presented none to moderate DNA damage. Our data suggest that angiotensin II-dependent renovascular hypertension reduce stem cell number by the augmentation of asymmetric cell division rate, which leads to an increase of hematopoietic stem cells differentiation. The elevated differentiation rate could be confirmed by the augment of inflammatory cells number produced in bone marrow. In addition, this model of experimental hypertension leads to DNA damage which could be due to augmented reactive oxygen species produced by angiotensin II high levels, which is known to cause genotoxicity by DNA degradation.

Keywords: Renovascular hypertension. 2K1C. Angiotensin II. Stem cell. Genotoxicity. Reactive oxygen species.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
<b>Figura 1:</b> Cascata enzimática do sistema renina angiotensina.	21
<b>Figura 2:</b> Efeitos hemodinâmicos da angiotensina II.	22
<b>Figura 3:</b> Efeitos não-hemodinâmicos da angiotensina II.	23
<b>Figura 4:</b> Ações da angiotensina II sobre os órgãos-alvo da hipertensão.	24
<b>Figura 5:</b> Modelo de indução de hipertensão renovascular 2R1C.	26
<b>Figura 6:</b> Zigoto e blastocisto humanos.	33
<b>Figura 7:</b> Esquema de divisão simétrica e assimétrica das células tronco.	36
<b>Figura 8:</b> Diferenciação de células tronco hematopoiéticas e mesenquimais.	38
<b>Figura 9:</b> Camundongo da linhagem C57BL/6.	55
<b>Figura 10:</b> Cirurgia para indução da hipertensão renovascular 2R1C.	57
<b>Figura 11:</b> Canulação da artéria carótida direita.	59
<b>Figura 12:</b> Sistema de aquisição de dados para registro da PA (BIOPAC).	60
<b>Figura 13:</b> Pletismógrafo.	61
<b>Figura 14:</b> Isolamento de CMN da medula óssea de camundongos.	63
<b>Figura 15:</b> Contagem celular em câmara de Neubauer.	65

<b>Figura 16:</b> Descongelamento de CMN de medula óssea.	67
<b>Figura 17:</b> Citômetro de fluxo (FACSort) e software <i>Cell Quest</i> .	68
<b>Figura 18:</b> Ensaio do Cometa.	71
<b>Figura 19:</b> Classificação dos níveis de fragmentação no DNA.	72
<b>Figura 20:</b> Valores basais de PAS dos camundongos Sham e 2R1C.	74
<b>Figura 21:</b> Número de células mononucleares indiferenciadas.	76
<b>Figura 22:</b> Número de linfócitos.	77
<b>Figura 23:</b> Número de monócitos.	78
<b>Figura 24:</b> Viabilidade das células mononucleares indiferenciadas.	79
<b>Figura 25:</b> Número de células tronco hematopoiéticas.	80
<b>Figura 26:</b> Número de células tronco mesenquimais.	81
<b>Figura 27:</b> Gráfico típico das populações de células tronco isoladas por citometria de fluxo.	82
<b>Figura 28:</b> Análise de genotoxicidade mostrando os diferentes níveis de fragmentação no DNA das células mononucleares.	83
<b>Tabela 1:</b> Peso corporal, peso seco cardíaco e renal e dosagem plasmática de angiotensina II plasmática 14 dias após a cirurgia.	75
<b>Tabela 2:</b> Níveis de fragmentação no DNA das células mononucleares.	83

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 1R1C: um rim, um clipe
- 2R1C: dois rins, um clipe
- AcSDKP: acetil-N-Ser-Asp-Lys-Pro
- ADH: hormônio antidiurético
- ANP: peptídeo natriurético atrial (*Atrial natriuretic peptide*)
- ApoE-KO: camundongo *knockout* para apolipoproteína E
- AT<sub>1</sub>: receptor de angiotensina II tipo 1
- AT<sub>2</sub>: receptor de angiotensina II tipo 2
- BD: Becton, Dickinson and Company
- bpm: batimentos por minuto
- C57BL/6: linhagem de camundongo C57 black/6
- CD: cluster de diferenciação
- CMN: célula mononuclear
- CTH: célula tronco hematopoiética
- CTM: célula tronco mesenquimal
- DMEM: meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)
- DMSO: dimetil sulfóxido
- DNA: ácido desoxirribonucléico
- DOCA-sal: acetato de desoxicorticosterona (*desoxicorticosterone-acetate*)
- ECA: enzima conversora de angiotensina
- ECA-KO: camundongo *knockout* para enzima conversora de angiotensina
- EDTA: ácido etilenodiamino tetra acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)
- EPM: erro padrão da média
- *et al.*: *et alli* – e colaboradores
- EUA : Estados Unidos da América
- FACS: separador celular ativado por fluorescência (*fluorescence activated cell sorter*)
- FC: frequência cardíaca
- FITC: isotiocianato de fluoresceína
- g: grama

- G-CSF: fator estimulante de colônias de granulócitos (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*)
- GM-CSF: Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*)
- HPLC: cromatografia líquida de alta performance (*High Performance Liquid Chromatography*)
- IgG: imunoglobulina G
- mA: miliampère ( $10^{-3}$ )
- MACS: separação celular magneticamente ativada (*Magnetic activated cell sorter*)
- mg: miligrama ( $10^{-3}$ )
- mm: milímetro ( $10^{-3}$ )
- mm Hg: milímetros de mercúrio
- ml: mililitro ( $10^{-3}$ )
- µg: micrograma ( $10^{-6}$ )
- µl: microlitro ( $10^{-6}$ )
- µm: micrometro ( $10^{-6}$ )
- NAD(P)H: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
- NK: linfócitos *natural killer*
- nm: nanômetro ( $10^{-9}$ )
- p: significância estatística
- PA: pressão arterial
- PAS: pressão arterial sistólica
- PBS: solução salina de fosfato tamponada (*Phosphate Buffered Saline*)
- PE: ficoeritrina
- pmol: picomol ( $10^{-12}$ )
- rpm: rotações por minuto
- RNA: ácido ribonucléico
- SFB: soro fetal bovino
- ROS: espécies reativas de oxigênio
- SRA: sistema renina angiotensina
- TRIS: tris(hidroximetil)aminometano
- UFES: Universidade Federal do Espírito Santo
- UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo

## **PREMIAÇÕES DESTE TRABALHO**

Prêmio de Qualidade Científica Eduardo Moacyr Krieger

Apresentação Oral:

CAMPAGNARO, B. P. ; TONINI, C. L. ; VASQUEZ, E. C. ; MEYRELLES S. S.  
Efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre as células de medula óssea de camundongos. In: XV Congresso da Sociedade Brasileira de Hipertensão, 2007, Recife, PE.

Prêmio Jovem Investigador: Menção Honrosa

Apresentação Oral:

CAMPAGNARO, B. P. ; TONINI, C. L. ; VASQUEZ, E. C. ; MEYRELLES S. S.  
Efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre o número e a genotoxicidade das células tronco de medula óssea de camundongos. In: Congresso de Ciências da Saúde, 2007, Vitória, ES.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1	HIPERTENSÃO.....	19
1.2	A MEDULA ÓSSEA.....	28
1.3	A HEMATOPOIESE.....	28
1.4	CÉLULAS TRONCO.....	32
1.4.1	<b>Células tronco de medula ósea</b> .....	38
1.4.1.1	Células tronco mesenquimais.....	40
1.4.1.2	Células tronco hematopoiéticas.....	42
1.5	ESTRESSE OXIDATIVO.....	45
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	51
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	53
3.1	OBJETIVO GERAL.....	53
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	55
4.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	55
4.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	56

4.3	INDUÇÃO DA HIPERTENSÃO RENOVASCULAR 2R1C.....	56
4.4	MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL.....	58
4.4.1	<b>Canulação da artéria carótida.....</b>	58
4.4.2	<b>Medida direta da pressão arterial.....</b>	59
4.4.3	<b>Medida indireta da pressão arterial.....</b>	60
4.5	MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS DO CORAÇÃO E RINS.....	61
4.6	DOSAGEM PLASMÁTICA DE ANGIOTENSINA II.....	61
4.7	ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA .....	62
4.8	CONTAGEM DE CÉLULAS MONONUCLEARES EM CÂMARA DE NEUBAUER.....	64
4.9	ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR.....	66
4.10	CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES.....	66
4.10.1	<b>Congelamento.....</b>	66
4.10.2	<b>Descongelação.....</b>	67
4.11	ANÁLISE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	67
4.11.1	<b>Identificação das linhagens de células tronco hematopoiética e mesenquimal.....</b>	68
4.12	ENSAIO DO COMETA.....	69
4.12.1	<b>Preparo das lâminas.....</b>	69
4.12.2	<b>Lise, desenrolamento e eletroforese.....</b>	70
4.12.3	<b>Análise citológica.....</b>	70
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	72
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>74</b>

5.1	MEDIDAS HEMODINÂMICAS.....	74
5.2	PESO CORPORAL E PESO SECO CARDÍACO E RENAL.....	75
5.3	AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES EM CÂMARA DE NEUBAUER.....	76
5.3.1	<b>Quantificação de células indiferenciadas da medula óssea.....</b>	<b>76</b>
5.3.2	<b>Quantificação de células inflamatórias da medula óssea.....</b>	<b>77</b>
5.3.3	<b>Análise da viabilidade celular.....</b>	<b>78</b>
5.4	ANÁLISE DAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS TRONCO DA MEDULA ÓSSEA POR IMUNOFENOTIPAGEM.....	79
5.4.1	<b>Quantificação de células tronco hematopoiéticas.....</b>	<b>79</b>
5.4.2	<b>Quantificação de células tronco mesenquimais.....</b>	<b>80</b>
5.5	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE FRAGMENTAÇÃO NO DNA PELO ENSAIO DO COMETA.....	82
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>103</b>



# INTRODUÇÃO

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 HIPERTENSÃO

As doenças cardiovasculares representam, universalmente, um grave problema de saúde pública. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 30% das mortes registradas no ano de 2006 no mundo resultaram das várias formas dessa doença (OMS, 2007). No Brasil, não é diferente. Segundo dados divulgados pelo Ministério da Saúde, no ano de 2005, as doenças cardiovasculares representaram a primeira causa de óbito, sendo responsável por 32% dos registros de morte deste ano (DATASUS, 2005) e a terceira de permanência hospitalar prolongada, tendo sido responsáveis pela principal alocação de recursos públicos em hospitalizações, demandando aproximadamente 821 milhões de dólares (DATASUS, 2005). No Espírito Santo, segundo estimativas da Secretária Estadual de Saúde, 40% da população da Grande Vitória apresenta hipertensão arterial que é um dos principais fatores de risco para outras doenças cardiovasculares (SESA, 2005).

Segundo as IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2002), a hipertensão é definida e caracterizada pela elevação da pressão arterial para números acima dos valores considerados normais (Pressão Sistólica  $\geq$  140 mmHg; Pressão Diastólica  $\geq$  90mmHg). Apesar de uma doença comum e rapidamente detectável, geralmente não apresenta sintomas clínicos aparentes podendo levar a complicações fatais se não for tratada, uma vez que se encontra entre os fatores de risco mais comuns para aterosclerose, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, hipertrofia ventricular esquerda e insuficiência renal (Collins *et al.*, 1990; MacMahon *et al.*, 1990; Perry *et al.*, 1995; American Heart Association, 2001). Além disso, dentre as doenças cardiovasculares a hipertensão arterial é considerada a comum e também um dos principais problemas dos serviços públicos de saúde, atingindo 20 – 25% da população dos países industrializados (WHO-ISH Guidelines Subcommittee, 1999) e mais da metade da população com idade acima de 65 anos (Ruoff, 1998).

A hipertensão é uma doença multifatorial causada pela interação de diversos fatores que envolvem a função cardíaca, o volume sanguíneo, a regulação de sal, o tônus

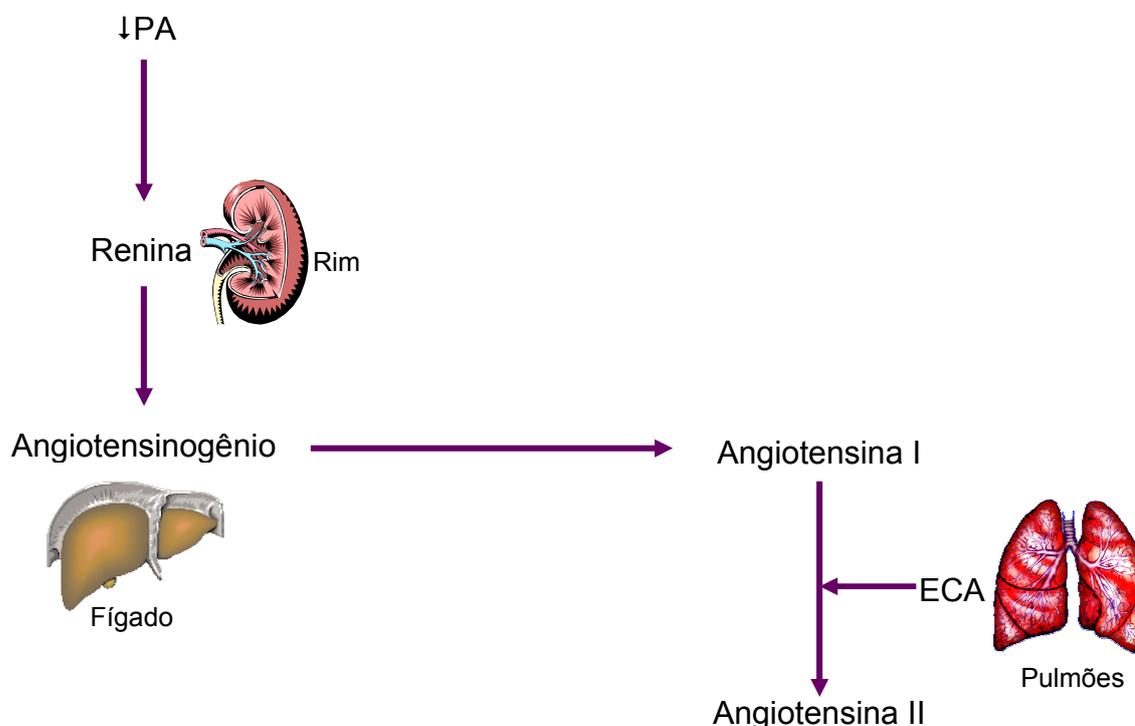
vascular periférico e a função endotelial (Guyton *et al.*, 1981). Além disso, estudos epidemiológicos indicam que de 30 a 60% da variação fenotípica da pressão arterial é atribuída a fatores genéticos (Mongeau, 1989). Portanto, esta doença é consequência de uma combinação infeliz de fatores genéticos, culturais e ambientais que levam ao desbalanço entre os mecanismos vasoconstritores e vasodilatadores (Smithies *et al.*, 2000). Cientistas e médicos acreditam que tratando a hipertensão e prevenindo outros fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, tanto a mortalidade quanto a morbidez causadas por essas enfermidades podem ser reduzidas (Smithies *et al.*, 2000). Devido a sua alta incidência e morbidade, várias classes de drogas e dietas tem sido aplicadas no controle da hipertensão (Badyal *et al.*, 2003).

Apesar dos esforços para desvendar os mecanismos envolvidos na patogênese da hipertensão, sua causa permanece desconhecida em aproximadamente 95% dos pacientes caracterizando a chamada hipertensão primária ou essencial, em contraste àquelas formas de hipertensão que são secundárias a causas conhecidas, como estenose da artéria renal, e que acometem 5% dos pacientes sendo conhecidas como hipertensão secundária (Guyton & Hall, 2006).

Hipertensão renovascular é uma forma de hipertensão secundária definida como o aumento da pressão arterial causado por uma lesão estenótica ou obstrutiva na artéria renal, e acomete entre 2% e 5% da população hipertensa (Working Group on Renovascular Hypertension, 1989). Apesar das formas de hipertensão secundária serem menos comuns que a hipertensão essencial, o fato de se saber a causa do aumento de pressão já representa uma vantagem para o tratamento do paciente.

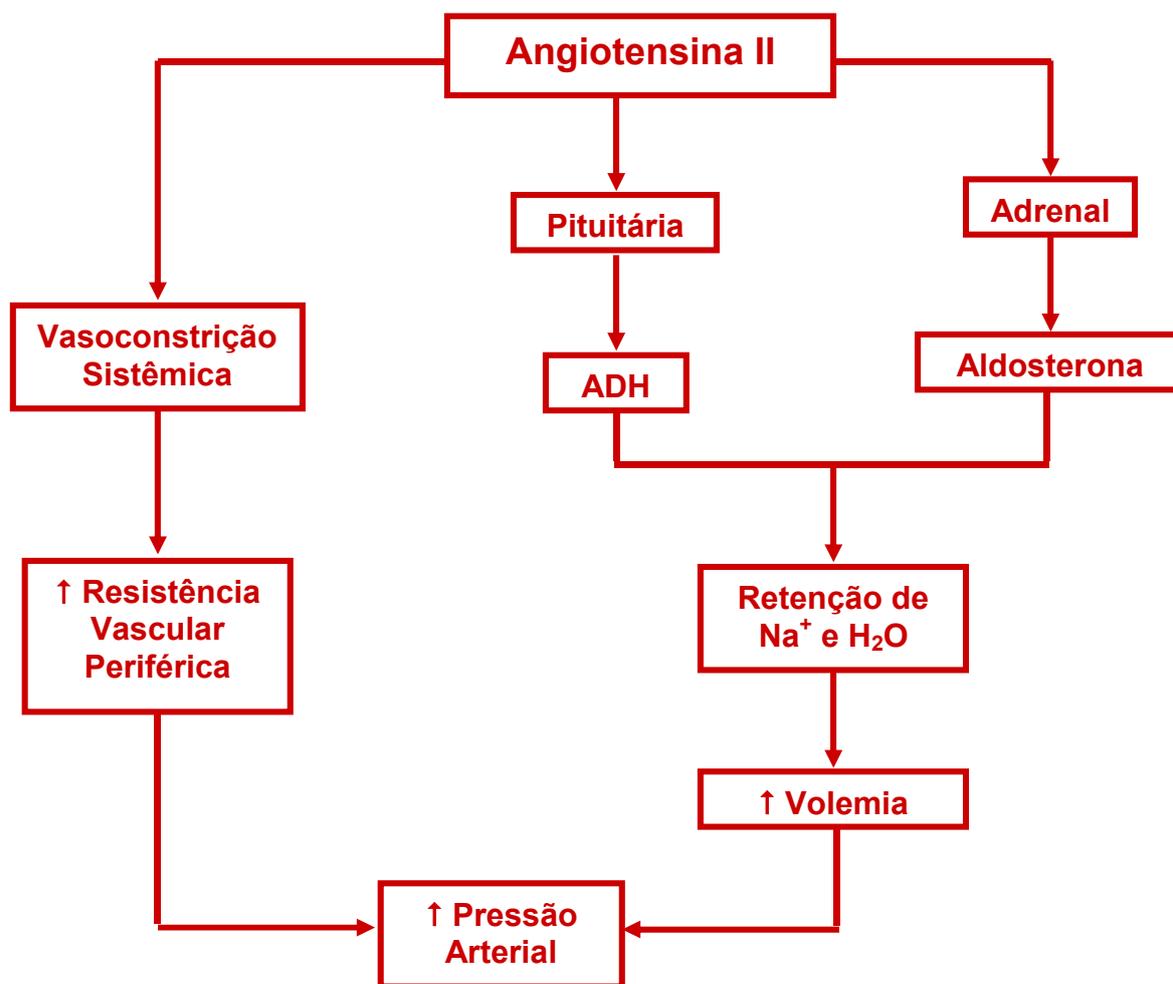
A descoberta da hipertensão renovascular ocorreu com o trabalho pioneiro de Goldblatt e colaboradores (1934), que estudaram os efeitos do clampeamento da artéria renal em cães. Este modelo patológico, conhecido como modelo de hipertensão 2-rins 1-clipe (2R1C), serviu como base para estudos subseqüentes e demonstrou que uma lesão obstrutiva na artéria renal deve alcançar um nível crítico de 75% a 80% para produzir mudanças hemodinâmicas significantes na medida do fluxo arterial através da lesão (May *et al.*, 1963). Sabe-se que quando o fluxo sanguíneo renal diminui, renina é liberada pelas células juxtaglomerulares que são

células de músculo liso modificadas que funcionam como mecanorreceptores e são encontradas na parede das arteríolas aferentes do aparato juxtaglomerular dos rins. A renina é uma enzima e não uma substância vasoativa que atua enzimaticamente sobre o angiotensinogênio plasmático, sintetizado no fígado, catalisando sua conversão em um peptídeo de 10 aminoácidos, a angiotensina I, que possui pequena atividade vasoconstritora, insuficiente para causar mudanças significantes na função circulatória. Em seguida, dois aminoácidos são removidos da angiotensina I formando o octapeptídeo angiotensina II, potente vasoconstritor e efetor chave do sistema renina angiotensina (SRA). Esta conversão ocorre quase que inteiramente nos pulmões durante a passagem do sangue através dos pequenos vasos pulmonares e é catalisada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) que se encontra primariamente ligada ao endotélio e em concentrações particularmente elevadas nas células endoteliais da vasculatura pulmonar (Figura 1). Portanto, na hipertensão renovascular, a redução do fluxo sanguíneo para o rim devido à estenose da artéria renal originada por doenças vasculares obstrutivas, como aterosclerose e displasia fibromuscular, induz a ativação excessiva do SRA, levando à hipertensão (Guyton & Hall, 2006).



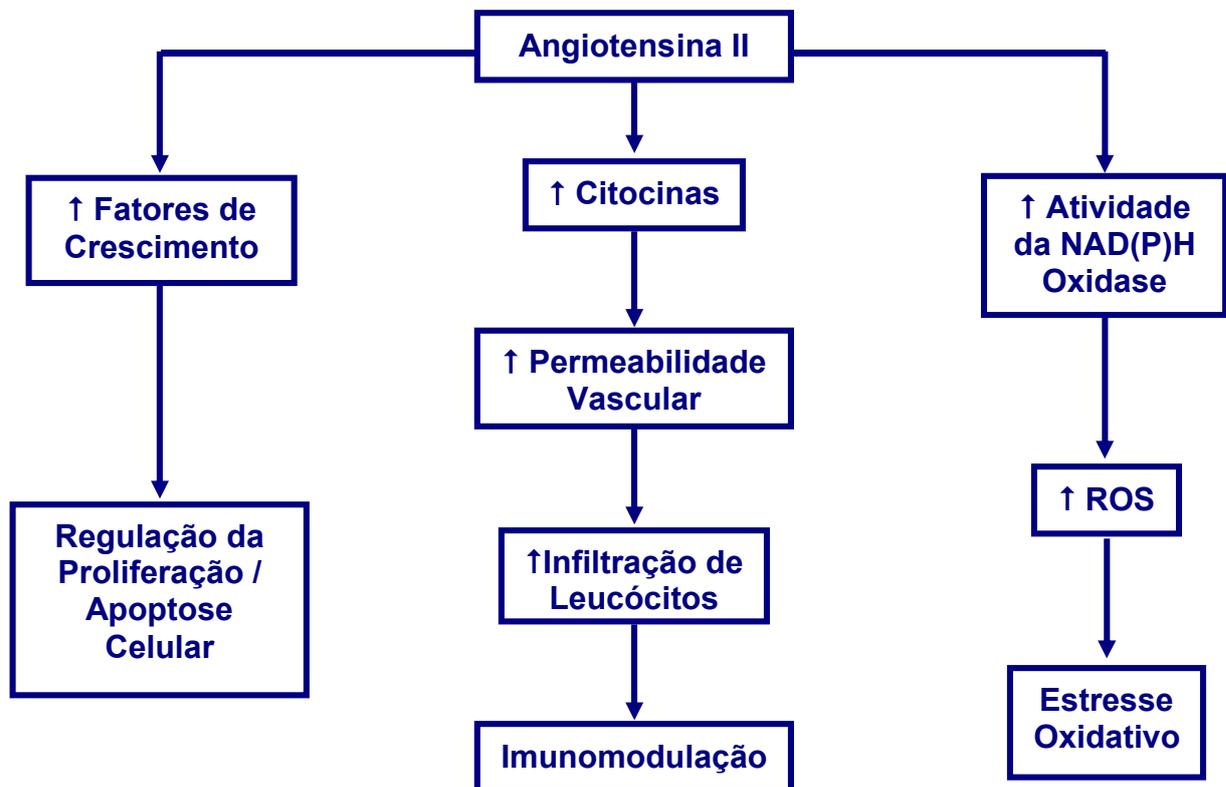
**Figura 1:** Cascata enzimática do sistema renina angiotensina. ECA: enzima conversora de angiotensina, PA: pressão arterial.

O mecanismo pelo qual o SRA induz a hipertensão tem sido geralmente atribuído ao efeito vasoconstritor direto da angiotensina II e aos efeitos mineralocorticóides da aldosterona. A angiotensina II é um vasoconstritor extremamente poderoso que apresenta dois efeitos principais que podem elevar a pressão arterial. O primeiro é a vasoconstrição em várias regiões do corpo, com maior intensidade nas arteríolas e menor intensidade nas veias, ao aumentar a liberação de noradrenalina pelas terminações nervosas simpáticas encontradas nos vasos e também a secreção do vasoconstritor endotelina I. A constrição das arteríolas aumenta a resistência periférica total, levando ao aumento da pressão arterial. A segunda forma pela qual a angiotensina II eleva a pressão arterial é ao diminuir a excreção de sal e água pelos rins, o que aumenta o volume do fluido extracelular e, conseqüentemente a volemia, ao estimular a secreção de aldosterona pelo córtex adrenal e de hormônio antidiurético (ADH) pela glândula pituitária (Figura 2) (Guyton & Hall, 2006).

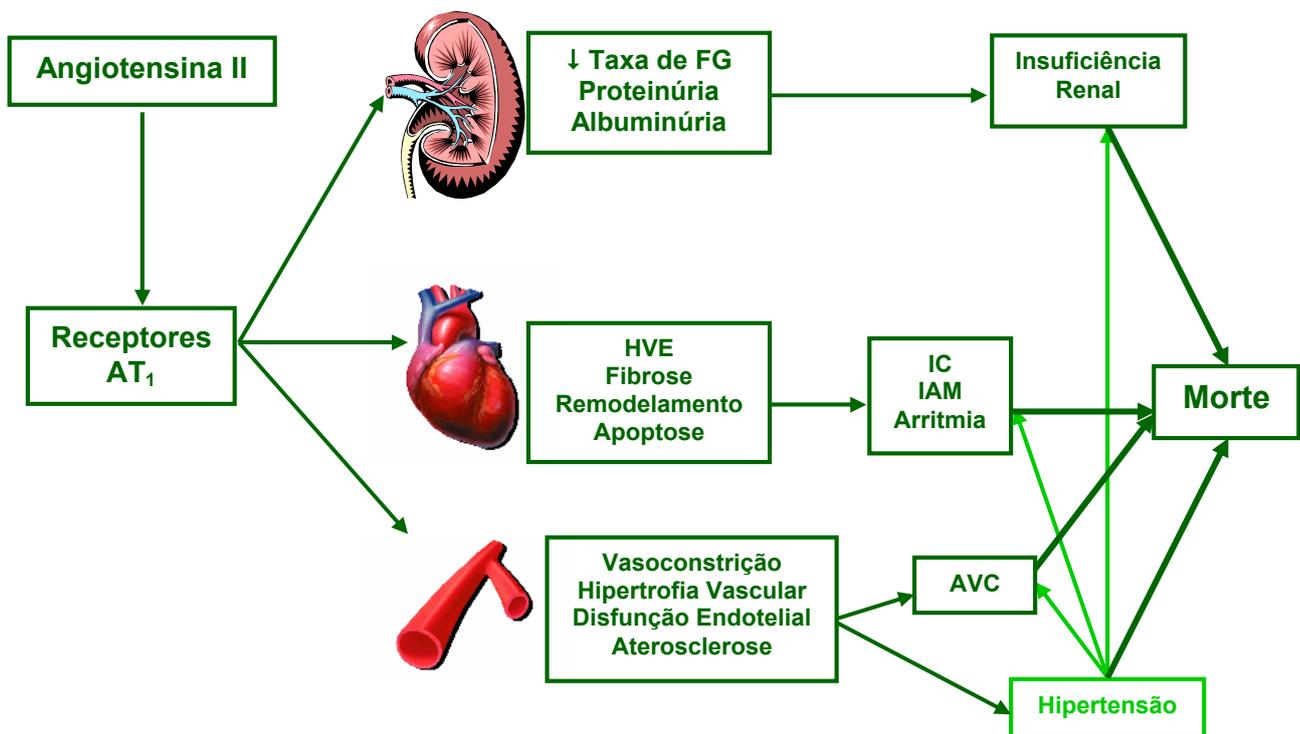


**Figura 2:** Efeitos hemodinâmicos da angiotensina II. ADH: hormônio antidiurético.

É importante lembrar que a angiotensina II não é apenas um hormônio vasoativo que regula a pressão arterial e a homeostase eletrolítica através de seus efeitos hemodinâmicos, mas também atua como um fator de crescimento influenciando a proliferação/apoptose das células musculares lisas, aumenta o estresse oxidativo levando a disfunção endotelial e atua como um imunomodulador participando de respostas inflamatórias de forma não-hemodinâmica (Figura 3) (Wolf, 1998; Luft, 2001; Ruiz-Ortega *et al.*, 2001; Higashi *et al.*, 2002). Surgem cada vez mais evidências de que os efeitos não-hemodinâmicos da angiotensina II são indispensáveis para os danos causados pela hipertensão aos órgãos-alvo (Figura 4) (Wolf, 1998; Luft, 2001; Ruiz-Ortega *et al.*, 2001).



**Figura 3:** Efeitos não-hemodinâmicos da angiotensina II. ROS: espécies reativas de oxigênio.



**Figura 4:** Ações da angiotensina II sobre os órgãos-alvo da hipertensão. AVC: acidente vascular cerebral; FG: filtração glomerular; HVE: hipertrofia ventricular esquerda; IAM: infarto agudo do miocárdio; IC: insuficiência cardíaca.

A angiotensina II exerce seus efeitos ao se ligar a receptores específicos, acoplados à proteína G, na superfície celular (Hayashida *et al.*, 1996). Os receptores de angiotensina II no sistema cardiovascular são divididos em dois tipos principais: receptores de angiotensina II tipo 1 (AT<sub>1</sub>) e tipo 2 (AT<sub>2</sub>) (de Gasparo *et al.*, 2000). Em roedores, os receptores AT<sub>1</sub> são subdivididos em AT<sub>1A</sub> e AT<sub>1B</sub> que têm 95% de homologia em suas seqüências de aminoácidos (Kakar *et al.*, 1992). Foi demonstrado que o subtipo AT<sub>1A</sub> é predominante na maioria dos tecidos, com exceção do córtex da adrenal, glândula pituitária e glomérulo, onde os receptores AT<sub>1B</sub> são altamente expressos (Bouby *et al.*, 1997; Burson *et al.*, 1994). As ações celular e molecular da angiotensina II nos tecidos cardiovascular e renal são quase que exclusivamente mediadas por receptores AT<sub>1</sub>, que são responsáveis pelos efeitos vasoconstritores da angiotensina II (Kim & Iwao, 2000). Os receptores AT<sub>2</sub>

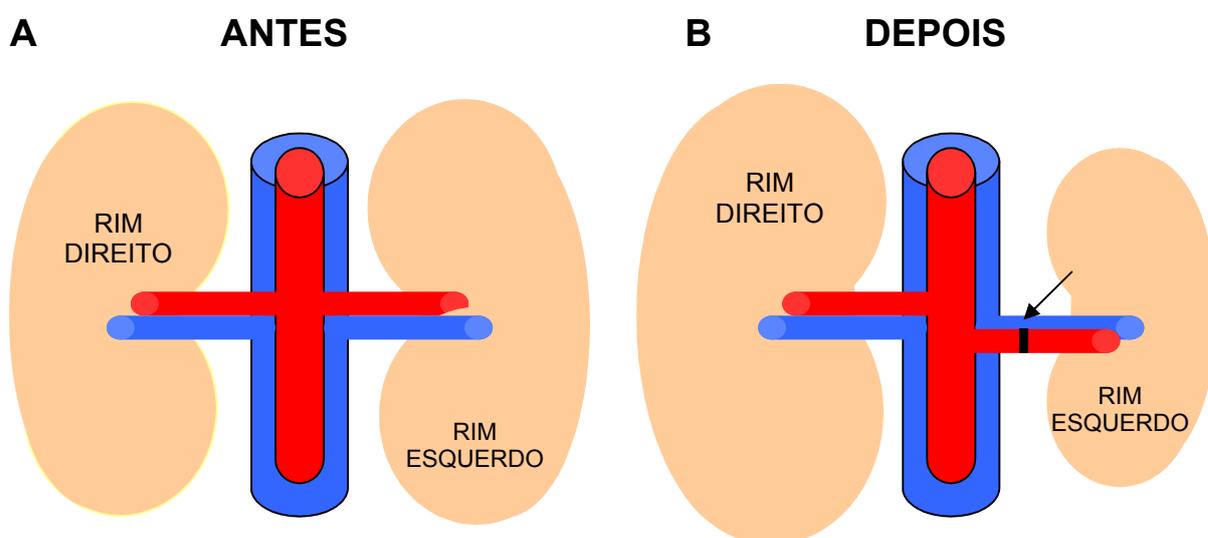
tem apenas 34% de homologia com o receptor AT<sub>1</sub> e é expresso em nível mais baixo, particularmente na vasculatura renal (Douglas & Hopfer, 1994).

Nas últimas décadas, o papel do SRA na patogênese da hipertensão renovascular tem sido extensivamente estudado e descrito por ser considerado um importante mediador da hipertensão e dos danos cardíaco e renal causados pela mesma. Originalmente, o SRA foi definido como um sistema circulante de hormônio. Entretanto, estudos têm demonstrado que o SRA existe localmente em vários tecidos inclusive medula óssea (Haznedaroglu *et al.*, 1996) cérebro, rim, córtex adrenal, coração e parede dos vasos sanguíneos e desempenha papel fundamental na patogênese da hipertensão (Bader *et al.*, 2001), explicando os efeitos terapêuticos de inibidores de ECA e de antagonistas de receptor AT<sub>1</sub> quando os níveis plasmáticos de angiotensina II não estão elevados (McInnes, 2001). O SRA tecidual é ativado em situações patofisiológicas, e a síntese local de angiotensina II parece contribuir para alterações funcionais e morfológicas nestes tecidos (Hirsch *et al.*, 1990).

Evidências epidemiológicas mostram que pacientes com hipertensão em cujo SRA está ativado apresentam maior risco de sofrer infarto do miocárdio que pacientes que apresentam outros tipos de hipertensão (Alderman *et al.*, 1991; Meade *et al.*, 1993; Alderman, 1995; Laragh, 1995). Além disso, o tratamento de pacientes hipertensos com inibidores da ECA e com antagonistas de receptor AT<sub>1</sub>, reduz a mortalidade e também a incidência de infarto do miocárdio (Yusuf *et al.*, 1992; Pitt, 1994; Timmermans & Smith, 1996; Gavras, 1997), indicando o papel central do SRA na patogênese da hipertensão e suas complicações.

O modelo de hipertensão dois-rins um-clipe (2R1C) de Goldblatt é um modelo experimental que em muitos aspectos se assemelha a hipertensão renovascular humana. Este tipo de hipertensão pode ser induzido em cães, macacos, coelhos, ratos e ultimamente também em camundongos. Experimentalmente, na hipertensão 2R1C, apenas uma artéria renal é submetida à estenose que é induzida pela colocação de um clipe ao redor da artéria para obstruir parcialmente o fluxo sanguíneo renal (Figura 5). Neste modelo a hipertensão se deva ao aumento da produção de renina pelo rim isquêmico (Bruner *et al.*, 1971) o que leva a uma

elevação sustentada da pressão arterial devido ao aumento da atividade da renina plasmática que, por sua vez, aumenta a angiotensina II circulante (Carretero & Gulati, 1978; Martinez-Maldonado, 1991). Apesar disto, no rim contra-lateral tanto o fluxo sanguíneo renal quanto a taxa de filtração glomerular (por grama de rim) são similares ao dos controles normotensos (Himmelstein & Klotman, 1989; Martinez-Maldonado, 1991) e a produção de renina neste rim é inibida (Textor *et al.*, 1983). No estágio inicial não ocorre retenção de sal e de água porque o rim remanescente hipertrofia-se e continua funcionando normalmente, portanto a hipertensão renovascular se deve ao efeito pressor direto da angiotensina II e por isso é dita angiotensina-dependente. Os valores pressóricos alcançados no modelo 2R1C, assim como o tempo de manutenção da hipertensão dependem da espécie usada para implantação do modelo e do grau de estenose da artéria renal (Fazan *et al.*, 2001). A pressão arterial e a atividade da renina voltam ao normal ao retirar o clipe ou remover o rim afetado (Guyton & Hall, 2006). O papel central dos receptores AT<sub>1</sub> no desenvolvimento e na manutenção da hipertensão 2R1C foi confirmado (Cervenka *et al.*, 2002; Galli *et al.*, 2001) enquanto que o papel dos receptores AT<sub>2</sub> continua pouco compreendido. Estudos recentes têm demonstrado que o bloqueio agudo ou crônico dos receptores AT<sub>2</sub> não piora o curso da hipertensão 2R1C em camundongos, sugerindo que estes receptores não se contrapõem de forma importante aos efeitos vasoconstritores da angiotensina II na hipertensão 2R1C (Cervenka *et al.*, 2002; Cervenka *et al.*, 2003).



**Figura 5:** Modelo de indução de hipertensão renovascular 2R1C. Antes da colocação do clipe, os rins direito e esquerdo possuem aproximadamente mesmo tamanho (A), entretanto,

após a cirurgia o rim clipado hipotrofia enquanto que o contra-lateral hipertrofia (B). A seta mostra o local onde o clipe foi colocado. Em vermelho artérias e em azul veias.

O papel predominante do SRA parece ser transitório durante o desenvolvimento e manutenção da hipertensão renovascular visto que poucas semanas após a indução da mesma, modelos experimentais perdem a dependência absoluta de angiotensina II e ativam vias oxidativas (Lerman *et al.*, 2001). Acredita-se que exista correlação direta entre alguns marcadores de estresse oxidativo e a elevação da pressão arterial, uma vez que é possível reverter o aumento de pressão em alguns modelos tanto com o uso de inibidores da ECA que bloqueiam a produção de angiotensina II, como com o uso de análogos da superóxido dismutase, como tempol (Welch *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2004), que funcionam como depuradores de radicais livres de oxigênio. Assim, a ativação do SRA parece ser capaz de recrutar sistemas adicionais que sustentam a elevação do tono vasoconstritor e da pressão arterial.

Para entender a patogênese e estudar o tratamento e a prevenção de uma doença, é bastante útil o desenvolvimento de modelos animais. No passado, a maioria dos estudos em hipertensão experimental era realizada em cães, porém atualmente esses estudos são desenvolvidos preferencialmente em murinos. Um modelo animal ideal de hipertensão deve ser de fácil execução e uniformemente reproduzido em animais pequenos, além de ser comparável a alguma forma de hipertensão humana (Badyal *et al.*, 2003). O modelo 2R1C foi adaptado a camundongos em 1997 por Wiesel e colaboradores que verificaram que em animais com aproximadamente 20g, a implantação de um clipe de aço ao redor da artéria renal esquerda era capaz de induzir hipertensão quando a abertura do clipe utilizado era de 0,12 mm. Por outro lado, clips com 0,11 e 0,13 mm de abertura levavam ao infarto renal e não induziam à hipertensão, respectivamente. Desta forma, os pesquisadores verificaram que o clipe ideal para induzir hipertensão renovascular em camundongos deve ter 0,12 mm de abertura, pois é capaz de reduzir consideravelmente o fluxo sanguíneo renal. Com base nos dados observados no trabalho de Wiesel e colaboradores (1997), em nosso laboratório o modelo 2R1C vem sendo estudado com sucesso em camundongos das linhagens C57BL/6 (Peotta *et al.*, 2007; Gava *et al.*, 2008) e ApoE-KO (Arruda *et al.*, 2005; Nogueira *et al.*, 2008) 14 e 28 dias após a implantação do clipe com 0,12 mm de abertura ao redor da artéria renal esquerda.

## 1.2 A MEDULA ÓSSEA

A medula óssea é um tecido mesodérmico que ocupa as cavidades do osso esponjoso e o canal medular da diáfise dos ossos longos (Ciesla, 2007) e contém as células tronco hematopoiéticas (CTH) e as células tronco mesenquimais (CTM). No adulto, a medula óssea é bastante heterogênea, pois contém uma grande diversidade de células e apresenta estrutura anatômica especial que permite a sobrevivência, proliferação, diferenciação e maturação das células hematopoiéticas multipotentes e suas descendentes, sendo o principal órgão responsável pela produção de células sanguíneas.

Além dos precursores hematopoiéticos, a medula óssea também é constituída pelo estroma medular composto por células endoteliais, adipócitos, fibroblastos, nervos e o sistema vascular da medula, que juntos formam o micro-ambiente hematopoiético (Parent-Massim *et al.*, 2001). As células estromais além de fornecerem sustentação e promoverem a sobrevivência das células tronco, atuam de forma direta, pelo contato entre as células estromais e as hematopoiéticas, ou indireta, pela liberação de fatores de crescimento e citocinas, na regulação da maturação e diferenciação dos precursores hematopoiéticos. A integridade destes dois sistemas, bem como a associação entre eles, são fatores cruciais que garantem a hematopoiese *in vivo* (Müller-Sieburg & Deryugina, 1995; Whetton & Graham, 1999). Portanto, o micro-ambiente medular apresenta moduladores distintos que atuam sinergicamente para influenciar a sobrevivência, proliferação e o desenvolvimento das células hematopoiéticas em todos os seus níveis de diferenciação.

## 1.3 A HEMATOPOIESE

O sistema hematopoiético é extensivamente estudado porque representa um protótipo de um sistema biológico de auto-renovação no qual um grande número de células sanguíneas é diariamente produzido para compensar a perda contínua de células relativamente maduras num processo complexo que envolve proliferação,

diferenciação, morfogênese, maturação funcional e morte celular (Kirschstein & Skirboll, 2001).

A hematopoiese é o processo de formação, desenvolvimento e maturação dos elementos figurados do sangue a partir de um precursor comum e indiferenciado, a chamada célula tronco hematopoiética. Em murinos e humanos a hematopoiese inicia-se precocemente no período embrionário no saco vitelino onde são formados apenas eritrócitos e, por isso, sendo conhecida como hematopoiese primitiva (Palis & Yoder, 2001). Poucos dias depois, a hematopoiese passa para a região aórtica-gonadal-mesonéfrica, sendo chamada hematopoiese definitiva, uma vez que são formados todos os tipos de células sanguíneas (Whetton & Graham, 1999; Tamura *et al.*, 2002; Zago & Covas, 2006). Com o desenvolvimento do embrião, as células sanguíneas se fixam em locais do embrião, e depois do feto, onde existe grande vascularização. Nos camundongos, ocorre a transição da hematopoiese do fígado para o baço durante a vida fetal, e então para a medula óssea perto do nascimento (Medvinsky & Dzierzak, 1998). Nos humanos, a mudança da hematopoiese do fígado para medula óssea começa no segundo trimestre de gestação e o baço não é um local onde ocorre hematopoiese significativa (Charbord *et al.*, 1996).

Nos organismos adultos, o sistema hematopoiético é composto por uma série progressiva de células tronco multipotentes e células progenitoras que originam tipos sanguíneos maduros funcionalmente distintos. Em mamíferos adultos, a medula óssea é o órgão primariamente responsável pela hematopoiese que também pode ocorrer em outros órgãos uma vez que populações de células tronco hematopoiéticas podem ser encontradas no baço e timo, o que sugere um movimento dinâmico, partindo da medula óssea para outros locais do organismo (Whetton & Graham, 1999).

As células hematopoiéticas possuem características específicas e únicas que as diferenciam de outros tipos celulares. Estas características são, principalmente, tempo de vida limitado e relativamente curto, ampla distribuição no organismo sendo encontradas em virtualmente todos os tecidos e propriedades funcionais e fenotípicas completamente diferentes entre si. Como as células sanguíneas maduras são continuamente perdidas estima-se que a medula óssea de um indivíduo adulto

produza entre  $10^{11}$  e  $10^{12}$  células sanguíneas maduras por dia, sendo cerca de  $1,75 \times 10^{11}$  eritrócitos e  $7 \times 10^{10}$  leucócitos (Burmester & Pezzutto, 2003), pois para a reposição celular normal, o sistema hematopoiético deve ser capaz de responder rapidamente à injúria de trauma.

O sistema hematopoiético pode ser subdividido em uma hierarquia com três compartimentos distintos (Till *et al.*, 1964; Kirschstein & Skirboll, 2001). Neste modelo, as células maduras são morfológicamente identificadas como pertencendo a uma linhagem particular e têm um potencial proliferativo bastante limitado. As células neste compartimento mais maduro derivam de células progenitoras comprometidas com um grande potencial proliferativo, mas ainda assim finito. As células progenitoras por sua vez são produzidas por uma população de células tronco hematopoiéticas com capacidade de auto-renovação e multipotencialidade, ou seja, são capazes de originar mais células indiferenciadas e com grande potencial de desenvolvimento (Zago & Covas, 2006). Portanto, através desta hierarquia, os intermediários celulares passam por uma proliferação extensiva para gerar um número suficiente de células diferenciadas necessárias para manutenção do *steady-state* do sistema hematopoiético e raras células tronco hematopoiéticas fazem parte da fundação desta hierarquia de diferenciação celular e são mantidas em números constantes na medula óssea adulta em um estado relativamente quiescente em indivíduos saudáveis.

As células maduras e diferenciadas do sangue originam-se todas de um precursor comum e podem ser divididas em duas linhagens principais: a linhagem mieloeritróide que inclui eritrócitos, megacariócitos, monócitos e granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e a linhagem linfóide que inclui os linfócitos T, B e *natural killer* (NK). Estas células exercem funções específicas e essenciais para manutenção da vida. Os eritrócitos são responsáveis pelo transporte de oxigênio. Neutrófilos compõem a principal população celular envolvida na resposta inflamatória aguda. Eosinófilos agem na defesa contra certos tipos de agentes infecciosos e junto com os basófilos são células efetoras da hipersensibilidade imediata. Monócitos fazem a defesa contra microorganismos. Linfócitos B produzem anticorpos que atuam nos processos de imunidade humoral, os linfócitos T reconhecem e englobam antígenos ligados à superfície de outras células sendo

mediadores de resposta imune e os linfócitos NK atacam células cancerosas e infectadas por vírus. As plaquetas, derivadas dos megacariócitos, são responsáveis pela coagulação do sangue (Junqueira & Carneiro, 1999).

A regulação da hematopoiese, ou seja, a manutenção de níveis estáveis de células maduras no sangue periférico é complexa e envolve mecanismos regulatórios locais e hormonais que podem promover ou inibir o crescimento e a diferenciação das células tronco em progenitoras e, destas, em células sanguíneas maduras. Este amplo arranjo de células com diferentes propriedades fenotípicas e funcionais, origina-se de uma população relativamente pequena de células tronco hematopoiéticas multipotentes (Weissman, 2000; Smith, 2003), que não têm apenas a capacidade de substituir os elementos figurados do sangue atendendo às necessidades diárias do organismo por longos períodos de tempo, mas também são capazes de repor continuamente o *pool* de células tronco, processo este referido como auto-renovação e que ainda não está completamente compreendido (Humphries *et al.*, 1981; Nakahata & Ogawa, 1987).

Estudos realizados em camundongos sugerem que existem diferenças fundamentais entre os mecanismos que controlam o número de células tronco e de células sanguíneas diferenciadas. Por exemplo, após tratamento quimioterápico o número de células sanguíneas pode voltar aos valores normais, mas o número de células tronco permanece severamente reduzido durante toda a vida do animal (Morley & Blake, 1979). Inversamente, o *pool* de células tronco em camundongos que não passaram por nenhum procedimento expande continuamente durante a vida do animal, tanto que camundongos idosos têm substancialmente mais células tronco que camundongos jovens, apesar de o envelhecimento não exercer nenhum efeito sobre o número de células sanguíneas circulantes (Morrison *et al.*, 1996; de Haan *et al.*, 1997). Finalmente, foi demonstrado que várias linhagens endogâmicas de camundongos apresentam grande variação no número e na cinética do ciclo celular das células tronco, sem diferenças detectáveis no número de células sanguíneas (Van Zant *et al.*, 1983; Van Zant *et al.*, 1990; Phillips *et al.*, 1992; Müller-Sieburg & Riblet, 1996; de Haan *et al.*, 1997). Assim, parece que o *steady state* de células tronco é determinado pelo número de células sanguíneas maduras através de um mecanismo direto de retro-alimentação. Certamente, o tamanho do *pool* de células

tronco deve ser regulado por mecanismos celulares intrínsecos geneticamente determinados e, além disso, a cinética das células tronco também deve ser afetada por fatores de crescimento extrínsecos.

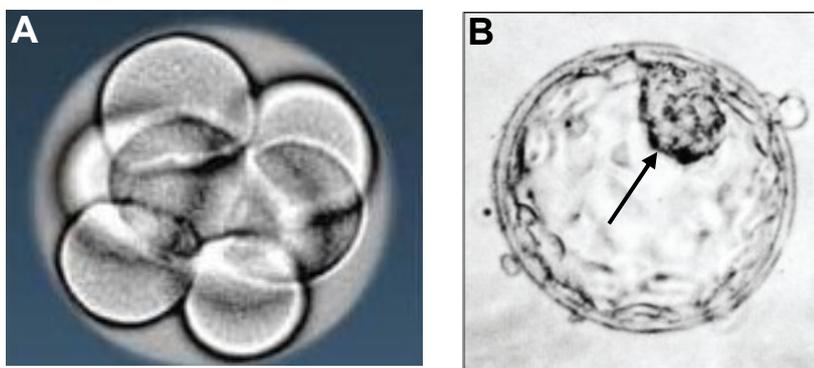
#### 1.4 CÉLULAS TRONCO

O primeiro estudo sugerindo a existência de células tronco foi realizado em 1961 quando um grupo de pesquisadores mostraram que camundongos que camundongos letalmente irradiados tinham seu sistema hematopoiético reconstituído após receberem transplante de células da medula óssea. Este resultado indicou que neste órgão haviam células capazes de originar todos os tipos de células sanguíneas maduras (Till & McCulloch, 1961). A partir deste momento surge o conceito de células tronco, que são células especiais indiferenciadas e não-especializadas encontradas no embrião, feto ou adulto que possuem pelo menos duas propriedades específicas que as definem. Primeiro, podem fazer cópias idênticas de si mesmas através de divisão mitótica por longos períodos de tempo sendo esta habilidade de proliferar conhecida como auto-renovação. Segundo, podem originar tipos celulares maduros que possuem características morfológicas e funcionais especializadas. Além disso, outras propriedades fundamentais das células tronco são a sua capacidade de existir em formas quiescentes em diferentes órgãos e de regenerar todas as células que constituem um determinado tecido (Hall & Watt, 1989; Potten & Loeffler, 1990).

As células tronco podem ser classificadas seguindo dois critérios: quanto à potencialidade, ou seja, sua capacidade de diferenciação, em totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou unipotentes; e quanto à origem, em embrionárias ou adultas.

Todas as células de um organismo adulto derivam de uma única célula totipotente (do latim *totus*, que significa todo) formada após a fecundação de um óvulo por um espermatozóide, chamada zigoto (Figura 6A). Durante o desenvolvimento embrionário, o zigoto sofre divisões mitóticas sucessivas que culminam na formação do embrião. Este processo é denominado clivagem e as células originadas destas

divisões são conhecidas como blastômeros, que se mantêm totipotentes, ou seja, capazes de originar todos os tecidos fetais, inclusive os extra-embrionários (Evans & Kaufman, 1981), até o estágio 8 células. Quando este número de células é ultrapassado, ocorre a compactação dos blastômeros dentro da mórula onde já é possível distinguir duas populações celulares com destinos completamente diferentes. No decorrer do quarto dia de desenvolvimento, a mórula, inicialmente maciça, começa a acumular líquido em seu interior o que leva ao aparecimento de uma cavidade interna, a blastocele (Gilbert, 2000). A partir deste momento o conceito passa a denominar-se blastocisto (Figura 6B). A camada de células achatadas mais externa é denominada trofoectoderma e originará as linhagens extra-embrionárias, enquanto que a massa celular interna formará o embrião propriamente dito (Zago & Covas, 2006). Estas células da massa celular interna do blastocisto são células tronco pluripotentes (do latim *plures*, que significa várias) uma vez que são capazes de originar as células dos três folhetos embrionários – endoderme, mesoderme e ectoderme – ou seja, todos tecidos do indivíduo adulto, mas não os anexos embrionários. À medida que o embrião se desenvolve e estas células se dividem sua potencialidade vai diminuindo até que se tornam multipotentes (do latim *multus*, que significa muitas). As células multipotentes são linhagem-específicas e capazes de originar células de algumas linhagens celulares. Este tipo de célula tronco é obtida de tecidos adultos como medula óssea, sangue periférico, cordão umbilical e polpa dentária (Kondo *et al.*, 2003). Também existem células tronco unipotentes (do latim *unus*, que significa um) capazes de originar apenas um tipo celular sobre condições normais, sendo que a maioria das células tronco tecido-específicas, como as encontradas no tecido cerebral, são unipotentes.



**Figura 6:** Zigoto humano no estágio de 8 células (A) e blastocisto humano (B). A seta mostra a massa celular interna do blastocisto. Fonte: Kirschstein & Skirboll, 2001

Quanto à origem, células tronco embrionárias são as células isoladas da massa celular interna do blastocisto, portanto as células pluripotentes (Thomsom *et al.*, 1995; Kondo *at al.*, 2003). As pesquisas com este tipo de célula ainda estão em fase inicial, visto que em muitos países não é permitido o uso de células tronco embrionárias humanas para pesquisa. No Brasil, em 24 de março de 2005, foi aprovada a Lei de Biossegurança nº 11.105 que permitiu, para fins de pesquisa e terapia, a utilização de células tronco embrionárias obtidas de embriões humanos produzidos por fertilização *in vitro* e não utilizados no respectivo procedimento, atendidas as seguintes condições:

- Sejam inviáveis;
- Sejam embriões congelados há três anos ou mais;
- Em qualquer caso, é necessário o consentimento dos genitores.

Neste mesmo ano, o então procurador da República Cláudio Fonteneles propôs uma ação direta de inconstitucionalidade nº 3.510 sobre a Lei de Biossegurança já que considerava os embriões como seres vivos. Em 2008 iniciaram-se as discussões sobre a constitucionalidade ou não desta Lei, até que em 29 de maio a ação de inconstitucionalidade foi considerada improcedente liberando a utilização de células tronco embrionárias humanas para fins de pesquisa e terapia (Fonte: [www.planalto.gov.br](http://www.planalto.gov.br)).

Células tronco adultas são células indiferenciadas encontradas em um tecido diferenciado em cujo sua função é de manutenção e reparo. São células raras capazes de se diferenciar em todos os tipos de células especializadas do tecido que se originou. Portanto, à medida que a célula tronco totipotente divide para formar o embrião os diferentes

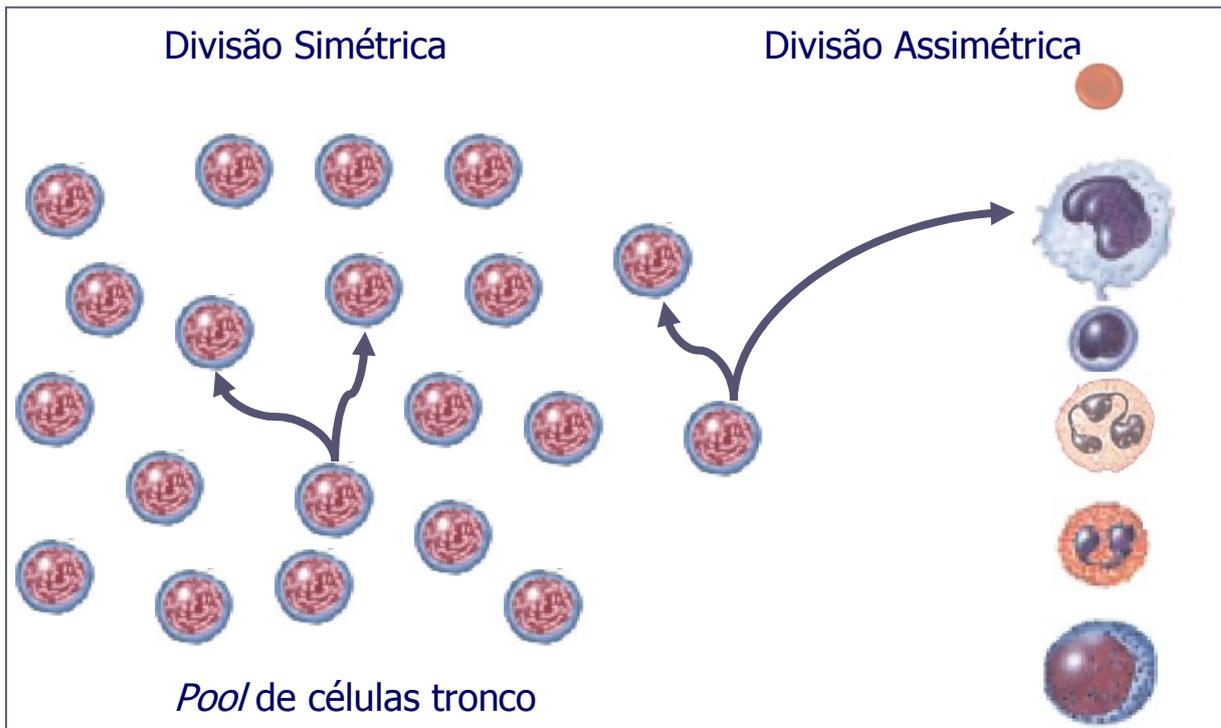
grupos celulares vão adquirindo características especializadas que, ao mesmo tempo, vão restringindo sua capacidade de diferenciação (Kirschstein & Skirboll, 2001). Este potencial de formação de diferentes tipos de células maduras é conhecido como plasticidade e esta é a maior vantagem quando se compara as células tronco embrionárias com as adultas, já que a primeira é capaz de originar todos os tecidos que compõem o organismo adulto.

O verdadeiro grau de plasticidade das células tronco adultas ainda não é completamente conhecido. Estudos iniciais mostraram que após transplante de medula óssea, marcadores específicos presentes nas células transplantadas foram encontrados em vários tipos de tecidos do receptor sugerindo que as células tronco de medula óssea apresentavam alta plasticidade (Eglitis & Mezey, 1997; Ferrari *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 1999; Orlic *et al.*, 2001; Krause *et al.*, 2001). Estes pesquisadores acreditavam que as células tronco adultas eram capazes de transdiferenciação que é a sua diferenciação não somente em células especializadas do tecido da qual derivam, mas também em células de um tecido completamente diferente (Camargo *et al.*, 2004). No entanto, a teoria da transdiferenciação começou a ser questionada e novas explicações surgiram para o fenômeno da plasticidade. Estudos mostraram que na verdade a célula tronco se funde com células do tecido-alvo, visto que marcadores específicos tanto de célula tronco como da célula especializada eram encontrados na célula referida (Alvarez-Dolado *et al.*, 2003; Herzog *et al.*, 2003). Outra explicação dada foi que as células tronco liberam fatores que estimulam a diferenciação das células tronco tecido específicas (Zago & Covas, 2006) em células especializadas. Mais recentemente, sugeriu-se que a medula óssea

hospedaria, além de suas próprias células tronco, vários outros tipos de células tronco tecido-específicas, de modo que quando a medula total é empregada em um transplante os resultados são explicados mais por sua heterogeneidade que por sua plasticidade (Kucia *et al.*, 2005). Portanto, os resultados obtidos ainda não são conclusivos uma vez que não confirmam o fenômeno da plasticidade das células tronco adultas.

Os componentes celulares de muitos, se não todos, os tecidos adultos de eucariotos superiores são derivados e mantidos por células tronco tecido-específicas capazes de multiplicar-se, diferenciando-se no tecido a que pertencem de acordo com o micro-ambiente em que se encontram (Barry & Murphy, 2004). A célula tronco precisa de um nicho, isto é, um sítio específico nos tecidos adultos onde possam residir, se auto-renovar e se diferenciar. Estruturalmente, o nicho é formado por células de suporte que fornecem um micro-ambiente adequado assim como por sinais que regulam o balanço entre auto-renovação e diferenciação (Spradling *et al.* 2001; Lin, 2002; Li & Xie, 2005;), sendo este balanço crítico para a homeostase tecidual. A população de células tronco pode ser reduzida se a diferenciação superar a auto-renovação e, similarmente, uma auto-renovação incontrolada pode expandir excessivamente a população de células tronco, aumentando o risco de tumorigênese. Um mecanismo que assegura este balanço é o controle da taxa de divisão assimétrica e simétrica das células tronco. Divisão assimétrica significa que a células tronco se divide em duas células filhas, sendo uma geneticamente idêntica a ela, que se mantém no nicho como tronco, e outra que deixa o nicho e segue para diferenciação (Figura 7). Divisão simétrica significa que a célula tronco se divide em duas células filhas geneticamente idênticas a ela que permanecem no nicho como células tronco (Zago & Covas, 2006). A mudança entre

divisão simétrica e assimétrica pode ocorrer em várias células tronco que ocupam o mesmo nicho sob condições fisiológicas diferentes (Watt & Hogan, 2000; Fuchs *et al.*, 2004).



**Figura 7:** Esquema de divisão simétrica e assimétrica das células tronco. Modificado de Zago & Covas, 2006.

Como já foi dito anteriormente, quando uma célula tronco sofre divisão assimétrica ela origina uma célula tronco idêntica a ela que se mantém no compartimento de célula tronco e outra célula que deixa o compartimento e não mantém as características genéticas de célula tronco. Esta célula, que passa a ser denominada célula progenitora ou precursora, ao se dividir origina sempre duas células filhas especializadas (Kirschstein & Skirboll, 2001). Portanto, as células tronco apresentam uma hierarquia organizacional dividida em três compartimentos proliferativos: o compartimento das células tronco multipotentes e capazes de auto-renovação, o compartimento que contém as células progenitoras comprometidas que possuem potencial

proliferativo grande, mas finito, e o compartimento de maturação onde se acumulam as células diferenciadas, ou seja, células morfológicamente identificadas como pertencendo a uma linhagem particular e com potencial proliferativo bastante limitado (Zago & Covas, 2006). No primeiro compartimento as células tronco passam por modificações transcricionais e ao sofrer divisão assimétrica geram uma célula progenitora sem mudanças fenotípicas aparentes mas com potencial de desenvolvimento mais restrito. As células progenitoras, por sua vez, se dividem de forma simétrica originando duas células com padrão de genes transcritos distintos da célula progenitora levando à aquisição de propriedades linhagem-específicas e, conseqüentemente, originando células maduras fenotipicamente distintas.

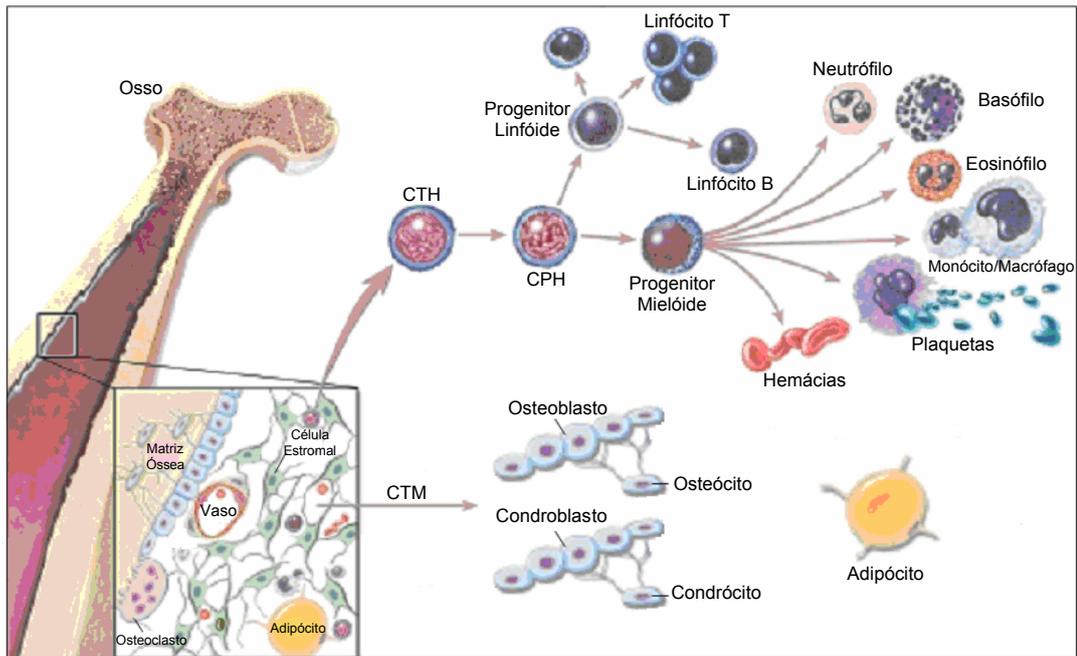
Os mecanismos que regulam o destino das células tronco ainda são mal compreendidos, mas acredita-se que esteja sob controle de fatores intrínsecos e extrínsecos que regulam o ciclo celular. Sabe-se que parte das células tronco de um tecido se encontram quiescentes, mas sob determinados estímulos estas células são capazes de entrar em divisão simétrica ou assimétrica dependendo da necessidade do organismo (Sherley, 2002; Lee *et al.*, 2003). Quando ocorre a redução ou destruição parcial do *pool* de células tronco ou mesmo quando ocorre crescimento corporal, as células tronco são induzidas por fatores de crescimento e/ou citocinas a sair do estado quiescente e entrar em divisão simétrica com o objetivo único de ampliar a população de células tronco. Por outro lado, quando há necessidade de repor ou aumentar o número de células diferenciadas, como por exemplo após um grande sangramento, as células tronco são induzidas a sofrer divisão assimétrica para restabelecer a homeostase. Enquanto a população de células tronco se encontra quiescente para auto-renovação, a população

progenitora, já comprometida com o processo de diferenciação, cicla ativamente para expandir seu número (Furukawa, 1997).

A proliferação das células tronco pode aumentar em resposta à lesão tecidual para que as células perdidas possam ser restituídas. Em princípio, a indução da divisão celular nos diferentes sistemas pode ocorrer através da liberação local e não local de mitógenos pelas células que estão morrendo, ou ainda, pela falta de inibidores que são produzidos normalmente pelas células saudáveis, ou ambos (Potten & Loeffler, 1990; Reynolds & Weiss, 1992; Donovan, 1994; Gritti *et al.*, 1996).

#### **1.4.1 Células tronco de medula óssea**

A medula óssea possui duas populações de células tronco (Figura 8) multipotentes distintas: as células tronco hematopoiéticas que originam todas as linhagens de células hematopoiéticas adultas (Morrison *et al.*, 1995) e as células tronco mesenquimais que originam a maioria das células da linhagem estromal da medula, incluindo condrócitos, osteoblastos, adipócitos e fibroblastos (Short *et al.*, 2003; Muguruma *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). Estas duas populações celulares podem ser facilmente isoladas de aspirados da medula óssea obtidos da tíbia e do fêmur de grandes e pequenos mamíferos. A partir destas fontes o procedimento para isolamento das células tronco é muito semelhante. Inicialmente, as células mononucleares são separadas utilizando um gradiente de densidade e, em seguida, utilizando diferentes anticorpos para antígenos de superfície destas células, podemos separar as duas populações.



**Figura 8:** Diferenciação de células tronco hematopoiéticas e mesenquimais. CPH: célula progenitora hematopoiética; CTH: célula tronco hematopoiética; CTM: célula tronco mesenquimal; NK: *natural killer*. Modificado de: Kirschstein & Skirboll, 2001.

Para se entender o desenvolvimento e maturação das células da medula óssea, tanto de humanos quanto de camundongos, é necessário conhecer seus antígenos de superfície que são proteínas utilizadas como marcadores de populações celulares e que permitem a seleção dessas populações. O surgimento dos antígenos de superfície é regulado durante o desenvolvimento celular, sendo que eles não aparecem ou desaparecem abruptamente durante o processo de maturação das células. Na verdade, esses antígenos apresentam uma expressão que pode ser gradualmente perdida dependendo do estágio de maturação no qual a célula se encontra (Civin & Loken, 1987). Portanto, células tronco podem ser isoladas baseado na expressão de antígenos de superfície presentes nas células em questão, através da separação celular ativada por fluorescência (FACS: *fluorescence activated cell sorting*), que é um tipo específico de citometria de fluxo, ou utilizando anticorpos conjugados a micro-esferas magnéticas (MACS:

*magnetic activated cell sorting*). Em geral, a purificação de células tronco é feita por uma combinação de marcadores de superfície, que podem ser marcadores tanto positivos como negativos da atividade de célula tronco, sendo que nenhum deles é específico pois a expressão de antígenos de superfície varia entre espécies e o local de origem das células tronco.

Na medula óssea existem nichos distintos que dão suporte a sobrevivência e crescimento das células tronco hematopoiéticas, ao fornecer os fatores e as propriedades adesivas necessárias para manter sua viabilidade, enquanto facilitam um balanço apropriado da maturação da progênie durante toda a vida do organismo (Janowska-Wieczorek *et al.*, 2001). Também já foi determinado que estes nichos são formados por células precursoras estromais, especificamente osteoblastos (Calvi *et al.*, 2003). Juntos o estroma e as células estromais fornecem suporte físico para maturação dos precursores das células sanguíneas, e funcionam como repositores dos sinais que dirigem o comprometimento, diferenciação e maturação das células hematopoiéticas (Koller *et al.*, 1997; Moore, 2004; Taichman, 2005). Os sinais intracelulares e extracelulares necessários para manter o desenvolvimento das células tronco no micro-ambiente da medula óssea são muito diferentes.

#### 1.4.1.1 Células tronco mesenquimais

As células tronco mesenquimais, também conhecidas como células tronco estromais (Prockop, 1997), foram originalmente identificadas em 1966 a partir do cultivo de células mononucleares da medula óssea de camundongos em placas de plástico quando Friedenstein e

colaboradores verificaram que um grupo de células aderiam ao plástico formando colônias com aspecto fibroblastóide e, por esta razão, as células foram chamadas de células formadoras de colônias fibroblásticas (Friedenstein *et al.*, 1966). Quase três décadas depois, em 1994, Caplan observou que dependendo dos fatores colocados na culturas destas células aderentes elas eram capazes de se diferenciar nas linhagens celulares originadas pelo mesênquima do embrião e, por isso, denominou-as de células tronco mesenquimais (Caplan, 1994).

São células definidas como auto-renováveis e multipotentes (Caplan, 1991) que têm a capacidade de se diferenciar em várias linhagens de tecidos mesenquimais distintos incluindo osso (Bruder *et al.*, 1994; Bruder *et al.*, 1997; Bruder *et al.*, 1998), cartilagem (Kadiyala *et al.*, 1997; Johnstone *et al.*, 1998), tecido adiposo (Prockop, 1997; Dennis *et al.*, 1999; Gimble & Guilak, 2003), músculo (Galmiche *et al.*, 1993; Ferrari *et al.*, 1998), tendão (Young *et al.*, 1998; Awad *et al.*, 1999), fibroblasto e células endoteliais (Majumdar *et al.*, 1998; Pittenger *et al.*, 1999; Campagnoli *et al.*, 2001; Romanov *et al.*, 2003; Short *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Muguruma *et al.*, 2006). Esta habilidade das células tronco mesenquimais de se diferenciar em vários tipos celulares de tecido conectivos fez com que nos últimos anos crescesse exponencialmente o interesse neste tipo celular especial devido ao seu potencial de uso na regeneração de tecidos e órgãos (Kadiyala *et al.*, 1997; Young *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 1999; Johnstone & Yoo, 1999).

As células tronco mesenquimais apresentam relevante plasticidade sendo capazes de originar células endoteliais e células musculares cardíacas. Esta propriedade tornou a terapia com células tronco mesenquimais um procedimento promissor para o tratamento de vários

tipos de doenças cardiovasculares, principalmente as isquêmicas (Wollert & Drexler, 2005). Outra vantagem do uso destas células é que elas podem ser obtidas diretamente do paciente, eliminando assim as complicações associadas com a rejeição de tecidos alogênicos pelo sistema imune do mesmo.

As células tronco mesenquimais constituem uma população rara de células tronco multipotentes da medula óssea de humanos e murinos, correspondendo a cerca de 0,001% a 0,01% de todas as células medulares (Pittenger *et al.*, 1999). São em geral mais difíceis de caracterizar que as células tronco hematopoiéticas, mas tem sido feito progresso considerável na caracterização do perfil antigênico das células tronco mesenquimais através de FACS ou MACS. As células tronco mesenquimais apresentam um perfil de antígenos de superfície altamente variável (Simmons & Torok-Storb, 1991; Jiang *et al.*, 2002; Vogel *et al.*, 2003) o que torna muito difícil a descoberta de um marcador específico que as identifique exclusivamente. Além disso, elas compartilham antígenos de superfície com células endoteliais, epiteliais e músculo (Minguell *et al.*, 2001). Entretanto, em seu estado indiferenciado, não expressam os antígenos de superfície presentes nas células hematopoiéticas (Pittenger *et al.*, 1999; Huss *et al.*, 2000). Embora não existam anticorpos exclusivos para as células tronco mesenquimais, a análise de um conjunto de anticorpos permite purificá-las e isolá-las com certa facilidade.

Diferente das células tronco hematopoiéticas, as células tronco mesenquimais exibem alta capacidade de aderir, proliferar e desenvolver em placas de cultura de plástico (Javason *et al.*, 2001; Hung *et al.*, 2002; Dennis & Charbord, 2002; Johnstone, 2002), sendo

esta a forma utilizada até hoje como método padrão de isolamento deste tipo celular (Friedenstein *et al.*, 1970) que também pode ser encontrado no tecido adiposo (Zuk *et al.*, 2001), músculo esquelético, pulmão (Tuan *et al.*, 2003), polpa dental (Gronthos *et al.*, 2000), sangue de cordão umbilical (Sarugaser *et al.*, 2005), veia umbilical (Covas *et al.*, 2003), parede das artérias (Abedin *et al.*, 2004), fígado (Campagnoli *et al.*, 2001) e pâncreas fetais (Hu *et al.*, 2003) sugerindo que o nicho das células tronco mesenquimais pode não ser restrito apenas à medula óssea.

#### 1.4.1.2 Células tronco hematopoiéticas

A célula tronco hematopoiética foi a primeira célula tronco de adulto a ser descrita (Till & McCulloch, 1961) e desde então é a célula tronco mais extensivamente estudada e usada em terapias celulares (Kondo *et al.*, 2003). São células multipotentes e capazes de auto-renovação limitada que residem, principalmente, na medula óssea de adultos e originam todas as células hematopoiéticas maduras de mamíferos.

Os principais sítios de hematopoiese mudam durante a ontogenia de mamíferos à medida que surgem novas populações de células tronco hematopoiéticas. Em humanos de 2 a 3 semanas (em murinos 7 a 10 dias) após a fertilização, o primeiro sítio ocupado pelas células tronco é o saco vitelino. Do saco vitelino as células tronco se disseminam, por volta da 5ª ou 6ª semana (em murinos 10 a 16 dias), para o fígado fetal que passa a ser o responsável pela hematopoiese no feto. A partir do 4º mês de gestação (em murinos 16 a 21 dias), a hematopoiese se localiza

na medula óssea onde se mantém por toda a vida adulta (Tavassoli, 1991; Medvinsky & Dzierzak, 1998; Palis & Yoder, 2001; Bonnet, 2003).

As células tronco hematopoiéticas, além da medula óssea, também podem ser isoladas do sangue periférico, baço, cordão umbilical e fígado fetal (Bonnet, 2002; Preston *et al.*, 2003). São células raras correspondendo a apenas 0,05% a 0,5% das células nucleadas da medula óssea (Kirschstein & Skirboll, 2001) e a 0,001% do total de células do sangue (Szilvassy *et al.*, 1990; Morrison & Weissman, 1994; Cheshier *et al.*, 1999) por isso sua identificação morfológica sempre foi muito difícil.

O sistema hematopoiético está organizado de maneira hierárquica, na qual células tronco hematopoiéticas raras possuem a capacidade de auto-renovação, proliferação e diferenciação em diferentes linhagens de células do sangue periférico (Weissman *et al.*, 2001; Reya, 2003; Smith, 2003). Sob condições fisiológicas normais as células tronco hematopoiéticas executam principalmente divisão assimétrica (Calvi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003), originando uma célula progenitora hematopoiética linhagem-específica que prolifera rapidamente, mas apresenta capacidade limitada de auto-renovação. Esta célula progenitora, passa por divisão simétrica e origina duas células diferenciadas que são retidas na medula óssea até que estejam maduras e depois liberadas no sistema vascular (Meghji, 1992; Fliedner, 1998).

A célula tronco hematopoiética origina dois tipos de células progenitoras comprometidas com a linhagem linfóide (progenitora linfóide) ou com as linhagens mielóide e eritróide (progenitora mioeritróide) em resposta

aos fatores de crescimento humoral e citocinas presentes no local (Gribaldo, 2002; Diodovich, *et al.*, 2004). A progenitora mielóide originará a maioria das células medulares entre elas granulócitos ou células polimorfonucleadas (neutrófilos, basófilos e eosinófilos), monócitos, eritrócitos e megacariócitos (Katsura, 2002); e a progenitora linfóide resultará nos linfócitos T, B e NK (Goldsby *et al.*, 2002; Gribaldo, 2002; Diodovich, *et al.*, 2004). A proliferação e diferenciação das células progenitoras hematopoiéticas permitem ao sistema hematopoiético reagir rápida e efetivamente para suprir a demanda e aumentar a produção de células maduras durante crises hematopoiéticas como ocorre durante hemorragia, hemólise ou infecção.

Acredita-se que durante a homeostase as células tronco hematopoiéticas estejam quiescentes (Walkley *et al.*, 2005), ou seja, apresentem baixa taxa de proliferação se dividindo pouco ou não dividindo até que seja requisitado que elas se dividam para manter uma quantidade apropriada de células sanguíneas ou renovar o *pool* de células tronco (Cheshier *et al.*, 1999). Em caso de dano em algum tecido do organismo poderá ocorrer mobilização dessas células, sendo o dano um estímulo para que esse tipo celular se diferencie e promova o reparo da estrutura danificada (Kondo *et al.*, 2003; Fuchs *et al.*, 2004). Portanto, nestas situações, as células tronco hematopoiéticas podem entrar em auto-renovação, proliferação e diferenciação para repopular a medula óssea e restabelecer a homeostase. Entretanto, se a capacidade de auto-renovação estiver prejudicada, podem ocorrer danos permanentes ao sistema hematopoiético, falha da medula óssea e até a morte do organismo.

Apesar de existir bastante informação sobre o comportamento das células tronco e progenitoras hematopoiéticas *in vitro*, a regulação destas células em seu ambiente fisiológico, a medula óssea, ainda é pouco compreendida. Isto significa que, pelo menos em parte, a regulação do sistema hematopoiético é complexa e os métodos experimentais disponíveis não são eficientes em detectar os componentes e a interação de fatores que afetam órgãos inteiros. A quiescência, auto-renovação e diferenciação das células tronco hematopoiéticas são processos precisamente regulados (Cashman *et al.*, 1999) e fatores específicos, geralmente citocinas ou fatores de crescimento, são requeridos para a diferenciação de uma célula tronco em uma célula progenitora linhagem-específica, e, inversamente, a falta de um fator pode levar ao bloqueio da hematopoiese em um determinado ponto da diferenciação (Cheng *et al.*, 2000a; Cheng *et al.*, 2000b; Kondo *et al.*, 2003; Orkin, 2000; Zandstra *et al.*, 2000).

O processo de diferenciação hematopoiética é regulado por uma interação entre fatores intrínsecos e extrínsecos (Lotem & Sachs, 2002). Análises da diferenciação de células tronco hematopoiéticas *in vitro* mostraram que fatores de crescimento hematopoiético, como eritropoietina, trombopoietina, fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF: *granulocyte colony –stimulating factor*) ou de granulócitos e macrófagos (GM-CSF: *granulocyte macrophage colony –stimulating factor*), estão fortemente envolvidos na manutenção do número de células sanguíneas periféricas, uma vez que induzem a diferenciação das células tronco (Zhu & Emerson, 2002). Entretanto, *in vivo*, apenas algumas citocinas, incluindo eritropoietina, trombopoietina e fator de célula tronco (SCF: *stem cell factor*) foram identificados como tendo efeito sobre o número de células tronco, sendo que o último

estimula a sua proliferação (Zsebo *et al.*, 1990; Kimura *et al.*, 1998; Mackarehtschian *et al.*, 1995). Além disso, demonstrou-se que proteínas intracelulares, como fatores de transcrição e fatores de remodelamento da cromatina, regulam de forma intrínseca o número de células tronco (Nichogiannopoulou *et al.*, 1999; Bunting *et al.*, 2002; Lessard & Sauvageau, 2003; Kamminga *et al.*, 2006). Portanto, as células tronco hematopoiéticas através de estímulos intrínsecos e extrínsecos, são capazes de balancear a taxa de auto-renovação e de diferenciação para suprir as necessidades do organismo.

As células tronco hematopoiéticas só podem ser identificadas depois de isoladas do organismo. São morfologicamente heterogêneas, uma vez que possuem tamanho e densidade variáveis e, por isso, a forma mais utilizada para identificá-las é através da determinação de seu perfil antigênico, ou seja, seus antígenos de superfície. Várias combinações de marcadores têm sido usadas no isolamento de células tronco hematopoiéticas murinas e humanas. Entretanto, nenhuma destas combinações é definitiva na identificação de uma população pura destas células. Portanto, apesar de muito utilizada a identificação das células tronco hematopoiéticas por imunofenotipagem não é considerado método definitivo, pois a população de células obtida é muito heterogênea.

A idéia de que células tronco hematopoiéticas de mamíferos adultos apresentam plasticidade, ou seja, podem se diferenciar em linhagens celulares de tecidos completamente distintos, tem causado muito entusiasmo na comunidade científica. Krause e colaboradores demonstraram que uma única célula tronco hematopoiética não só era capaz de repopular o sistema hematopoiético em camundongos

irradiados, mas também de se diferenciar em epitélio pulmonar, pele, fígado e células do trato gastrointestinal (Krause *et al.*, 2001). Do mesmo modo, Orlic e colaboradores observaram o aparecimento de cardiomiócitos, células endoteliais e células musculares lisas na área do infarto depois que injetaram células tronco hematopoiéticas em um modelo animal de infarto agudo do miocárdio (Orlic *et al.*, 2001). Estes estudos sugerem a possibilidade de uso das células tronco hematopoiéticas na regeneração de órgãos e tecidos.

## 1.5 ESTRESSE OXIDATIVO

Oxigênio é essencial para manutenção da integridade e função celular. Paradoxalmente, concentrações de oxigênio maiores que as presentes na atmosfera (Halliwell & Gutteridge, 1984) são responsáveis pela formação de espécies reativas de oxigênio que são pequenas moléculas derivadas do metabolismo do oxigênio incluindo radicais livres de oxigênio, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o radical hidroxila ( $OH^-$ ), e algumas moléculas que não são radicais livres, mas que facilmente se transformam em radicais, como ozônio ( $O_3$ ), oxigênio *singlet* ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Bedard & Krause, 2007). O termo radical livre se refere a qualquer átomo que possui um ou mais elétrons desemparelhados, o que os torna altamente reativos e instáveis.

A formação de espécies reativas de oxigênio constitui uma ação contínua e fisiológica, cumprindo funções biológicas essenciais. Fisiologicamente, estas moléculas possuem meia-vida curta, são derivadas da redução do oxigênio molecular, altamente reativas, produzidas de maneira controlada e funcionam como moléculas de

sinalização celular (Wassmann *et al.*, 2006; Touys *et al.*, 2003). Evidências experimentais indicam que as espécies reativas de oxigênio, particularmente o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, funcionam como segundos mensageiros ativando várias moléculas de sinalização que desempenham papel importantíssimo na biologia vascular e no desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Embora uma pequena quantidade de espécies reativas de oxigênio seja necessária para manutenção da vida, sua produção excessiva, maior que a velocidade de sua remoção, conhecida como estresse oxidativo, pode conduzir a diversas formas de dano celular através da oxidação maciça de substratos biológicos, desempenhando papel importante no envelhecimento e desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Cai & Harisson, 2000; Schmidit-Ott *et al.*, 2000; Annuk *et al.*, 2003), neurodegenerativas (Benhar *et al.*, 2002), inflamatórias e câncer (Cai & Harisson, 2000; Griendling *et al.*, 2000; Chilsom & Steinberg, 2000; Steinberg & Witztum, 2002). Portanto, a formação de espécies reativas de oxigênio nem sempre é deletéria, mas se houver estímulo exagerado na produção destas espécies e a isto estiver associada uma falha na defesa antioxidante, poderão ocorrer vários eventos nocivos.

A formação de espécies reativas de oxigênio pode ocorrer no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana celular (Anderson, 2000). As enzima responsáveis pela sua produção no sistema cardiovascular são óxido nítrico sintase, xantina oxidase e ciclooxigenase, entretanto a principal responsável pela produção de ânion superóxido nas células vasculares é a NAD(P)H oxidase que catalisa a produção de ânion superóxido pela redução do oxigênio, usando a NAD(P)H como doadora de elétron (Gyllenhammar, 1987; Griendling *et al.*, 1994; Mohazzab *et al.*,

1994; Pagano *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 1998; Lassegue & Clempus, 2003). A NAD(P)H oxidase é uma enzima complexa composta por três subunidades citosólicas, p47phox (rac), p67phox e p40phox, e duas subunidades de membrana p22phox e gp91phox (Nox), sendo esta última a subunidade catalítica (Chabrashvili *et al.*, 2002; Babior, 2004). Esta enzima existe de forma constitutiva nas células vasculares e pode ser regulada por fatores humorais, como angiotensina II (Griendling *et al.*, 1994; Hayakawa *et al.*, 1997; Haynes *et al.*, 1998), e por forças hemodinâmicas, como *shear stress* (Haynes *et al.*, 1997; De Keulenaer *et al.*, 1998). Quando a NAD(P)H oxidase é estimulada, a subunidade p47phox é fosforilada e as subunidades citosólicas se reúnem formando um complexo que se liga às subunidades de membrana, possibilitando a produção de radicais superóxido (Patterson *et al.*, 1999; Lassegue *et al.*, 2001). A atividade desta enzima foi implicada, por exemplo, no desenvolvimento de aterosclerose e hipertensão (Sorescu *et al.*, 2002).

Existem vários mecanismos que contrabalançam a produção de espécies reativas de oxigênio (Nordberg & Arnér, 2001). Entre eles os mais bem caracterizados são os mecanismos enzimáticos da catalase e da glutathiona peroxidase, que coordenam a catalisação de peróxido de hidrogênio em água, e da superóxido dismutase, que facilita a formação de peróxido de hidrogênio a partir do ânion superóxido (Kirkman & Gaetani, 1984; Ursini *et al.*, 1995; Kirkman *et al.*, 1999; de Haan *et al.*, 2004). Estas enzimas são encontradas no meio intracelular (Hebbel, 1986; Minotti & Aust, 1987; Horton *et al.*, 1989) e são consideradas enzimas antioxidantes, pois retardam ou previnem a oxidação de substratos biológicos.

Em condições fisiológicas normais, a produção de espécies reativas de oxigênio pelas enzimas oxidantes é contrabalançada pelos mecanismos antioxidantes do organismo. Entretanto, algumas condições patológicas causam mudanças pronunciadas na expressão e na atividade de enzimas antioxidantes e oxidantes, levando ao estresse oxidativo, ou seja, um desbalanço entre a produção e a eliminação destas espécies reativas.

A relação entre estresse oxidativo e aumento da pressão arterial foi demonstrado em vários modelos de hipertensão experimental, como os modelos DOCA-sal (Somers *et al.*, 2000; Beswick *et al.*, 2001), 2R1C (Heitzer *et al.*, 1999) e 1R1C (Dobrian *et al.*, 2001) que apresentam produção excessiva de ânion superóxido devido ao aumento da atividade da enzima NAD(P)H oxidase (Griendling *et al.*, 1994; Beswick *et al.*, 2001; Rajagopalan *et al.*, 1996; Dzau, 2001; Landmesser & Harrison, 2001; Higashi *et al.*, 2002; Mollnau *et al.*, 2002), sendo que os tipos de hipertensão onde o SRA está ativado são particularmente importantes, pois a angiotensina II é um potente estimulador da produção de espécies reativas de oxigênio nas células vasculares por aumentar a atividade da NAD(P)H oxidase (Lassegue & Clempus, 2003; Touys *et al.*, 2003). Sabe-se que os dois principais tipos de espécies reativas de oxigênio no sistema cardiovascular, o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, contribuem para o desenvolvimento da hipertensão de formas diferentes: o ânion superóxido pela inativação do óxido nítrico e o peróxido de hidrogênio ao alterar o remodelamento vascular (Zafari *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002).

As espécies reativas de oxigênio interagem com macromoléculas biológicas como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos,

destruindo ou alterando a função destes compostos e causando citotoxicidade, alergias, mutagênese e até morte celular, dependendo da proporção da exposição (Mates *et al.*, 1999). Por exemplo, a peroxidação lipídica é um efeito bem conhecido das espécies reativas de oxigênio que resulta em dano à membrana celular assim com à membrana das organelas (Thollon *et al.*, 1995; Rathore *et al.*, 1998). Quando interagem com proteínas, as espécies reativas de oxigênio podem levar a inativação de enzimas críticas ou induzir a desnaturação protéica tornando-as não-funcionantes (Lockwood, 2000; Stadtman & Levine, 2003). Além disso, as espécies reativas de oxigênio podem induzir quebras de fita, oxidação de bases (purinas) e *cross-links* DNA-DNA e DNA-proteína danificando o DNA ou podem mediar alterações na estrutura da cromatina afetando a expressão gênica (Rahman, 2003; Konat, 2003). Estas biomoléculas danificadas devem ser reparadas ou substituídas e este mecanismo de reparo é especialmente importante para manutenção eficiente da informação genética contida no DNA (Dample & Harisson, 1994).

Acredita-se que as espécies reativas de oxigênio sejam causadoras de mais de 20 tipos diferentes de dano ao DNA (Slupphaug *et al.*, 2003), como modificações químicas nas bases nitrogenadas, formação de sítios abásicos, *cross-links* DNA-proteína e quebras de fita simples ou dupla (Loft & Poulsen, 1996; Ashok *et al.*, 1997). O radical hidroxila reage indiscriminadamente com as bases púricas, com as pirimídicas e com a pentose causando a eliminação de uma base ou quebras na fita de DNA (Dizdaroglu, 1986).

Portanto, doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial, estão associadas ao aumento do estresse oxidativo devido ao aumento da

atividade da NAD(P)H oxidase que estimula a produção de espécies reativas de oxigênio. Estas moléculas podem interagir com moléculas biológicas, como o DNA, danificando-as.

**JUSTIFICATIVA**

## 2 JUSTIFICATIVA

Existem muitos estudos que investigam o uso de células tronco de medula óssea no tratamento de doenças cardiovasculares, visto que se acredita no potencial de regeneração destas células. Entretanto, os resultados obtidos nos estudos onde foram utilizadas células tronco de medula óssea para o tratamento destas condições patológicas ainda são contraditórios.

A hipertensão renovascular angiotensina II-dependente é o tipo mais comum de hipertensão secundária. Sabe-se que a angiotensina II, além de um potente vasoconstritor, possui várias outras atividades biológicas, como regulação do crescimento celular e produção e liberação de fatores pro-inflamatórios, imuno-moduladores e oxidantes. Entretanto, os efeitos deste peptídeo sobre as células tronco da medula óssea *in vivo* ainda não foram determinados.

Portanto, atualmente, fazem-se necessários estudos capazes de determinar como doenças cardiovasculares que atingem grande parte da população mundial, como hipertensão arterial, afetam a proliferação e a diferenciação das populações de células tronco hematopoiética e mesenquimal, além de verificar se estas doenças danificam o DNA das células mononucleares da medula óssea.



# **OBJETIVOS**



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVOS GERAIS**

Este trabalho tem como objetivo investigar os efeitos da hipertensão renovascular 2R1C sobre as células tronco da medula óssea de camundongos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Na medula óssea de camundongos hipertensos:

- Quantificar o número de células indiferenciadas;
- Quantificar o número de células inflamatórias (linfócitos e monócitos);
- Quantificar o número de células tronco hematopoiéticas;
- Quantificar o número de células tronco mesenquimais;
- Qualificar os níveis de dano genético causado às células mononucleares.



# **METODOLOGIA**

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem C57Bl/6 (Figura 9), pesando entre 22 e 25 gramas com aproximadamente 8 semanas de idade, provenientes do biotério do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular, pertencente ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, com garantia de serem animais isogênicos, ou seja, filhos de casais irmãos e, portanto, com o mínimo de variabilidade genética. Os animais foram mantidos no biotério em gaiolas individuais onde receberam água e ração *ad libitum* e tiveram controlado o ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e a umidade (70%) do ambiente.

Os aspectos éticos, a utilização e o manuseio experimental dos animais estavam de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CNTBIO) e American Physiological Society (APS). O protocolo experimental foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).



**Figura 9:** Camundongo da linhagem C57BL/6 do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular da UFES.

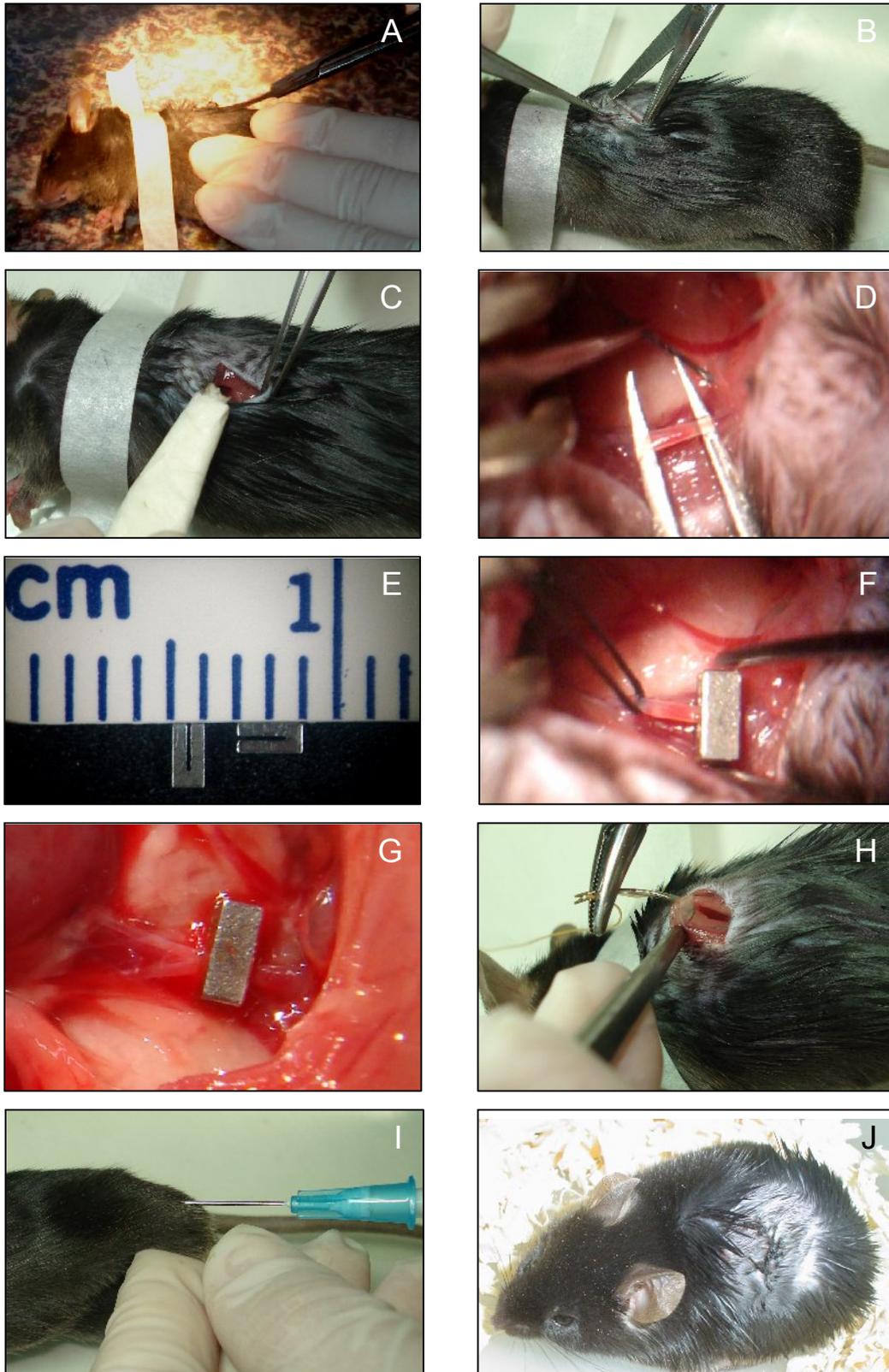
## 4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

**Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais:**

Animais C57BL/6	⎧ SHAM (n=10) ⎩	- Medidas hemodinâmicas
		- Dosagem de angiotensina II plasmática
	⎧ 2R1C (n=10) ⎩	- Isolamento de CMN
		- Contagem de CMN
		- Quantificação de CTH e CTM
		- Análise de genotoxicidade

## 4.3 INDUÇÃO DA HIPERTENSÃO RENOVASCULAR 2R1C

Os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina (91/9.1 mg/kg) por via intraperitoneal. Após a tricotomia (Figura 10A), foi realizada uma incisão no flanco esquerdo (Figura 10B) dos animais para exposição do conteúdo da cavidade retroperitoneal (Figura 10C). Com auxílio de uma lupa cirúrgica (Opto Eletrônica S/A Brasil) a artéria renal esquerda foi isolada da veia renal (Figura 10D), o fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, a pressão de perfusão renal reduzidos pela colocação de um clipe de aço em forma de “U” com 0,12mm de abertura (Figura 10E - Exidel AS, Moutiter, Suíça) ao redor da artéria renal esquerda, próximo à aorta dos animais do grupo 2R1C (Figura 10F e G). A camada muscular e a incisão cutânea foram suturadas, respectivamente, com Catgut 4.0 e Fio de Seda 4.0 (Figura 10H). Os animais do grupo Sham foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a colocação do clipe. Durante a cirurgia, o animal foi mantido aquecido sobre uma manta cirúrgica regulada em 37°C. Após a cirurgia, os animais receberam injeção intramuscular única de penicilina (Figura 10I - Benzetacyl; 100UI) para prevenir infecção e tylenol (paracetamol: 15mg/kg) na água de beber como analgésico. Os animais foram observados até se recuperarem da anestesia (Figura 10J). Os animais foram estudados 14 dias após a indução da hipertensão.



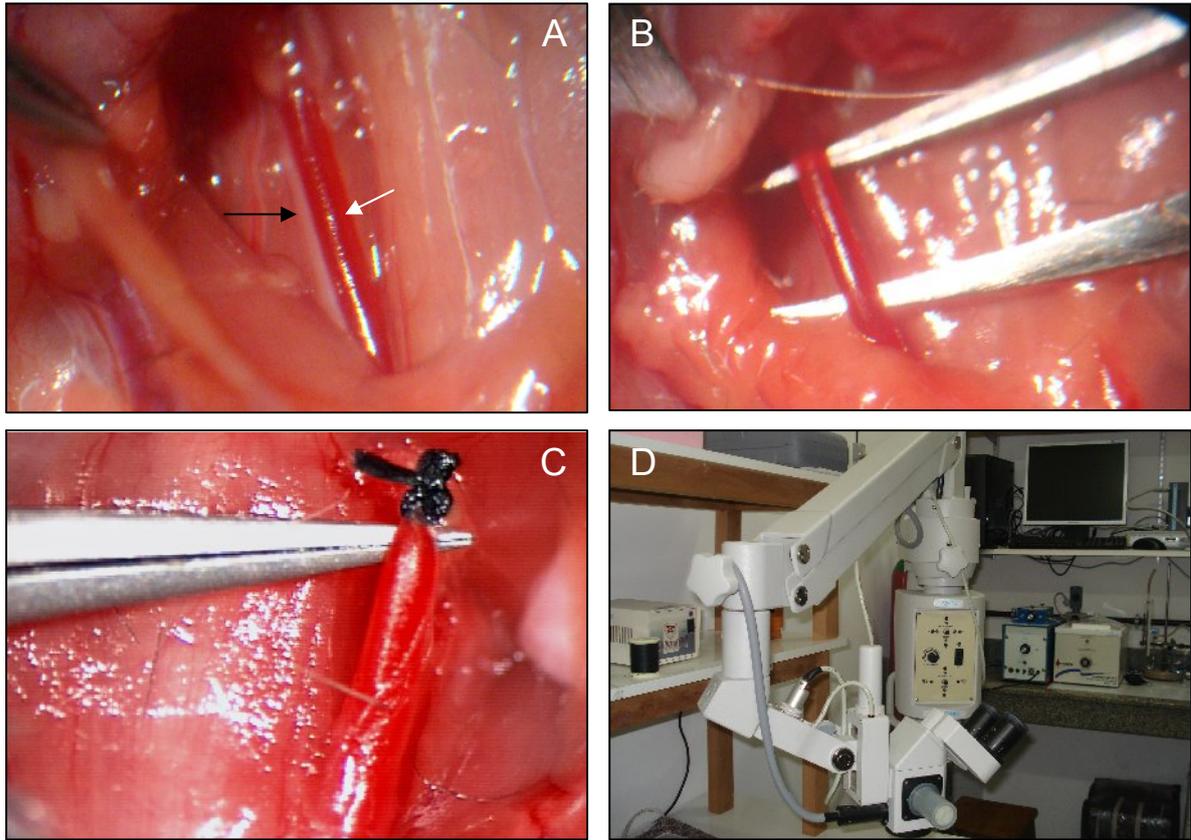
**Figura 10:** Cirurgia para indução da hipertensão 2R1C. Tricotomia (A), incisão no flanco esquerdo (B), exposição do conteúdo da cavidade retroperitoneal (C), isolamento da artéria renal esquerda (D), clipe de aço (E), colocação do clipe ao redor da artéria (F), artéria renal

esquerda clipada (G), sutura (H), aplicação de penicilina (I), animal recuperando-se da anestesia (J).

#### 4.4 MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL

##### 4.4.1 Canulação da artéria carótida

As pressões arterial sistólica, diastólica e média e a frequência cardíaca foram medidas 14 dias após a cirurgia para indução da hipertensão. Para o registro das medidas hemodinâmicas, foi colocado um cateter na artéria carótida direita comum, que consistia em uma cânula com de 4 a 5 cm de comprimento (0,040 mm OD X 0,025 mm ID; Micro-Renathane; Braintree Science) que foi esticada sobre ar aquecido até que sua extremidade ficasse com aproximadamente 300-500 µm de diâmetro. Para isso, os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina (91/9.1 mg/kg) por via intraperitoneal. Foi feita uma incisão cervical nos animais, que permitiu o acesso à artéria carótida, que foi isolada (Figura 11A e B) e teve uma de suas extremidades amarrada (Figura 11C). Em seguida o cateter foi preenchido com solução salina isotônica contendo heparina (100U) e inserido no lúmen da artéria através de uma pequena incisão para registros de pressão arterial sistólica, média e diastólica e da frequência cardíaca. Por fim, o cateter foi firmemente amarrado e exteriorizado na nuca dos animais com o auxílio de um trocater. A cirurgia foi realizada com o auxílio de lupa cirúrgica (Figura 11D - Opto Eletrônica S/A) e o animal foi mantido aquecido sobre uma manta térmica durante toda a cirurgia. Os animais receberam injeção intramuscular única de penicilina (Benzetacyl; 100UI) ao final do procedimento e tylenol (paracetamol: 15mg/kg) na água de beber como analgésico.

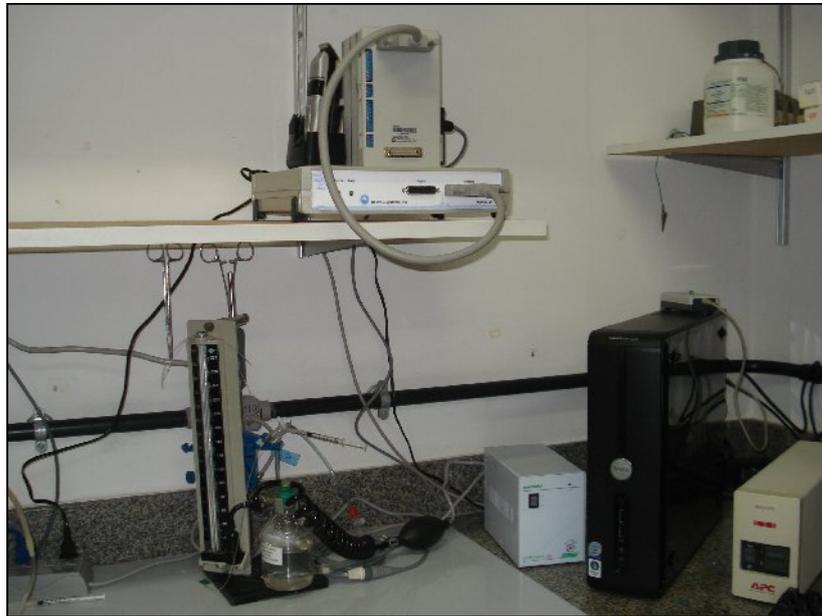


**Figura 11:** Artéria carótida direita (seta branca) e nervo vago (seta preta) (A), artéria carótida isolada (B), com sua extremidade amarrada (C), lupa cirúrgica (D).

#### 4.4.2 Medida direta da pressão arterial

O registro foi realizado nos animais conscientes e livres, 48 horas após a colocação do cateter. Para o registro da pressão arterial sistólica, média, diastólica e frequência cardíaca, o cateter foi acoplado a um pino de aço de 23-gauge que estava conectado a um tubo de polietileno de aproximadamente 25 cm (PE-50; 0,023 mm ID X 0,038 mm OD; Clay-Adams, EUA). A extremidade livre deste tubo foi acoplada a um transdutor de pressão (Cobe Laboratories, EUA) previamente conectado a um amplificador e a um sistema de aquisição de dados (Figura 12). A indução da hipertensão foi considerada bem sucedida quando os animais apresentavam pressão arterial média maior que 120 mmHg. Os animais que não atingiam este critério eram excluídos do estudo. Quando o animal apresentava sinais de estresse

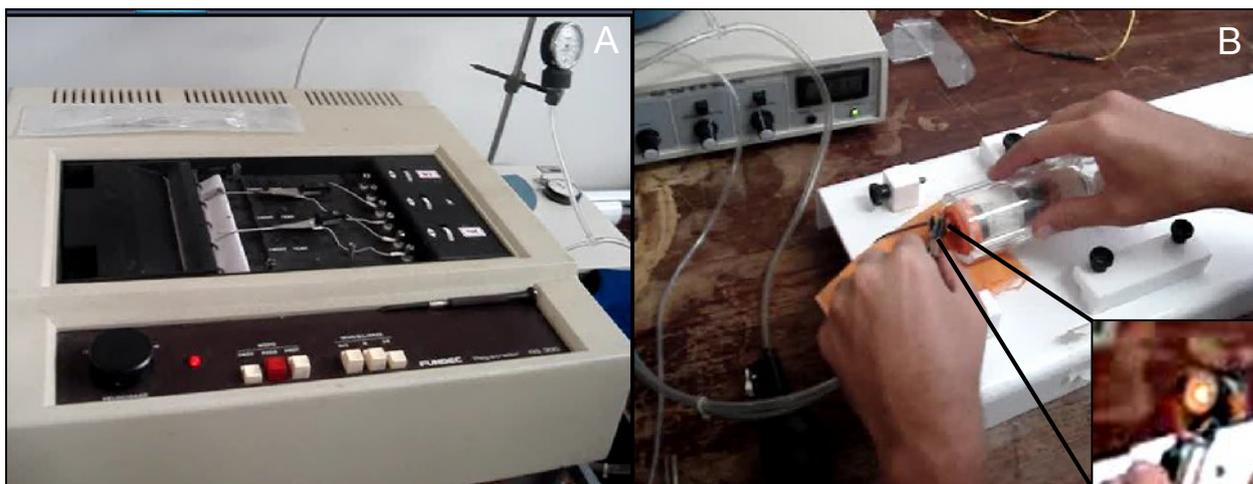
ou dor, ele era eutanasiado com uma sobre-dose de pentobarbital sódico intraperitonealmente.



**Figura 12:** Sistema para aquisição de dados nas medidas diretas de pressão arterial (Biopac Systems, EUA).

#### **4.4.3 Medida indireta da pressão arterial**

A pressão arterial sistólica dos animais foi registrada por pletismografia de cauda (Figura 13A). Para isso, os camundongos foram treinados e condicionados durante 7 dias por 1 hora para que se acostumassem com o contentor. No dia do registro eles foram colocados no contentor e aquecidos por 10 minutos a 37°C para melhor captação do pulso da artéria caudal. Após um período de 30 minutos de aclimação o registro foi realizado. Com o animal dentro do contentor, o *cuff* foi posicionado ao redor da base da cauda (Figura 13B). Este *cuff* possui um sensor fotoelétrico conectado a um amplificador que detecta e converte ondas de pulso em sinais elétricos. O pulso é registrado durante o enchimento e esvaziamento do *cuff*. Foram feitos pelo menos 10 registros com intervalo de 2 minutos entre eles. O menor e o maior valores obtidos para cada animal foram descartados e foi tirada a média dos outros valores. Como critério de inclusão, pelo menos 6 das 10 medidas deveriam ser obtidas.



**Figura 13:** Pletismógrafo (Funbec Pletismograph 300) (A) e detalhe do *cuff* utilizado(B).

#### 4.5 MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS DO CORAÇÃO E RINS

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados com sobre-dose intravenosa de pentobarbital sódico e tiveram rins e o coração removidos. Os átrios foram separados e os ventrículos pesados, colocados para secar em estufa a 37°C por 24 horas e novamente pesados. A membrana renal foi removida, os rins foram pesados, secos por 24 horas a 37°C em estufa e novamente pesados. O peso dos órgãos utilizado nas análises foi o obtido após o período de 24 horas na estufa, portanto o peso seco e foi dado em miligramas (mg).

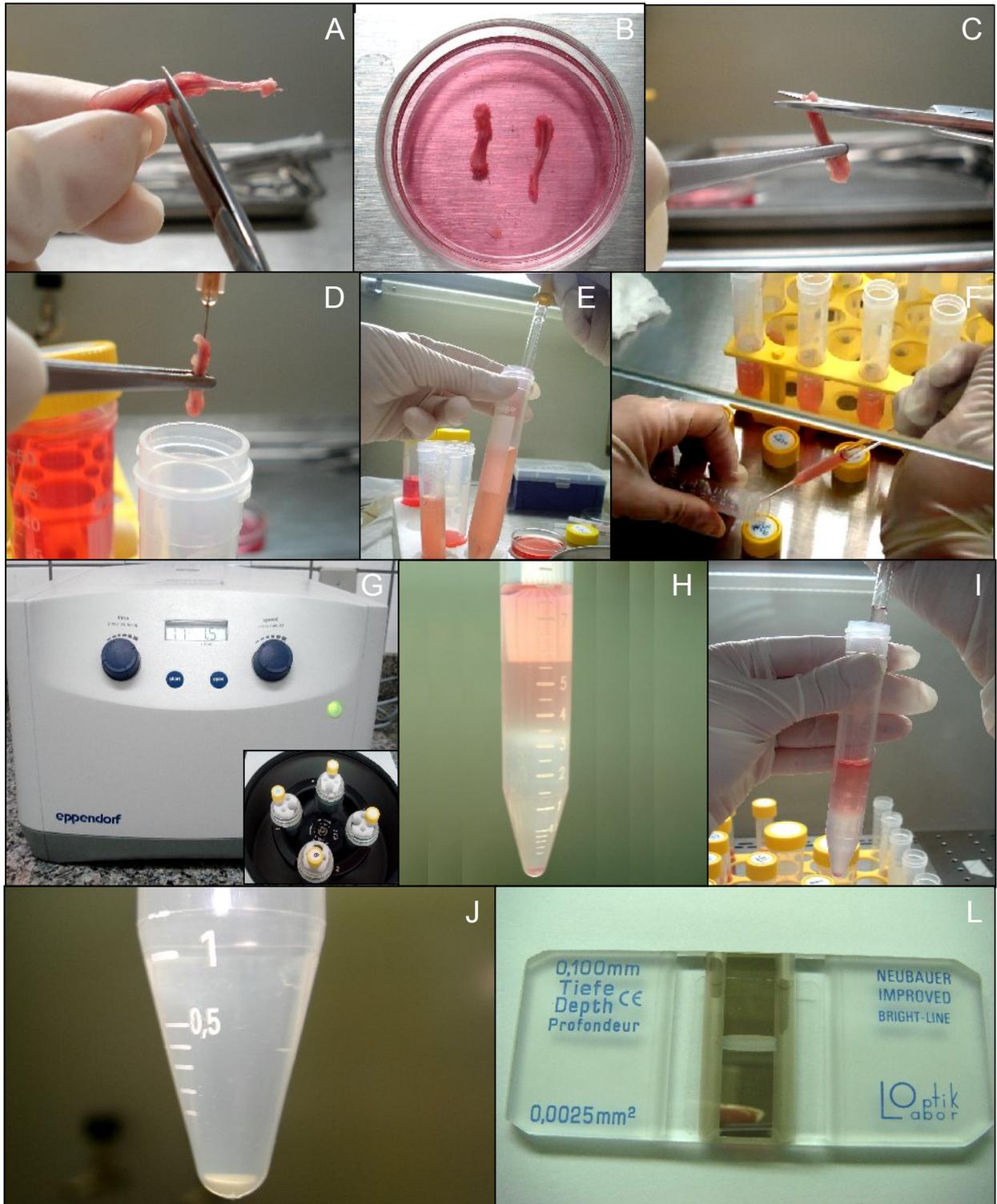
#### 4.6 DOSAGEM PLASMÁTICA DE ANGIOTENSINA II

Para dosagem de angiotensina II no plasma, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. O sangue foi coletado, na presença do anticoagulante EDTA, por punção cardíaca enquanto o coração do animal ainda estava batendo, utilizando agulha de 26-gauge e seringa de 1ml. O sangue foi transferido para um microtubo onde foi adicionado o *cocktail* de inibidores de protease (Sigma). A amostra foi homogeneizada, centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, o plasma transferido para um criotubo e armazenado em nitrogênio líquido até o momento da dosagem

por cromatografia líquida de alta performance (HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*), realizada no Laboratório de Rim e Hormônios da Universidade de São Paulo (UNIFESP).

#### 4.7 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA

Os animais foram eutanasiados com halotano 4% 14 dias após a cirurgia para indução da hipertensão e levados para capela de fluxo laminar. Foi realizada a assepsia, os fêmures e as tíbias (Figura 14A) dos animais foram removidos, assim como o excesso de músculo e tecido conjuntivo ao redor dos ossos (Figura 14B). As epífises foram cortadas (Figura 14C) para exposição do canal medular. Para remoção da medula óssea, uma agulha de 26-gauge foi inserida na cavidade medular e delicadamente foi feito um *flush* (Figura 14D) utilizando meio de cultura DMEM (Meio Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco DMEM; Sigma). A suspensão de medula óssea foi homogeneizada (Figura 14E) e centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, as células diluídas em DMEM e lentamente colocadas sob o gradiente de densidade (Figura 14F) (Histopaque 1083; Sigma). O material foi novamente centrifugado a 1500 rpm por 30 minutos utilizando uma centrífuga de rotor móvel (Eppendorf: Centrifuge 5702-Figura 14G) que permite a separação da fração de células mononucleares. Após a centrifugação observam-se duas fases (Figura 14H): uma fase aquosa composta pelo meio de cultura e uma fase orgânica que consiste no gradiente de densidade, granulócitos e hemácias precipitados. Entre estas duas fases, ou seja, na interface, se encontra um anel esbranquiçado formado pelas células mononucleares que consistem em células indiferenciadas, monócitos e linfócitos. O anel de células mononucleares, localizado na interface, foi cuidadosamente coletado (Figura 14I) e transferido para um tubo cônico. Em seguida, as células mononucleares foram lavadas com 5 ml de solução salina tamponada (PBS – Phosphate Buffered Saline; Gibco) e centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos (Figura 14J). Este procedimento foi realizado duas vezes. Por fim, as células foram ressuspensas em 1 ml de DMEM e uma alíquota separada para contagem em câmara de Neubauer (Figura 14L).



**Figura 14:** Isolamento de células mononucleares da medula óssea de camundongos: retirada do fêmur e da tíbia (A), ossos isolados em meio de cultura (B), corte das epífises (C), *flush* para remover a medula óssea (D), homogeneização do lavado da medula (E), CMN colocadas sobre Histopaque (F), centrifuga e no detalhe o rotor *swing bucket* (G), fração de células mononucleares (H), coleta do anel de células mononucleares (I), células mononucleares lavadas (J), câmara de Neubauer (L).

#### 4.8 CONTAGEM DE CÉLULAS MONONUCLEARES EM CÂMARA DE NEUBAUER

Para determinação do número de células obtido, foi realizada uma diluição 1:10 (v/v) da suspensão celular obtida na coleta em PBS (Gibco). Em seguida, uma alíquota desta solução foi diluída 1:2 (v/v) em solução de Turck (ácido acético 2% com azul de metileno), e uma alíquota desta última solução foi novamente diluída 1:2 (v/v) em solução de azul de Tripano 0,4%. A solução (células/Turck/Tripano) foi homogeneizada e colocada em um lado da câmara de Neubauer (Figura 15A) para contagem com auxílio do microscópio óptico (Leica DMLS – Figura 15B) no aumento de 40X (Figura 15C). As células são contadas nos quatro quadrantes externos da câmara (Figura 15D) seguindo sempre a mesma direção (Figura 15E) e usando o esquema do “L” para que a mesma célula não seja contada duas vezes. Portanto, as células que se encontravam sobre as linhas de baixo e da direita não eram contadas (Figura 15F). A equação usada para determinar o número de células por mililitro foi:

$$QC = FD \times 10^4 \times 1ml \times \frac{N^\circ \text{ de células}}{4}, \text{ onde:}$$

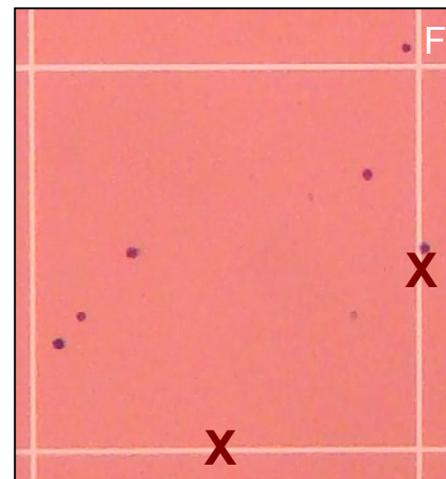
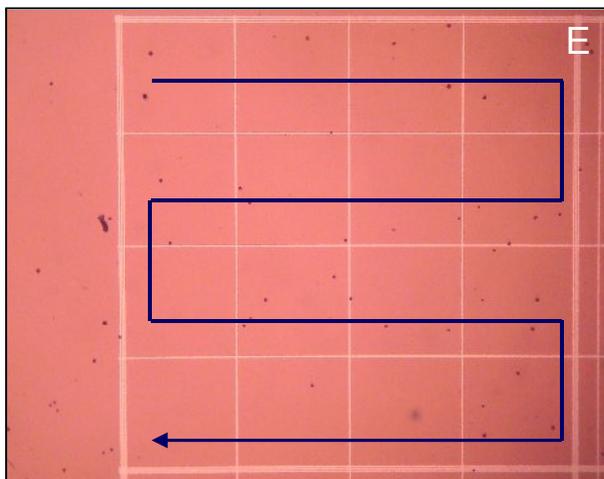
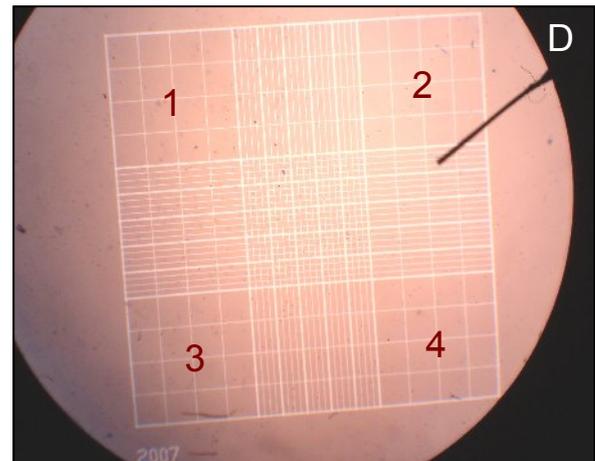
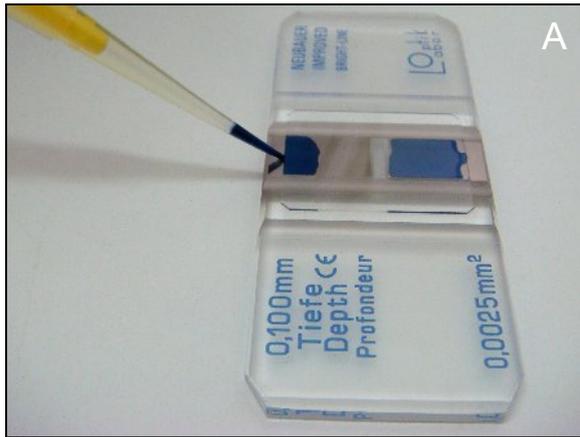
FD → Fator de diluição (40x)

$10^4$  → Fator de correção da câmara de Neubauer

1ml → Volume da amostra

$\frac{N^\circ \text{ de células}}{4}$  → Média do número de células contadas

É importante ressaltar que a contagem foi realizada sempre pelo mesmo observador de forma cega, sendo que foram realizadas três contagens independentes e foi tirada a média destas três contagens.



**Figura 15:** Contagem celular em câmara de Neubauer. Suspensão celular misturada com os corantes sendo adicionada a câmara (A), a análise foi feita em microscópio óptico (B), no aumento de 40X (C), as células foram contadas nos quatro quadrantes externos da câmara, indicados pelos números (D), detalhe de um quadrante mostrando o sentido da contagem (E) e as células que se encontravam sobre as linhas marcadas com o x não eram contadas (F).

#### 4.9 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o método de exclusão do corante azul de Tripano durante a contagem celular em câmara de Neubauer. Por este método, as células mortas se coram de azul pois sua membrana é permeável ao corante, enquanto que a membrana das células vivas não é permeável ao azul de Tripano. Desta forma, ao visualizar as células ao microscópio observamos que as células mortas são azuis e as vivas transparentes. Para calcular o percentual de células viáveis, a média de células vivas foi dividida pela média total de células (vivas e mortas) contadas na câmara de Neubauer. O valor obtido foi multiplicado por 100 e, portanto, a viabilidade é dada em porcentagem.

$$\text{Viabilidade} = \frac{\text{Células Vivas}}{\text{Células Mortas}} \times 100$$

É importante destacar que a viabilidade celular deve ser maior que 80%, mostrando que o procedimento utilizado para o isolamento das células mononucleares da medula óssea foi executado de maneira correta.

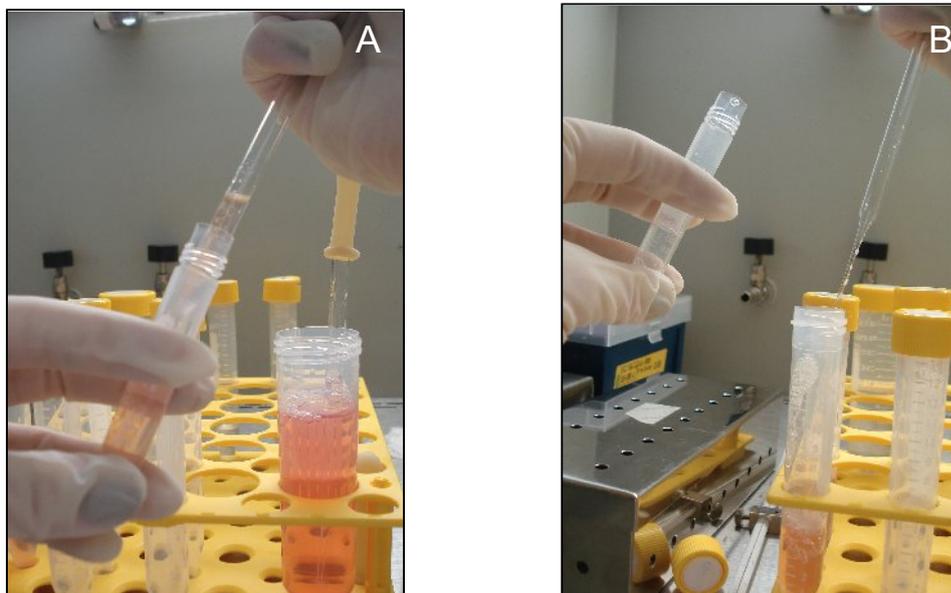
#### 4.10 CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

##### 4.10.1 Congelamento

Depois de contar as células, elas foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Em seguida as células foram ressuspensas em 95% de soro fetal bovino (SFB; Gibco) e 5% de dimetil sulfoxido (DMSO; Gibco). Foi colocado 1ml de células em cada criotubo, estes foram levados à temperatura de -20°C por 24 horas e, em seguida, as células foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) até o momento em que foram analisadas.

#### 4.10.2 Descongelamento

As células foram retiradas do nitrogênio líquido e colocadas por alguns segundos em banho-maria a 37°C até que começassem a descongelar. Em seguida, foi adicionado ao criotubo DMEM (Gibco) acrescido de 20% de SFB (Gibco) aquecido (37°C) para que as células descongelassem completamente (Figura 16A). As células foram transferidas para um tubo cônico (Figura 16B) onde foi adicionado aproximadamente 5 ml de DMEM + 20% de SFB aquecido e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 1ml de DMEM+20% de SFB, contadas em câmara de Neubauer e alíquotas utilizadas para realização dos protocolos de citometria de fluxo e genotoxicidade.

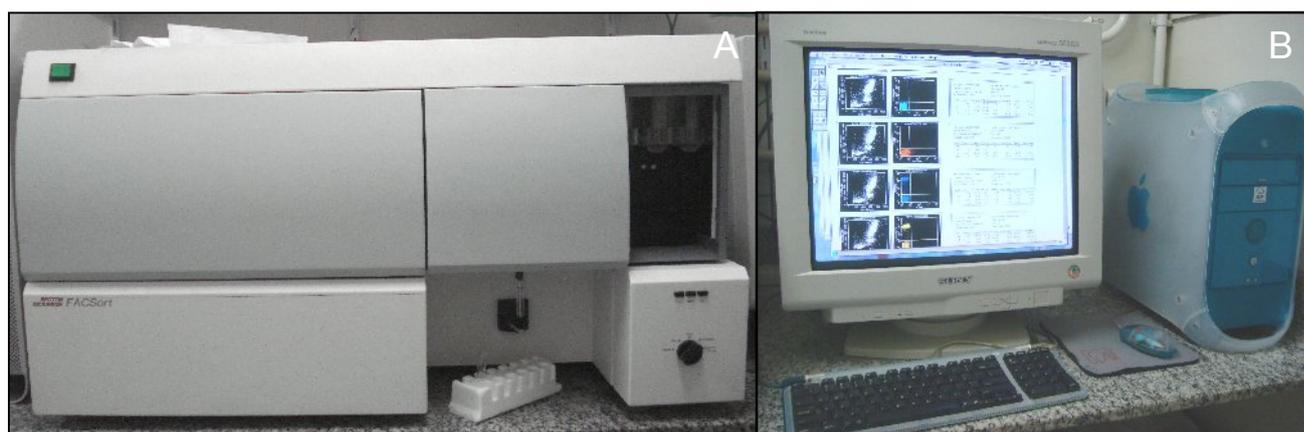


**Figura 16:** Descongelamento de CMN de medula óssea. DMEM + 20% SFB sendo adicionado ao criotubo com as células (A) que foram posteriormente transferidas para um tubo cônico (B).

#### 4.11 ANÁLISE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após o descongelamento e contagem das células mononucleares da medula óssea, uma alíquota foi retirada para verificar o número de células tronco hematopoiéticas e

mesenquimais na medula óssea dos camundongos. Para isso, foi realizada a análise imunofenotípica por citometria de fluxo da amostra utilizando o aparelho FACSsort (Figura 17A) (Bencton Dickinson, EUA) equipado com o laser de íon argônio (488nm) e detectores de dispersão para tamanho (FSC – *forward scatter*) e granulosidade interna (SSC – *side scatter*), detectores de emissão de fluorescência e dois anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos diferentes. As análises foram realizadas no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo. A determinação das características celulares era obtida através da emissão de fluorescência, por um filtro óptico, e eram representadas por um gráfico de dispersão de pontos ou *dot plot*. Um total de 10000 eventos foi verificado pelo aparelho. Para análise dos dados foi utilizado o programa de computador *Cell Quest* (Figura 17B) (Bencton Dickinson, EUA).



**Figura 17:** Citômetro de fluxo FACSsort (A), software *Cell Quest* (B).

#### **4.11.1 Identificação das linhagens de células tronco hematopoiéticas e mesenquimais**

Para identificação e quantificação das populações celulares, foram utilizados dois anticorpos monoclonais capazes de identificar diferentes antígenos na superfície celular. O anticorpo anti-CD117 (BD/Pharmingen), expresso na superfície dos dois tipos celulares, pois é um marcador de multipotencialidade, foi conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC), e o anticorpo anti-CD90.2 (BD/Pharmingen), fortemente expresso na superfície das células tronco mesenquimais e pouco expresso pelas células tronco hematopoiéticas, foi conjugado a ficoeritrina (PE). A

análise era feita no material após descongelamento. Anticorpos anti-rat IgG<sub>2a</sub>-PE (BD/Pharmingen) e IgG<sub>2b</sub>-FITC (BD/Pharmingen), chamados de isotipo, foram usados como controles-negativos.

Dois tubos de citometria de fluxo foram separados e identificados para cada animal. No primeiro foi colocado 5µl de cada anticorpo controle, portanto, 5µl de IgG<sub>2a</sub>-PE e 5µl do controle IgG<sub>2b</sub>-FITC e no segundo as mesmas quantidades dos anticorpos marcadores, ou seja, 5µl de CD117-FITC e 5µl de CD90.2-PE. Em seguida, foi adicionado aproximadamente 10<sup>6</sup> células em cada tubo. As amostras foram incubadas no escuro por 20 minutos. Decorrido este tempo, as células foram lavadas em PBS para remover o excesso de anticorpo e, em seguida, fixadas por 30 minutos (MACS-FACS Fix, BD/Pharmingen). Por fim, foi feita a aquisição no FACSsort e a análise dos dados pelo programa *Cell Quest* (Bencton Dickinson).

#### 4.12 ENSAIO DO COMETA

Para realização do Ensaio do Cometa foi seguido o protocolo de Olive & Banáth (2006) o qual é baseado no trabalho original de Singh *et al.*, (1988), e inclui modificações adicionais (Anderson *et al.*, 1994). As etapas do protocolo estão representadas na figura 18.

##### 4.12.1 Preparo das lâminas

Lâminas de vidro com extremidade fosca receberam, primeiramente, um filme de agarose de ponto de fusão normal (*Normal Melting Point Agarose* - NMA; Gibco) 1% a 60°C, secaram a temperatura ambiente por 24 horas e foram armazenadas à 4°C. Para o preparo das lâminas contendo o material biológico, aproximadamente 2x10<sup>4</sup> células foram misturadas a 100 µl de agarose de baixo ponto de fusão 1% (*Low Melting Point Agarose* - LMA; Gibco) dissolvida em PBS (Gibco) pH 7,4 e mantida a 37°C em banho-maria. A mistura contendo agarose de baixo ponto de fusão (LMA) e a suspensão celular foi espalhada sobre as lâminas previamente gelatinizadas. As

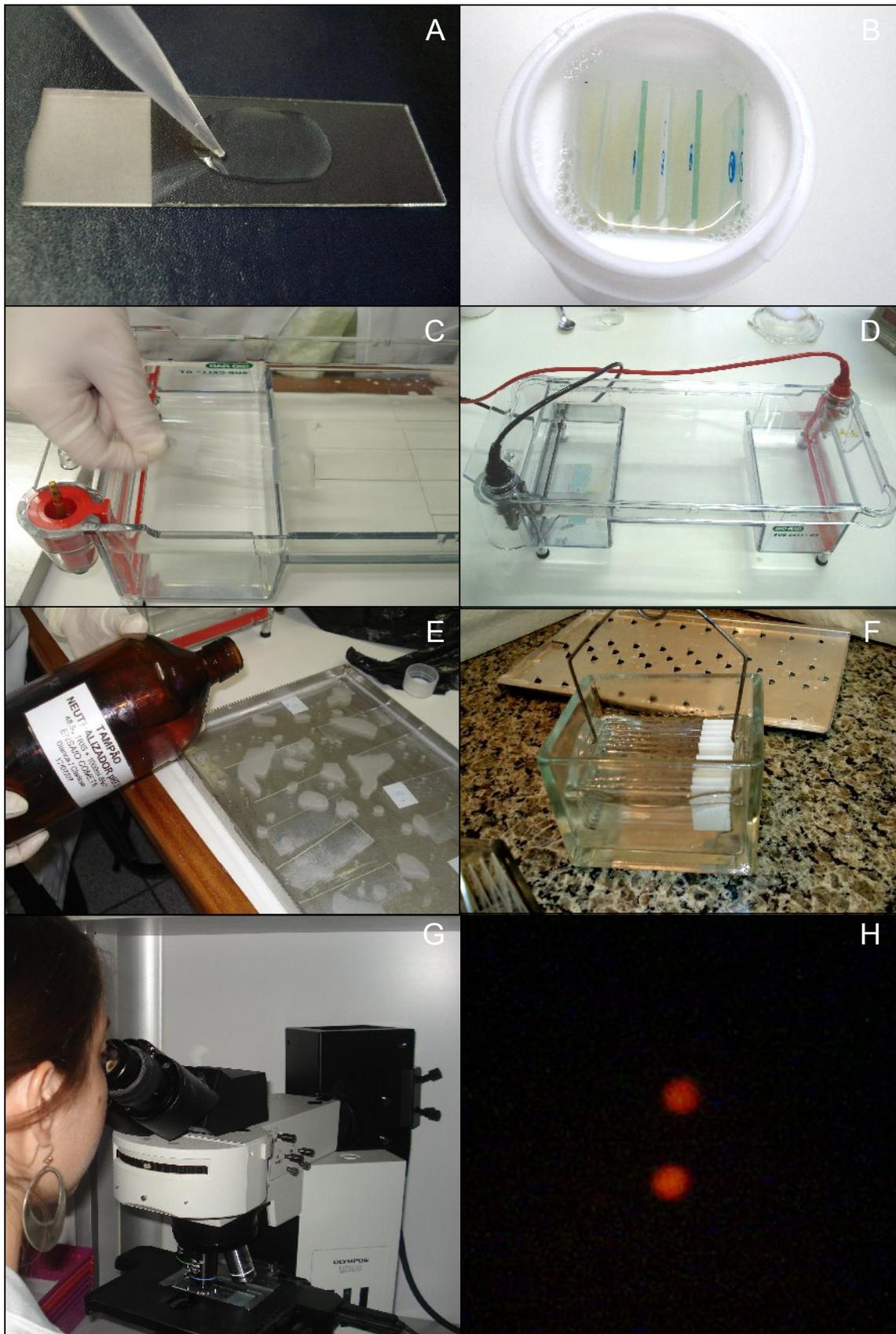
lâminas foram cobertas com lamínulas e resfriadas à 4°C por aproximadamente 20 minutos até a polimerização da agarose.

#### **4.12.2 Lise, desenovelamento e eletroforese**

Após a gelatinização, as lamínulas foram gentilmente removidas e as lâminas imediatamente submersas em solução de lise gelada e recém-preparada, contendo 2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1% Triton X-100 e 10% DMSO, estes dois últimos acrescentados no momento do uso. A lise se deu por 1 hora, à temperatura de 4°C e protegida da luz, para rompimento das membranas celulares. Após a lise, as lâminas foram levadas para cuba eletroforética (Biorad), cobertas com tampão de eletroforese alcalino (pH>13) gelado (4°C), preparado com 300mM NaOH e 1mM EDTA, onde permaneceram em repouso no escuro por 20 minutos para desnaturação das proteínas histonas permitindo o desenovelamento do DNA. A eletroforese foi realizada à 4°C por 30 min, à 25V e 300mA (1,6 V/cm). Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com tampão pH 7,5 (TRIS-HCl, 0,4M) e subsequentemente lavadas em água destilada em três ciclos de 5 minutos cada, secas ao ar e fixadas em álcool metílico 100% por 10 minutos.

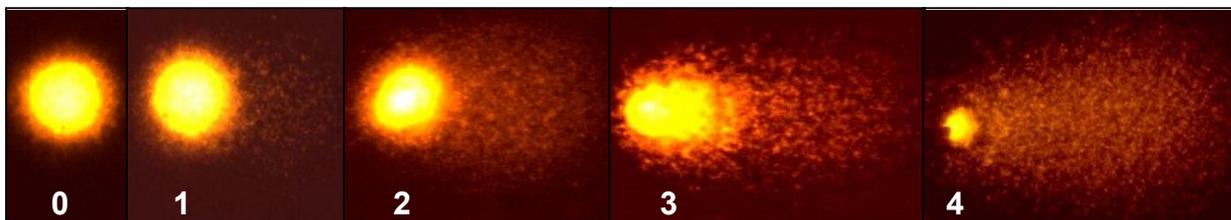
#### **4.12.3 Análise citológica**

As lâminas foram coradas no momento da análise com 100µL de brometo de etídio (20µg/ml,) e cobertas com lamínulas. As células foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX60) em objetiva de 40X, com filtro de excitação de 420-490 nm e filtro de barreira de 520nm. Foram visualmente classificadas 200 células, sendo 100 por lâmina, ou seja, duas lâminas por animal, classificando-se os cometas em 5 classes de acordo com o tamanho da cauda: nível 0 – células não danificadas que não apresentam cauda; nível 1 – células com cauda menor que o diâmetro do nucleóide; nível 2 – células com cauda de tamanho entre uma e duas vezes o diâmetro do nucleóide; nível 3 – células com cauda maior que duas vezes o diâmetro do nucleóide; nível 4 – células apoptóticas que apresentam nucleóide totalmente fragmentado (Figura 19).



**Figura 18:** Ensaio do cometa: Preparo da lâmina (A), etapa de lise (B), etapa de desenrolamento (C), eletroforese (D), neutralização (E), fixação (F), análise dos dados em

microscópio de fluorescência (G), detalhe de dois nucleóides corados com brometo de etídio (H).



**Figura 19:** Classificação dos níveis de fragmentação do DNA detectados pelo ensaio do cometa. Modificado de: [www.cometassay.com](http://www.cometassay.com)

#### 4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM. A análise estatística dos dados foi feita por meio de Teste *t* de Student para medidas independentes. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ .

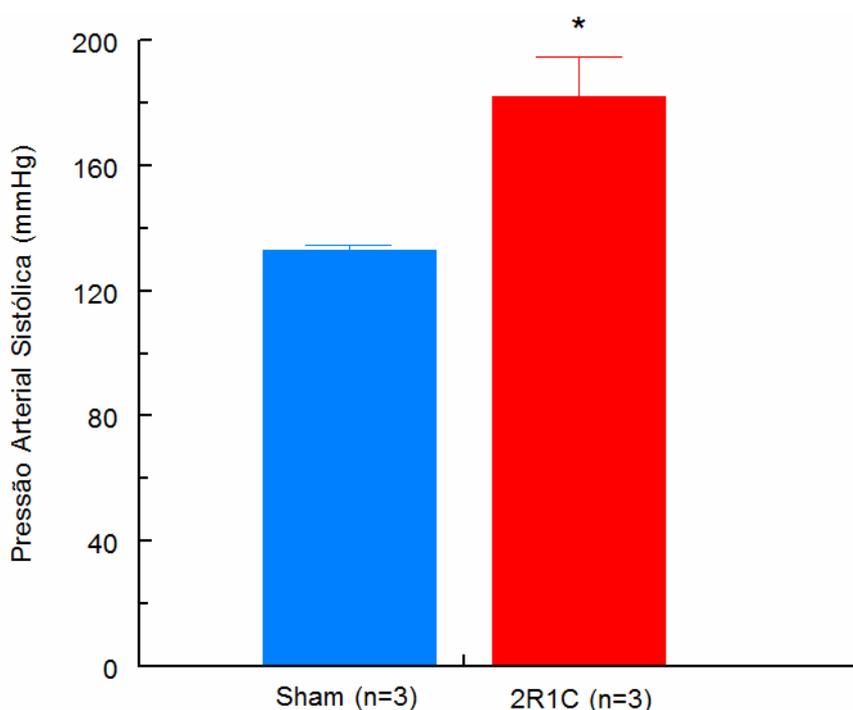


# **RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS

### 5.1 MEDIDAS HEMODINÂMICAS

As medidas hemodinâmicas foram realizadas, com os animais acordados, 14 dias após a cirurgia de indução da hipertensão renovascular 2R1C. Como demonstrado pela figura 20, verificamos que conforme o esperado os animais 2R1C apresentaram pressão arterial sistólica significativamente maior que os animais Sham (Sham:  $133 \pm 1,5$  vs 2R1C:  $182 \pm 12,5$  mmHg), mostrando que a cirurgia realizada para indução da hipertensão renovascular foi bem sucedida.



**Figura 20:** Valores basais da pressão arterial sistólica (PAS) de camundongos Sham (n=3) e 2R1C (n=3) após 14 dias de estenose da artéria renal esquerda. Os valores indicam média±EPM. \*  $p < 0,05$  vs. Sham (Teste *t* de Student).

## 5.2 PESO CORPORAL E PESO SECO CARDÍACO E RENAL

Como mostrado na tabela 1, o peso corporal dos animais Sham ( $26,1 \pm 0,2$  g) foi estatisticamente maior que dos animais 2R1C ( $23,7 \pm 0,2$  g). Com relação ao peso seco dos órgãos, não houve diferença significativa no peso ventricular entre os grupos (Sham:  $30,4 \pm 0,4$  vs. 2R1C:  $30,5 \pm 0,8$  mg). O peso do rim direito dos animais 2R1C ( $57,5 \pm 1,0$  mg) foi significativamente maior que dos animais Sham ( $50,6 \pm 0,8$  mg) indicando hipertrofia, enquanto que o rim esquerdo foi significativamente menor indicando hipotrofia (Sham:  $44,2 \pm 1,0$  vs. 2R1C:  $32,6 \pm 1,0$  mg). Também é possível observar que ocorre diminuição significativa no tamanho e, conseqüentemente, no peso do rim esquerdo ( $32,6 \pm 1,0$  mg) dos animais em relação ao rim direito ( $57,5 \pm 1,0$  mg), confirmando a hipertrofia renal direita que ocorre no modelo.

Dados não publicados obtidos em nosso Laboratório (Nogueira BV) demonstram que ocorre aumento significativo de aproximadamente quatro vezes nos níveis plasmáticos do octapeptídeo angiotensina II nos animais com hipertensão 2R1C ( $119,4 \pm 16,2$  pmol/ml) quando comparado com os animais do grupo Sham ( $29,4 \pm 9,1$  pmol/ml), como pode ser observado na tabela 1.

**Tabela 1:** Peso corporal, peso seco cardíaco e renal e dosagem plasmática de angiotensina II plasmática 14 dias após a cirurgia.

Parâmetros	Sham (n=12)	2R1C (n=11)
Peso Corporal (g)	$26,1 \pm 0,2$	$23,7 \pm 0,2^*$
Peso do Coração (mg)	$30,4 \pm 0,4$	$30,5 \pm 0,8$
Peso Rim Esquerdo (mg)	$44,2 \pm 1,0$	$32,6 \pm 1,0^*$
Peso Rim Direito (mg)	$50,6 \pm 0,8^\#$	$57,5 \pm 1,0^\#$
Angiotensina II plasmática (pmol/ml)	$29,4 \pm 9,1$	$119,4 \pm 16,2^*$

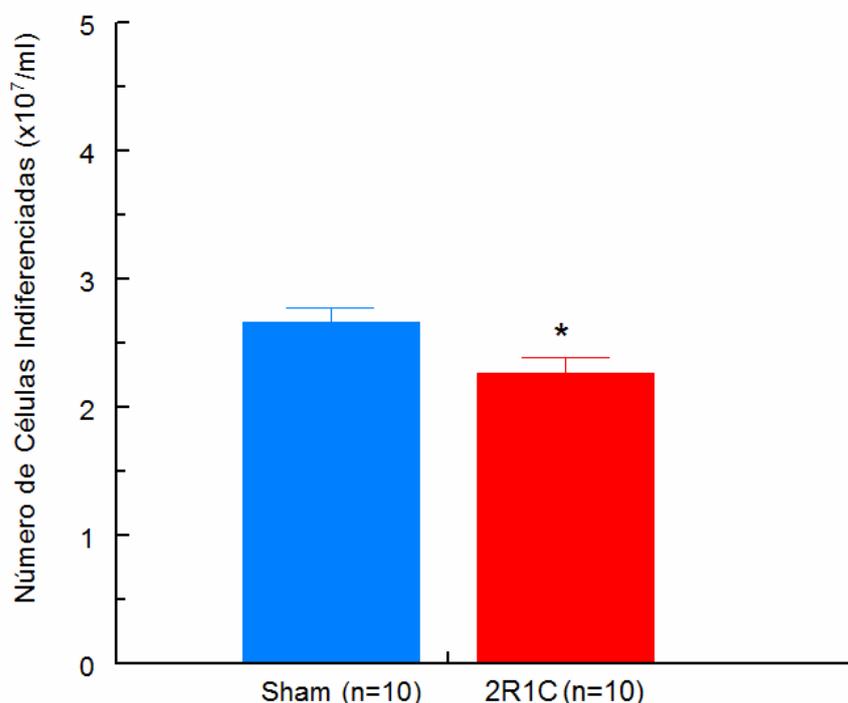
Nota: Valores expressos como média $\pm$ EPM. \*  $p < 0,05$  vs. Sham e #  $p < 0,05$  vs. rim esquerdo. (Teste *t* de Student)

### 5.3 AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES EM CÂMARA DE NEUBAUER

As células mononucleares foram quantificadas em câmara de Neubauer imediatamente após serem isoladas da medula óssea dos animais.

#### 5.3.1 Quantificação de células indiferenciadas da medula óssea

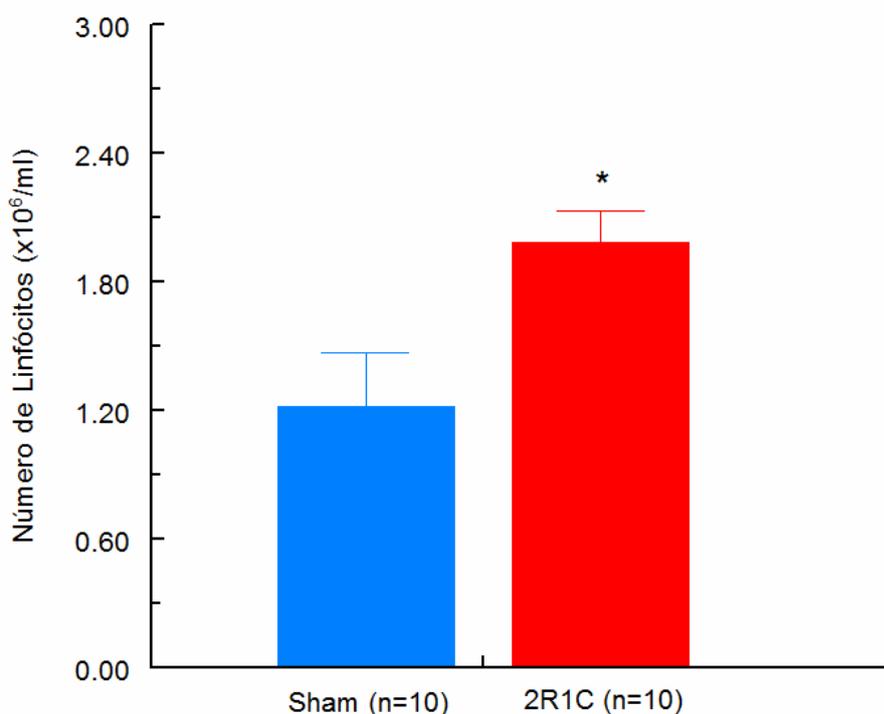
A contagem celular realizada em câmara de Neubauer mostrou que os animais hipertensos apresentaram diminuição significativa no número de células indiferenciadas da medula óssea ( $2,26 \pm 0,13$  células/ml  $\times 10^7$ ) quando comparado com os animais do grupo Sham ( $2,66 \pm 0,11$  células/ml  $\times 10^7$ ), como mostrado na figura 21.



**Figura 21:** Número de células mononucleares indiferenciadas isoladas da medula óssea de camundongos Sham (n=10) e 2R1C (n=10) quantificadas em câmara de Neubauer. Os valores indicam média $\pm$ EPM. \*  $p < 0,05$  vs. Sham (Teste *t* de Student).

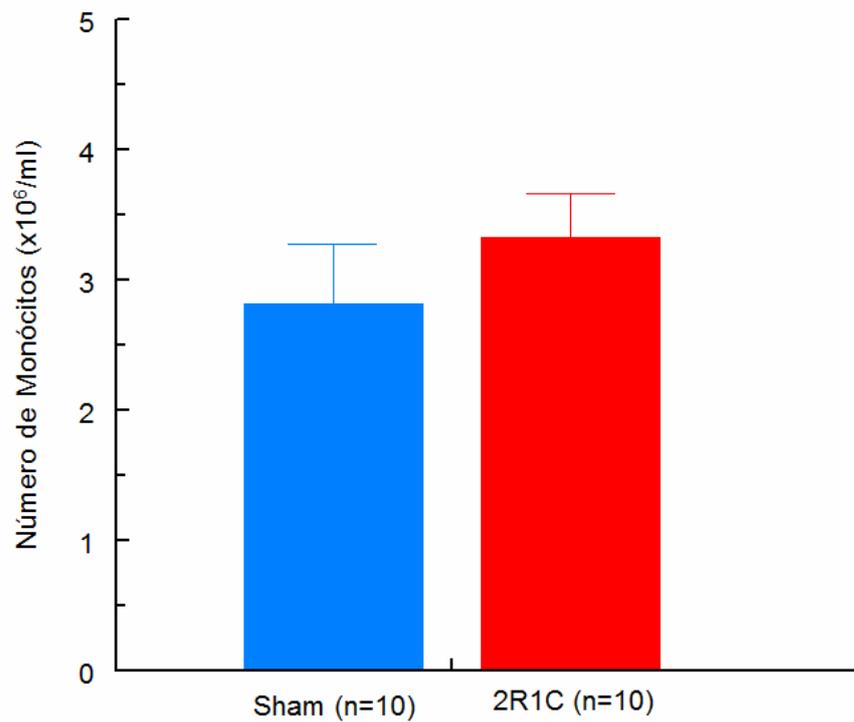
### 5.3.2 Quantificação de células inflamatórias da medula óssea

Como mostrado no gráfico de barras da figura 22, a contagem de linfócitos mostrou que os animais hipertensos ( $1,98 \pm 0,15$  células/ml  $\times 10^6$ ) apresentaram aumento significativo no número de linfócitos da medula óssea quando comparado com os animais do grupo Sham ( $1,22 \pm 0,25$  células/ml  $\times 10^6$ ).



**Figura 22:** Número de linfócitos isolados da medula óssea de camundongos Sham (n=10) e 2R1C (n=10) quantificados em câmara de Neubauer. Os valores indicam média $\pm$ EPM. \* $p < 0,05$  vs. Sham (Teste *t* de Student).

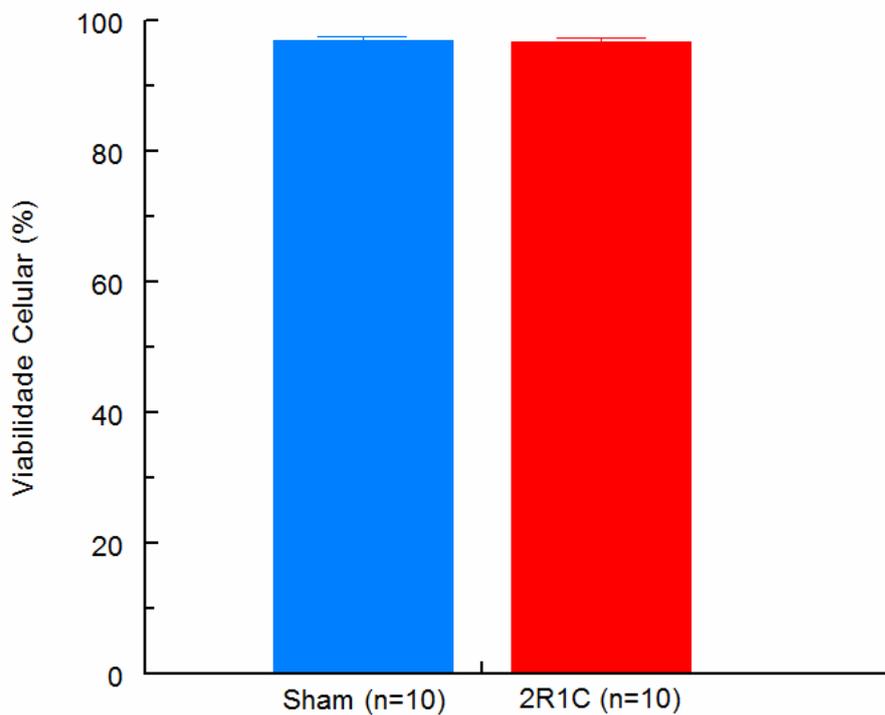
Entretanto, não observamos diferença significativa no número de monócitos da medula óssea entre os grupos (Sham:  $2,81 \pm 0,46$  vs. 2R1C:  $3,32 \pm 0,34$  células/ml  $\times 10^6$ ), como pode ser observado na figura 23.



**Figura 23:** Número de monócitos isolados da medula óssea de camundongos Sham (n=10) e 2R1C (n=10) quantificados em câmara de Neubauer. Os valores indicam média±EPM.

### 5.3.3 Análise da viabilidade celular

A viabilidade das células indiferenciadas da medula óssea foi analisada pelo método de exclusão do corante azul de tripano durante a contagem celular em câmara de Neubauer, imediatamente após seu isolamento. Como mostrado na figura 24, a análise dos dados obtidos não revelou diferença significativa na viabilidade celular entre os grupos (Sham: 97%±0,54 vs. 2R1C: 96%±0,54).



**Figura 24:** Viabilidade das células indiferenciadas isoladas da medula óssea de camundongos Sham (n=10) e 2R1C (n=10) quantificados em câmara de Neubauer. Os valores indicam média±EPM.

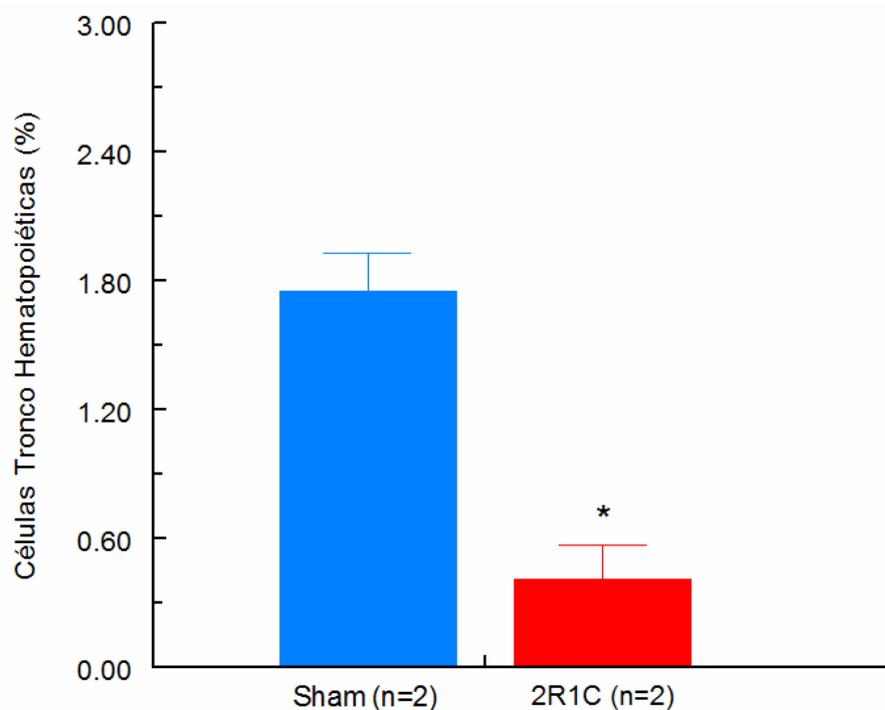
#### 5.4 ANÁLISE DAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS TRONCO DA MEDULA ÓSSEA POR IMUNOFENOTIPAGEM

Para análise do perfil antigênico, as células mononucleares foram cuidadosamente descongeladas, contadas e uma alíquota de aproximadamente  $10^6$  células marcada com os anticorpos previamente citados.

##### 5.4.1 Quantificação de células tronco hematopoiéticas

Como pode ser observado na figura 25, ocorreu uma diminuição significativa no número de células tronco hematopoiéticas da medula óssea dos animais com hipertensão renovascular 2R1C ( $0,41 \pm 0,16\%$ ) quando comparado com os animais

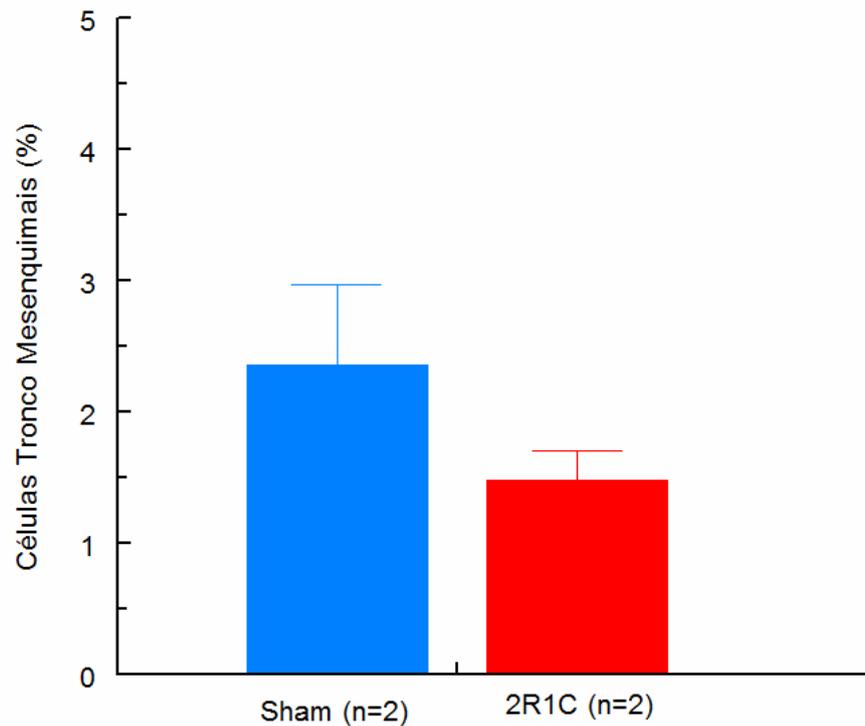
Sham ( $1,75 \pm 0,18\%$ ). É importante destacar que os animais do grupo 2R1C apresentam diminuição de aproximadamente quatro vezes no número de células tronco hematopoiéticas quando comparados com os animais do grupo Sham.



**Figura 25:** Número de células tronco hematopoiéticas da medula óssea de camundongos normotensos (Sham: n=2) e hipertensos (2R1C: n=2) quantificadas por citometria de fluxo. Os valores indicam média $\pm$ EPM. \*  $p < 0,05$  vs. Sham (Teste  $t$  de Student).

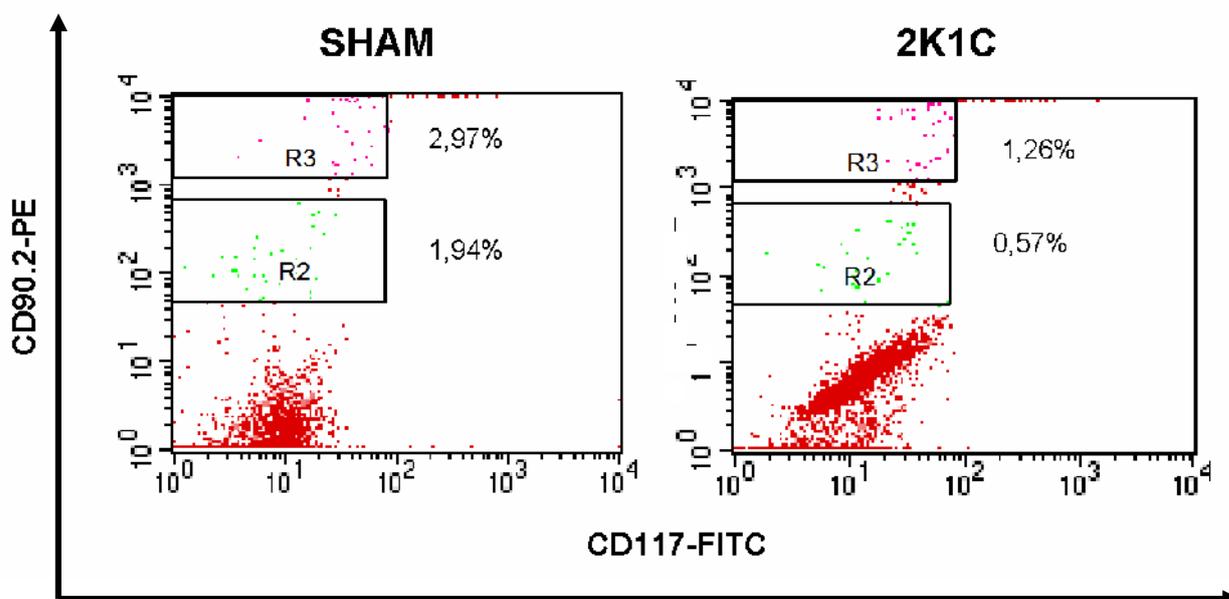
#### 5.4.2 Quantificação de células tronco mesenquimais

Como pode ser observado no gráfico de barras da figura 26, não há diferença no número de células tronco mesenquimais da medula óssea entre os grupos (Sham:  $2,36 \pm 0,61$  vs. 2R1C:  $1,48 \pm 0,22$  %).



**Figura 26:** Número de células tronco mesenquimais da medula óssea de camundongos normotensos (Sham: n=2) e hipertensos (2R1C: n=2) quantificadas por citometria de fluxo. Os valores indicam média±EPM.

A figura 27 mostra um gráfico típico da quantificação de células tronco obtido por citometria de fluxo. A população de células tronco hematopoiéticas está representada em R2 e a população de células tronco mesenquimais, em R3. lembrando que as células tronco hematopoiéticas apresentam baixa expressão do antígeno de superfície CD90.2, portanto são CD90.2<sup>low</sup>, enquanto que as células tronco mesenquimais apresentam alta expressão do mesmo antígeno e por isso são ditas CD90.2<sup>high</sup>.



**Figura 27:** Gráfico típico das populações de células tronco hematopoiética (R2) e mesenquimal (R3) da medula óssea de camundongos Sham e 2R1C quantificadas por citometria de fluxo.

### 5.5 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE FRAGMENTAÇÃO NO DNA PELO ENSAIO DO COMETA

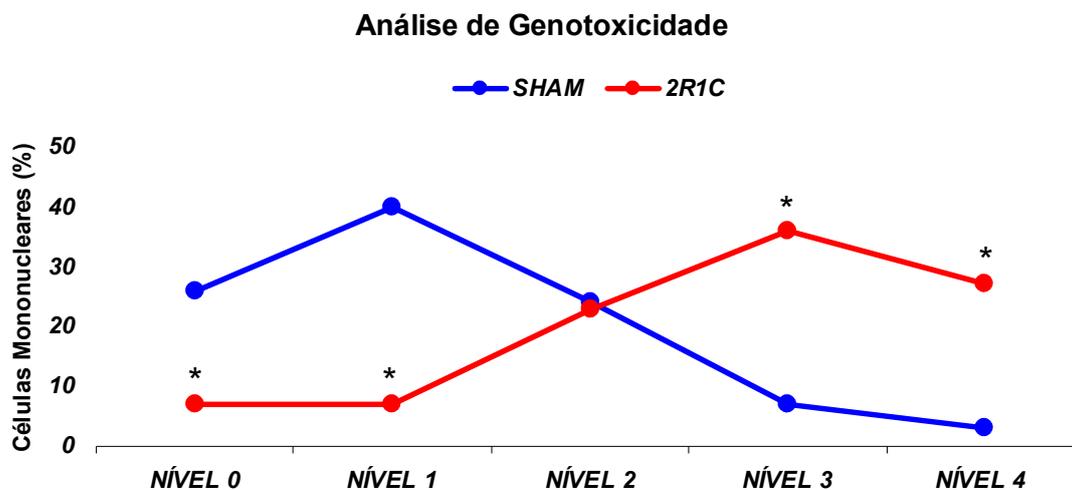
As células mononucleares da medula óssea foram cuidadosamente descongeladas, contadas e uma alíquota de  $2 \times 10^4$  células foi utilizada no ensaio. Nossos resultados mostram que as células mononucleares da medula óssea dos camundongos com hipertensão renovascular 2R1C apresentam níveis mais elevados de fragmentação no DNA quando comparadas com os animais Sham.

Na tabela 2 podemos observar que, como o esperado, os animais de ambos os grupos possuem células com todos os níveis de fragmentação no DNA. Entretanto, as células mononucleares da medula óssea dos animais do grupo 2R1C apresentam principalmente DNA alta e severamente fragmentado (níveis 3 e 4), enquanto que o DNA das células dos animais Sham se encontra principalmente nada ou levemente fragmentado. Estes resultados estão plotados no gráfico da figura 28.

Tabela 2: Níveis de fragmentação no DNA das células mononucleares da medula óssea de camundongos 14 dias após a cirurgia.

Análise de Genotoxicidade					
Níveis	0	1	2	3	4
Sham (n=7)	26±0,03%	40±0,01%	24±0,01%	7±0,01%	3±0,01%
2R1C (n=4)	7±0,04%*	7±0,01%*	23±0,03%	36±0,03%*	27±0,06%*

Nota: Valores expressos como média±EPM. \* p<0,05 vs. Sham (Teste t de Student).



**Figura 28:** Análise de genotoxicidade mostrando os diferentes níveis de fragmentação no DNA das células mononucleares da medula óssea de camundongos do grupo Sham (n=7) e 2R1C (n=4). Os valores indicam média±EPM. \* p<0,05 vs. Sham (Teste t de Student).

**DISCUSSÃO**

## 6 DISCUSSÃO

Estudos clínicos e epidemiológicos mostram que a hipertensão arterial é a doença cardiovascular mais comum, acometendo aproximadamente 72 milhões de pessoas só nos Estados Unidos, sendo que um em cada três americanos adultos é hipertenso (Sarafidis & Bakris, 2006). No Brasil, em valores percentuais, esse dados epidemiológicos são similares. Além disso, é considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de outras doenças cardiovasculares como, por exemplo, aterosclerose, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e insuficiência renal (Collins *et al.*, 1990; MacMahon *et al.*, 1990; Perry *et al.*, 1995).

A hipertensão renovascular é a forma mais comum de hipertensão secundária e apresenta patogênese complexa. Na década de 30, Goldblatt e colaboradores (1934) desenvolveram o modelo de hipertensão renovascular 2R1C em cães. Posteriormente, Miksche e colaboradores (1970) estabeleceram o modelo 2R1C no rato. Em 1997, Wiesel e colaboradores desenvolveram o modelo de hipertensão renovascular 2R1C em camundongos e verificaram que o modelo murino compartilha as mesmas características dos modelos desenvolvidos em outras espécies de animais, como cães e ratos. Portanto, no modelo de hipertensão renovascular 2R1C ocorre a diminuição crônica do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, da pressão de perfusão renal que leva a elevação dos níveis plasmáticos de angiotensina II que, por sua vez, acarreta em um aumento sustentado da pressão arterial, neste caso, nos animais clipados (Wiesel *et al.*, 1997). Nossos resultados mostraram que a colocação de um clipe de aço de abertura fixa (0,12mm) ao redor da artéria renal esquerda de camundongos levou ao aumento da pressão arterial destes animais 14 dias após a cirurgia. Estes dados confirmam anteriores observados tanto em ratos (Melaragno & Fink, 1995) como em camundongos (Hilgers *et al.*, 2000; Peotta *et al.*, 2007; Gava *et al.*, 2008).

O mecanismo pelo qual o SRA induz a hipertensão tem sido geralmente atribuído ao efeito vasoconstritor direto da angiotensina II, que é o efector chave deste sistema. A interação da angiotensina II com receptores AT<sub>1</sub> encontrados nos vasos, leva a elevação da pressão arterial devido à potencialização da ação vasoconstritora deste peptídeo. A angiotensina II também pode elevar a pressão arterial pela

potencialização do sistema envolvendo noradrenalina nas terminações nervosas simpáticas que inervam os vasos (Guyton & Hall, 2006) e pelo aumento da secreção do vasoconstritor endotelina I. Estas ações em conjunto levam ao aumento da resistência vascular periférica (Heeneman *et al.*, 1997). Além disso, a angiotensina II aumenta a produção de hormônio antidiurético pela glândula pituitária e atua no córtex adrenal estimulando a secreção de aldosterona. Estes hormônios em conjunto causam o aumento da reabsorção de sódio e da retenção de água no rim, levando ao aumento do volume sanguíneo. O aumento da resistência vascular periférica e da volemia elevam a pressão arterial neste modelo.

Sabe-se que no modelo de hipertensão renovascular 2R1C ocorre elevação dos níveis de renina plasmática (Wiesel *et al.*, 1997), e conseqüentemente de angiotensina II, especialmente durante os primeiros 14 dias de estenose da artéria renal esquerda (Hiyoshi *et al.*, 2005). Dosagens deste peptídeo obtidas de um trabalho não publicado realizado em nosso Laboratório, mostram que neste modelo os níveis plasmáticos de angiotensina II são 4 vezes maiores nos animais 2R1C quando comparados com seus controles Sham (Nogueira BV: dados não publicados) confirmando que o modelo 2R1C em camundongos apresenta elevação dos níveis plasmáticos de angiotensina II 14 dias após a obstrução parcial da artéria renal.

No estudo realizado por Wiesel e colaboradores (1997) eles observaram que a abertura do clipe é essencial para que os animais desenvolvam hipertensão sem infarto renal o que é diferente do que ocorre em ratos, nos quais se pode alcançar diferentes níveis de hipertensão dependendo da abertura do clipe utilizado. Os pesquisadores demonstraram que camundongos estudados 14 dias após a implantação do clipe ao redor da artéria renal e com peso aproximado de 23g, cliques com 0,12mm de abertura eram capazes de induzir hipertensão sem causar infarto renal significativo, enquanto que cliques com 0,11mm de abertura causavam aproximadamente 40% de infarto renal e cliques com 0,13mm não eram capazes de obstruir mais de 70% do fluxo sanguíneo renal e, desta forma, não induziam hipertensão.

Foi observado neste estudo que os animais Sham apresentaram peso corporal superior ao dos animais 2R1C, apesar deste dado não ter sido observado em outros

estudos (Arruda *et al.*, 2005; Peotta *et al.*, 2007; Gava *et al.*, 2008). A determinação do peso corporal dos animais do grupo 2R1C foi mais rigorosa uma vez que ficou estabelecido que o peso destes animais, devido a abertura do clipe (0,12mm), deveria variar entre 23 e 24,5 g. No entanto, reconhecemos que o ideal seria propositalmente selecionar controles com peso semelhante aos do grupo 2R1C.

Em outro estudo desenvolvido em nosso Laboratório não foi observada correlação entre o peso corporal e o número de células tronco da medula de óssea de camundongos com 2, 6 e 18 meses (Tonini CL: dados não publicados). Portanto, a diferença de peso observada entre os grupos não influencia nos parâmetros celulares avaliados no presente estudo.

Hipertrofia ventricular é o aumento da massa ventricular tipicamente caracterizado pelo aumento do tamanho dos cardiomiócitos juntamente com a fibrose cardíaca, isto é, a formação excedente de tecido conectivo. Sabe-se que a hipertensão sustentada leva o miocárdio a se adaptar ao aumento de carga e esta resposta adaptativa consiste no aumento da síntese protéica que resulta, eventualmente, no aumento da massa cardíaca (Frohlich *et al.*, 1992). Além disso, a angiotensina II também participa do desenvolvimento de hipertrofia cardiovascular ao estimular a síntese de determinadas proteínas nas células cardíacas (Sadoshima & Izumo, 1993). A hipertrofia ventricular estimula a transcrição de genes que codificam proteínas que normalmente não são expressas no coração de indivíduos adultos, por exemplo, ANP e isoformas fetais de proteínas contráteis como a  $\alpha$ -actina esquelética (Izumo *et al.*, 1988). No presente estudo, não observamos hipertrofia ventricular nos animais hipertensos confirmando dados anteriores de nosso Laboratório recentemente publicados (Gava *et al.*, 2008). Entretanto em outros estudos também realizados em nosso Laboratório foi observada hipertrofia cardíaca em camundongos 28 dias após a indução da hipertensão renovascular 2R1C (Peotta *et al.*, 2007). Nossos dados sugerem que a ausência de hipertrofia ventricular nos animais do grupo 2R1C se deve ao período de hipertensão, indicando que 14 dias não são suficientes para estimular a produção de proteínas cardíacas utilizadas como marcadores de hipertrofia ventricular, como a  $\alpha$ -actina, e desta forma, causar aumento do peso ventricular.

Com relação ao peso renal, como esperado, as medidas de peso seco dos rins mostraram que nos animais submetidos à estenose de artéria renal ocorre diminuição da massa do rim esquerdo (clipado), que se hipotrofia e, simultaneamente, aumento da massa do rim direito (não-clipado) que se hipertrofia. Este resultado indica que o rim contra-lateral (não-clipado) é capaz de prevenir que ocorra aumento do volume sanguíneo e, conseqüentemente, elevações adicionais na pressão arterial dos animais. Outros trabalhos desenvolvidos em nosso Laboratório corroboram os dados observados no presente estudo sugerindo que o clipe com 0,12mm de abertura obstrui mais de 70% do fluxo sanguíneo renal levando à hipertensão renovascular e, conseqüentemente, sucesso do procedimento cirúrgico (Peotta *et al.*, 2007; Gava *et al.*, 2008).

Portanto, o desenvolvimento do modelo 2R1C está padronizado em nosso Laboratório e mostra elevação da pressão arterial, hipertrofia renal direita e hipotrofia renal esquerda, além de elevação dos níveis plasmáticos de angiotensina II (Arruda *et al.*, 2005; Peotta *et al.*, 2007; Nogueira *et al.*, 2007; Gava *et al.*, 2008).

Inicialmente, o SRA era considerado apenas um sistema endócrino, tendo como efetor chave a angiotensina II, capaz de exercer suas ações em órgãos-alvo distantes do local de sua produção principalmente através de seus receptores do tipo AT<sub>1</sub>. Entretanto, a rápida expansão de técnicas de biologia molecular possibilitou a determinação da distribuição tecidual de seus componentes, o que levou ao conceito de sistemas renina angiotensina teciduais, sendo descritos em órgãos como coração (Lindpaintner *et al.*, 1987), tecido vascular (Campbell & Habener, 1987; Dzau, 1988; Samani *et al.*, 1991), rim (Campbell & Habener, 1987; Rohrwasser *et al.*, 1999) e medula óssea (Campbell & Habener, 1987; Haznedaroglu *et al.*, 1996). É importante lembrar que a angiotensina II não é apenas um hormônio vasoativo que regula a pressão arterial e a homeostase eletrolítica através de seus efeitos hemodinâmicos, mas também atua na regulação do crescimento celular e na produção e liberação de fatores pró-inflamatórios, imunomoduladores e oxidantes de forma não-hemodinâmica (Wolf, 1998; Luft, 2001; Ruiz-Ortega *et al.*, 2001).

Um estudo realizado em 2003 mostrou uma forte correlação negativa entre o número de células progenitoras endoteliais circulantes e o escore de risco para desenvolver

doenças cardiovasculares (Hill *et al.*, 2003). De forma semelhante, existem estudos mostrando que células progenitoras endoteliais (Teper *et al.*, 2002) e células mononucleares (Heeschen *et al.*, 2004) obtidas da medula óssea de pacientes com doença isquêmica coronariana crônica (Heeschen *et al.*, 2004) ou doenças metabólicas (Teper *et al.*, 2002) apresentam diminuição na sua capacidade de formação de unidades de colônia, na migração celular e na capacidade angiogênica.

Estudo recentemente publicado demonstrou que em camundongos com hipertensão renovascular 2R1C ocorre aumento da mobilização de células progenitoras endoteliais, sendo que 7 dias após a implantação do clipe é observado pico de elevação deste tipo celular circulante no sangue e na medula óssea. No entanto, o número de células progenitoras endoteliais volta ao normal 21 dias após a cirurgia de implantação do clipe ao redor da artéria renal para induzir a hipertensão renovascular 2R1C (Salguero *et al.*, 2008).

Entretanto, até o momento não existem estudos que demonstrem como se comportam as células tronco, hematopoiéticas e mesenquimais, da medula óssea de humanos e animais hipertensos. Portanto, este estudo é pioneiro ao investigar os efeitos da hipertensão renovascular 2R1C sobre o número de células tronco da medula óssea de camundongos *in vivo*.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o SRA local é ativado em situações patofisiológicas e a síntese local de angiotensina II parece contribuir para as alterações funcionais e morfológicas (Hirsch *et al.*, 1990) observadas na medula óssea. A contagem de células realizada em câmara de Neubauer, mostrou diminuição significativa no número de células indiferenciadas e simultâneo aumento no número de linfócitos na medula óssea dos animais do grupo 2R1C quando comparado com os animais Sham. Não observamos aumento significativo no número de monócitos devido a grande variação intra-grupo deste parâmetro é grande e, portanto, o tamanho da amostra não foi suficiente para determinar esta diferença. A quantificação celular por citometria de fluxo, mostrou diminuição do número de células tronco hematopoiéticas nos animais 2R1C quando comparado com os animais Sham corroborando os dados obtidos na câmara de Neubauer. Apesar do pequeno tamanho amostral (n=2), acreditamos que estes dados são consistentes e

se manterão quando a amostra for aumentada. Além disso, o número de células tronco mesenquimais não foi diferente entre os grupos, mas acreditamos que isto tenha ocorrido devido ao tamanho amostral (n=2) que quando for aumentado tornará a diminuição observada significativa.

Uma das prováveis explicações para a diminuição do número de células tronco hematopoiéticas nos camundongos com hipertensão renovascular é a atividade pró-inflamatória da angiotensina II que leva ao aumento exacerbado da taxa de divisão assimétrica destas células tronco. Estudos mostram que a hipertensão arterial causa injúria endotelial e esta injúria inicia o processo inflamatório (Ismail *et al.*, 1999). Existem evidências de que a angiotensina II participa da resposta inflamatória pela ativação direta de células inflamatórias ou pela produção de citocinas que contribuem para o recrutamento destas células até órgãos-alvo da hipertensão participando, assim, da resposta inflamatória (Ruiz-Ortega *et al.*, 2001; Schmidit-Ott *et al.*, 2000; Rueckschloss *et al.*, 2002; Pueyo *et al.*, 2000). Citocinas são peptídeos liberados por células do tecido inflamado, que através de mecanismos autócrinos e parácrinos estimulam o recrutamento de leucócitos para o sítio de inflamação nos tecidos.

O constante recrutamento de leucócitos é crítico para a patogênese da resposta inflamatória, sendo que um pré-requisito importante para esta resposta é o tráfego de leucócitos da medula para o sangue e deste para o sítio de inflamação. Estudos mostram que a angiotensina II induz a adesão de monócitos e neutrófilos às células endoteliais (Kim *et al.*, 1996; Krejcy *et al.*, 1996), sendo que a infusão deste peptídeo vasoativo em ratos, além de hipertensão, causa grande infiltração de monócitos na aorta dos animais mostrando que a angiotensina II participa do recrutamento e da adesão celular de monócitos (Capers *et al.*, 1997; Tummala *et al.*, 1999; Ruiz-Ortega *et al.*, 2001b; Suzuki *et al.*, 2000). Além disso, existem evidências de que a angiotensina II, via receptores AT<sub>1</sub>, causa a proliferação de linfócitos no baço de camundongos (Nataraj *et al.*, 1999) além de possuir ação quimiotática sobre este tipo celular (Weinstock & Kassab, 1986). Sabe-se que a ativação do SRA local leva ao recrutamento de linfócitos T e macrófagos para o rim (Rodriguez-Iturbe *et al.*, 2001). Além disso, estudos mostram que ratos clipados apresentam maior número de células inflamatórias nos compartimentos cardíacos que os controles, sugerindo

que linfócitos e monócitos migram do sangue para o tecido cardíaco onde permanecem durante todas as fases da hipertensão renovascular (Nicoletti *et al.*, 1996). Portanto, existem evidências que suportam a idéia de que o SRA contribui para a patogênese de doenças inflamatórias (Stigant *et al.*, 2000) uma vez que sua ativação desempenha papel essencial na suscetibilidade da resposta imune celular local, visto que as células inflamatórias migram e infiltram nos tecidos-alvo aumentando a produção de citocinas e fatores de crescimento.

A hematopoiese é um processo de constante renovação celular necessário para a diferenciação das células progenitoras em hemácias, plaquetas, monócitos, granulócitos e linfócitos. Sabendo que a medula óssea é o órgão responsável pela hematopoiese, é evidente que o aumento do recrutamento de leucócitos para sítios de inflamação em órgãos-alvo da hipertensão leve ao aumento de sua produção. Para que ocorra aumento da produção de leucócitos, é necessária maior diferenciação de células tronco hematopoiéticas que, para isso, sofrem divisão assimétrica originando duas células, sendo que uma seguirá na rota de diferenciação até que se forme um leucócito maduro, enquanto a outra permanecerá no nicho como uma células tronco geneticamente idêntica a célula mãe que a originou. Os dados obtidos neste estudo pela contagem, em câmara de Neubauer, de células mononucleares de medula óssea mostraram que nos animais hipertensos ocorre aumento significativo no número de linfócitos, sendo que o número de monócitos não se mostrou diferente entre os grupos. É importante lembrar que a fração de células mononucleares da medula óssea é formada apenas por células indiferenciadas, células tronco e progenitoras, e por linfócitos e monócitos. Acreditamos que o número de monócitos não tenha sido diferente entre os grupos com hipertensão renovascular 2R1C e Sham devido ao próprio tamanho desta população celular que é consideravelmente menor que a população linfóide e, desta forma, apesar de haver uma tendência de aumento no número desta população celular, isto não se demonstrou significativo.

Os resultados de quantificação celular obtidos no presente estudo sugerem que a angiotensina II ativa células inflamatórias que secretam mediadores pro-inflamatórios que ajudam no recrutamento de novas células mononucleares levando a uma resposta inflamatória adicional que contribui para diminuição do número de células

tronco hematopoiéticas na medula óssea dos camundongos hipertensos ao aumentar a taxa de divisão assimétrica destas células.

Além do aumento da resposta inflamatória, estudos experimentais e clínicos mostram que a angiotensina II, via receptores AT<sub>1</sub>, é um importante fator de crescimento para vários tipos celulares e também estimula a produção do hormônio eritropoietina (Griendling *et al.*, 1997; Daugherty *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 2001; Candido *et al.*, 2002; Hayek *et al.*, 2002; Candido *et al.*, 2004; da Cunha *et al.*, 2005; Cassis *et al.*, 2007). A eritropoietina é uma glicoproteína produzida principalmente nas células renais de indivíduos adultos, que regula a produção de eritrócitos (Ebert & Bunn, 1999; Fandrey, 2004) e, conseqüentemente, o hematócrito (Donnelly, 2001) uma vez que é um potente estimulador humoral da eritropoiese, o que foi confirmado pelo uso de inibidores da ECA ou antagonistas seletivos de receptores AT<sub>1</sub> em estudos que verificaram que estas drogas eram capazes de diminuir o hematócrito levando, em alguns casos, à anemia (Griendling *et al.*, 1997; Cole *et al.*, 2000; Candido *et al.*, 2004; da Cunha *et al.*, 2005; Cassis *et al.*, 2007).

Eritropoiese é o processo fisiológico de produção e renovação da massa de células vermelhas. Este processo é influenciado por hormônios, receptores e fatores de transcrição (Krantz, 1991), sendo que o principal hormônio que regula a eritropoiese é a eritropoietina. A interação entre a eritropoietina e seus receptores leva a estimulação da mitogenicidade das células progenitoras eritróides e, conseqüentemente, à sua diferenciação. Demonstrou-se que a angiotensina II estimula a diferenciação das células progenitoras eritróides (Mrug *et al.*, 1997) de maneira indireta devido ao aumento da eritropoietina sérica, o que favorece a eritropoiese.

A angiotensina II pode agir diretamente sobre o compartimento de células tronco hematopoiéticas promovendo a entrada destas células no ciclo celular e, conseqüentemente, sua diferenciação (Rousseau-Plasse *et al.*, 1998; Chisi *et al.*, 1999; Chisi *et al.*, 2000). Estudos mostram que a infusão exógena de angiotensina II aumenta o hematócrito de camundongos ECA-KO anêmicos (Cole *et al.*, 2000), mostrando que o SRA desempenha papel importante na eritropoiese. Além disso, verificou-se que o uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina ou de

antagonistas seletivos de receptores AT<sub>1</sub> causa diminuição do hematócrito devido a diminuição da produção de eritrócitos (Gaston *et al.*, 1994; Perazella *et al.*, 1995; Julian *et al.*, 1998).

Especula-se que a eritropoiese, assim como o aumento da pressão, induzidos pelo SRA são positivamente mediados, mas diferentemente regulados pelos receptores AT<sub>1</sub> (Kato *et al.*, 2005) encontrados nas células progenitoras eritróides. Experimentos recentes sugerem dois mecanismos plausíveis para a modulação da eritropoiese pelo RAS: o aumento da produção de eritropoietina (Daugherty *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 2001; Candido *et al.*, 2002; Hayek *et al.*, 2002; Candido *et al.*, 2004; da Cunha *et al.*, 2005; Cassis *et al.*, 2007) ou estimulação direta das células progenitoras eritróides via receptores AT<sub>1</sub> (Dostal & Baker, 1999; De Melo & Danser, 2000; Bataller *et al.*, 2003). Desta forma, a angiotensina II pode estimular a diferenciação das células eritróides (Mrug *et al.*, 1997).

Portanto, a angiotensina II possui múltiplos efeitos hematopoiéticos, estimulando a diferenciação eritróide, mielóide e linfóide. Estudos sugerem que existe um SRA intrínseco, localmente ativo na medula óssea que afeta o crescimento, a produção, a proliferação e a diferenciação das células da medula óssea sobre condições normais e patológicas (Haznedaroğlu *et al.*, 1996). A demonstração da existência de um SRA local na medula óssea pode desempenhar papel importante na produção de células hematopoiéticas em condições fisiológicas e patológicas.

Estudos mostram que ocorre aumento da ativação do SRA na medula óssea, uma vez que esta possui um SRA funcionante (Haznedaroğlu *et al.*, 1996) e que, além disso, o rim recruta células pela ativação do RAS presente no próprio órgão (Rodriguez-Iturbe *et al.*, 2001). Portanto, em situações patofisiológicas, ocorre ativação dos RAS locais.

A medula óssea é um órgão altamente especializado e complexo, sendo o principal tecido hematopoieticamente ativo em adultos. O sistema hematopoiético da medula óssea é caracterizado pela renovação, proliferação, diferenciação, comprometimento e sobrevivência de células hematopoiéticas. Os fatores que regulam estes eventos são pouco compreendidos. Entretanto, sabe-se que a hematopoiese é regulada pela

combinação de efeitos de citocinas, fatores de crescimento, receptores de superfície específicos e sinais liberados pelo micro-ambiente medular (Clark & Kamen, 1987; Haznedaroglu & Ozturk, 2003). Como a medula óssea é um local de crescimento e renovação celular excessivos, estudos sugerem a existência de um SRA intrínseco e localmente ativo na medula óssea capaz de afetar o crescimento, produção, proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas em situações fisiológicas e patológicas (Haznedaroglu *et al.*, 1996). Corroborando esta hipótese, estudos mostram a existência de receptores AT<sub>1</sub> nas células mononucleares e estromais da medula óssea (Shibata *et al.*, 1994) e que células inflamatórias sanguíneas possuem ECA (Dzau *et al.*, 2001a). Além disso, a ECA regula fisiologicamente a concentração plasmática do tetrapeptídeo AcSDKP, um regulador negativo da proliferação de células tronco hematopoiéticas (Rousseau *et al.*, 1995).

Sabe-se que a angiotensina II pode modificar funções celulares não relacionadas com fatores hemodinâmicos, como a proliferação e o recrutamento de vários tipos celulares diferentes. Acredita-se que a angiotensina II, além de células hematopoiéticas, estimule também a produção de células dos tecidos conectivos e de suporte, como células musculares esqueléticas, osteócitos, condrócitos e fibroblastos (Ferrari *et al.*, 1998; Pittenger *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005). A quantificação de células tronco mesenquimais obtida por citometria de fluxo no presente estudo, não mostrou diferença significativa nos valores deste parâmetro entre os grupos, o que pode ser explicado pelo tamanho da amostra (n=2). Esperamos que aumentando a amostra, esta tendência de diminuição observada se torne estatisticamente significativa.

Estudos mostram que células tronco mesenquimais apresentam RNA mensageiro para receptores AT<sub>1</sub> (Matsushita *et al.*, 2006) sugerindo que a angiotensina II seja capaz de influenciar a proliferação e a diferenciação destas células. Entretanto, os sinais responsáveis pela diferenciação e migração das células tronco mesenquimais são pouco entendidos. Acreditamos que o RAS local na medula óssea estimule a diferenciação desta população celular e, além disso, células no rim clipado dos camundongos hipertensos liberem fatores quimiotáticos que levam a migração de células tronco e especializadas para o local com o objetivo de minimizar os efeitos maléficos da hipertensão.

Além do número de células, a viabilidade celular também é um parâmetro muito importante no estudo das células tronco. No presente trabalho foi de particular importância visto que este foi o primeiro estudo utilizando a técnica de isolamento de células mononucleares de medula óssea desenvolvido em nosso Laboratório. Portanto, a análise de viabilidade celular realizada na câmara de Neubauer, revelou que as células indiferenciadas da medula óssea de camundongos hipertensos e controles apresentam-se viáveis, demonstrando que os métodos utilizados para o seu isolamento foram eficientemente executados.

Surgem cada vez mais evidências de que os efeitos não-hemodinâmicos da angiotensina II são indispensáveis para os danos causados pela hipertensão aos órgãos-alvo (Wolf, 1998; Luft, 2001; Ruiz-Ortega *et al.*, 2001b). Há alguns anos determinou-se que a angiotensina II, além da vasoconstrição, aumenta o estresse oxidativo (Higashi *et al.*, 2002; Dzau, 2001; Griendling *et al.*, 1994; Rajagopalan *et al.*, 1996; Mollnau *et al.*, 2002) através da estimulação da produção de espécies reativas de oxigênio (Zafari *et al.*, 1998).

Em condições patofisiológicas, além do SRA sistêmico, que produz a angiotensina II plasmática, ocorre ativação dos RAS locais e, conseqüentemente, a produção deste peptídeo em diferentes órgãos. A existência de um SRA local funcionante na medula óssea já foi descrito (Haznedaroglu *et al.*, 1996) e acredita-se que este somente seja ativado em condições patológicas. Em condições fisiológicas normais, a medula óssea se comporta como um nicho celular e bioquímico bastante peculiar, onde se acredita haver tensão de oxigênio extremamente baixa (Chow *et al.*, 2001; Swartz & Dunn, 2003) fazendo deste um órgão quase anaeróbico e, assim, limitando sua produção de espécies reativas de oxigênio. Entretanto, não existem estudos que demonstrem como a medula óssea se comporta em condições patofisiológicas em que ocorre aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, especialmente em modelos onde existe elevação dos níveis de angiotensina. Portanto, este estudo é pioneiro em avaliar, de forma indireta, os efeitos da angiotensina II, e conseqüentemente do estresse oxidativo, sobre as células mononucleares da medula óssea de camundongos.

A angiotensina II pode induzir o estresse oxidativo através da ativação da ativação de receptores AT<sub>1</sub>, levando a indução da enzima NAD(P)H oxidase que aumenta a síntese intracelular de espécies reativas de oxigênio (Gyllenhammar, 1987; Griendling *et al.*, 1994; Rajagopalan *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 1998). Estudos mostram que indivíduos hipertensos apresentam quantidade excessiva de espécies reativas de oxigênio e redução da atividade anti-oxidante em células da parede vascular (Orie *et al.*, 1999) e em células sanguíneas (Yasunari *et al.*, 2002; Redon *et al.*, 2003). Laursen e colaboradores ao infundir angiotensina II em ratos, mostraram aumento da produção de ânion superóxido (Laursen *et al.*, 1997). Contudo, o nível de angiotensina II neste modelo é aparentemente maior que em outras formas de hipertensão experimental e clínica, mas Reckelhoff e Romero mostraram que mesmo doses pequenas de angiotensina II são capazes de causar estresse oxidativo *in vivo* (Reckelhoff & Romero, 2003).

Existem evidências de que o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio está associado à indução de dano genômico (Imlay & Linn, 1988). Um estudo recente mostra que linfócitos de sangue periférico de indivíduos acometidos por doença arterial coronariana apresentam danos no DNA causados pelo aumento do estresse oxidativo que ocorre nesta doença (Mahmoudi *et al.*, 2006). De forma semelhante, Folkman *et al.* observaram a presença de danos no DNA de hepatócitos de camundongos ateroscleróticos (Folkmann *et al.*, 2007). Entretanto, não existem estudos que avaliem o dano genético causado às células de medula óssea de indivíduos acometidos por doenças cardiovasculares.

O ensaio do cometa é uma técnica de detecção de danos no DNA de células individuais amplamente utilizado em outras áreas de pesquisa. Em fisiologia cardiovascular, poucos trabalhos relacionam os danos causados ao DNA com as doenças cardiovasculares, sendo que não existem relatos dos efeitos da hipertensão sobre o DNA de células medulares *in vivo*. Este estudo é o primeiro a avaliar os efeitos da hipertensão renovascular 2R1C e, indiretamente, do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio sobre o DNA das células mononucleares de medula óssea.

Os resultados obtidos pelo ensaio do cometa, sugerem que nos camundongos do grupo 2R1C deve ter ocorrido aumento da produção de espécies reativas de oxigênio levando ao estresse oxidativo, evidenciado pelo aumento da fragmentação no DNA das células mononucleares da medula óssea destes animais quando comparado com os animais do grupo Sham.

Sabendo que a ativação do SRA tecidual (Dzau, 2001; Lerman *et al.*, 2001; Higashi *et al.*, 2002) assim como aumento da atividade sistêmica do SRA, aumentam a produção vascular de espécies reativas de oxigênio através da ativação de enzimas oxidantes presentes na membrana de diversos tipos celulares entre eles as células mononucleares (Griendling *et al.*, 1994; Rajagopalan *et al.*, 1996; Dzau, 2001; Higashi *et al.*, 2002; Mollnau *et al.*, 2002), é provável que os danos observados no DNA das células mononucleares de medula óssea dos camundongos hipertensos tenham sido causados pela interação de espécies reativas de oxigênio com a molécula de DNA.

Está claro que a ativação dos receptores AT<sub>1</sub> pela angiotensina II induz a NAD(P)H oxidase levando a produção de ânions superóxido (Griendling *et al.*, 1994) que é rapidamente reduzido a peróxido de hidrogênio espontaneamente ou pela ação da enzima superóxido dismutase (Ursini *et al.*, 1995; Kirkman *et al.*, 1999; de Haan *et al.*, 2004). O peróxido de hidrogênio, apesar de não ser considerado um potente radical livre, é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA (Anderson, 2000). Estudos mostram que as principais espécies reativas de oxigênio envolvidas na patogênese de diferentes formas de hipertensão são o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (Zafari *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002).

A superprodução de espécies reativas de oxigênio causa instabilidade de macromoléculas biológicas, o que pode ter conseqüências importantes sobre a função celular. Entre estas moléculas o DNA é especialmente importante. Os tipos de danos causados ao DNA pelas espécies reativas de oxigênio são, principalmente, quebras de fita simples e dupla, modificações nas bases nitrogenadas e cross-links de DNA (Valko *et al.*, 2006). Os mecanismos de reparo do próprio DNA são capazes de transformar estes danos em quebras adicionais da dupla fita e o ensaio do cometa, por nós utilizado, foi importante pois o mesmo detecta este tipo de dano.

Estudos desenvolvidos em modelos animais de hipertensão mostraram que a abundância de espécies reativas de oxigênio causada pelo aumento da produção ou pela diminuição de sua degradação, determina o dano oxidativo aos tecidos (Polizio & Pena, 2005). Schupp e colaboradores mostraram, em 2007, que a infusão de angiotensina II em cultura de células renais de porco induz a NAD(P)H oxidase, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio que fragmentam o DNA destas células, o que foi verificado pelo ensaio do cometa (Schupp *et al.*, 2007).

Imanishi e colaboradores demonstraram que a adição de angiotensina II no meio de cultura de células progenitoras endoteliais humanas potencializa a formação de peroxinitrito, devido ao aumento da atividade da subunidade catalítica gp91phox da enzima NAD(P)H oxidase, que causa aceleração da senescência destas células com conseqüente prejuízo de sua atividade mitogênica (Imanishi *et al.*, 2005). Este estudo foi realizado em uma população celular diferente, entretanto os resultados observados são semelhantes aos obtidos no presente estudo.

É inevitável que durante a vida de uma célula, o DNA acumule mutações causadas tanto por fatores ambientais como por erros em sua duplicação. Em situações normais, estes danos levam a interrupção do ciclo celular ou a indução de mecanismos de reparo do DNA que mantêm a estabilidade genômica. Entretanto, doenças como a hipertensão causam um aumento exacerbado destes erros, pois os mecanismos de reparo se tornam insuficientes. A ausência de reparo pode levar à morte celular programada pela ativação de vias apoptóticas. Entretanto, se houver persistência do dano no DNA pode ocorrer perda de material genético, instabilidade genômica e cromossômica, mutagênese e finalmente transformação maligna ou morte celular. Aparentemente, isto foi observado nas células mononucleares de medula óssea dos animais hipertensos que apresentam aumento da produção de espécies reativas de oxigênio que interagem com a molécula de DNA danificando-a. Entretanto, estes danos podem ser reparados até determinado limite, sendo que depois as células entram em apoptose.

Em resumo, SRA desempenha papel muito importante na regulação da pressão arterial. Acredita-se que os efeitos não-hemodinâmicos da angiotensina II formada

localmente são ainda mais importantes que os efeitos da angiotensina II circulante sobre o número e a genotoxicidade das células mononucleares da medula óssea. Entretanto, os mecanismos envolvidos ainda não são completamente conhecidos e por isso, mais estudos são necessários.

**CONCLUSÕES**

## 7 CONCLUSÕES

A quantificação das células mononucleares em câmara de Neubauer mostrou que a hipertensão renovascular 2R1C diminui o número de células indiferenciadas e simultaneamente aumenta o número de linfócitos na medula óssea dos animais doentes, provavelmente devido ao aumento da taxa de divisão assimétrica das células tronco. Esta hipótese foi confirmada pela quantificação das células tronco hematopoiéticas e mesenquimais por citometria de fluxo que é um método mais refinado de quantificação.

A análise de genotoxicidade mostrou que níveis elevados de angiotensina II, causado pela hipertensão renovascular, aumentam a fragmentação do DNA das células mononucleares dos camundongos hipertensos, provavelmente devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio que interagem com o DNA das células causando a sua fragmentação.

Portanto, a hipertensão renovascular causa prejuízos às células tronco da medula óssea o que poderia explicar a ausência de resultados positivos no uso de células tronco autólogas para o tratamento de pacientes hipertensos.

Em conclusão, este estudo fornece a primeira evidência de que a hipertensão renovascular, principalmente através dos efeitos não-hemodinâmicos da angiotensina II, aumenta a diferenciação das células tronco e a fragmentação no DNA das células mononucleares da medula óssea de camundongos *in vivo*. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para determinar os mecanismos responsáveis pelas alterações observadas tanto no número de células como na genotoxicidade.

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IV DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Nefrologia. **Revista Brasileira Hipertensão**. 5(4):1-14, 2002.

ABEDIN M, TINTUT Y, DEMER LL. Mesenchymal stem cells and the artery wall. **Circulation Research**. 95(7):671-676, 2004.

ALDERMAN MH, MADHAVAN S, OOI WL, COHEN H, SEALEY JE, LARAGH JH. Association of the renin-sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. **New England Journal of Medicine**. 324: 1098-1104, 1991.

ALDERMAN MH. Plasma renin activity and coronary heart disease: are they related? **Current Opinions in Nephrology and Hypertension**. 4: 201-203, 1995.

ALVAREZ-DOLADO M, PARDAL R, GARCIA-VERDUGO JM, FIKE JR, LEE HO, PFEFFER K, LOIS C, MORRISON SJ, ALVAREZ-BUYLLA A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. **Nature**. 425(6961):968-973, 2003.

AMERICAN HEART ASSOCIATION 2002. Heart and stroke statistical update. Dallas: American Heart Association, 2001.

ANDERSON D, YU TW, PHILLIPS BJ, SCHMEZER P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. **Mutation Research**. 307:261-271, 1994.

ANDERSON D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**. 350(1):103-108, 2000.

ANNUK M, ZILMER M, FELLSTROM B. Endothelium-dependent vasodilation and oxidative stress in chronic renal failure: impact on cardiovascular disease. **Kidney International** 84(Suppl):S50-S53, 2003.

ARRUDA RMP, PEOTTA VA, MEYRELLES SS, VASQUEZ EC. Evaluation of vascular function in apolipoprotein E knockout mice with angiotensin-dependent renovascular hypertension. **Hypertension**. 46(part 2):932-936, 2005.

ASHOK BT, AHMAD J, QADRI A, ALI R. Anti-ROS-DNA monoclonal antibody as molecular probe for oxidative DNA damage. **Biochemical and Molecular Biology International**. 43:1219–1229, 1997.

AWAD HA, BUTLER DL, BOIVIN GP, SMITH FN, MALAVIYA P, HUIBREGTSE B, CAPLAN AI. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. **Tissue Engineering**. 5:267-277, 1999.

BABIOR BM. NADPH oxidase. **Current Opinions in Immunology**. 16:42–47, 2004.

BADER M, PETERS J, BALTATU O, MULLER DN, LUFT FC, GANTEN D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. **Journal of Molecular Medicine**. 79:76-102, 2001.

BADYAL DK, LATA H, DADHICH AP. Animal models of hypertension and effect of drugs. **Indian Journal of Pharmacology**. 35:349-362, 2003.

BARRY FP, MURPHY JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. 36:568-584, 2004.

BATALLER R, SANCHO-BRU P, GINÈS P, LORA JM, AL-GARAWI A, SOLÉ M, COLMENERO J, NICOLÁS JM, JIMÉNEZ W, WEICH N, GUTIÉRREZ-RAMOS JC, ARROYO V, RODÉS J. Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. **Gastroenterology**. 125:117-125, 2003.

BEDARD K, KRAUSE KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**. 87(1):245-313, 2007.

BENHAR M, ENGELBERG D, LEVITZKI A. ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. **EMBO Reports**. 3:420-425, 2002.

BESWICK RA, DORRANCE AM, LEITE R, WEBB RC. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. **Hypertension**. 38: 1107-1111, 2001.

BONNET D. Hematopoietic stem cells. **The Journal of Pathology**. 197:430-40, 2002.

BONNET D. Hematopoietic stem cells. **Birth Defects Research Embryo Today**. 69:219-29, 2003.

BOUBY N, HUS-CITHAREL A, MARCHETTI J, BANKIR L, CORVOL P, LLORENS-CORTES C. Expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes and angiotensin II-induced calcium mobilization along the rat nephron. **The Journal of the American Society of Nephrology**. 8:1658-1667, 1997.

BURSON J, AGUILERA G, GROSS K, SIGMUND C. Differential expression of angiotensin receptor 1<sub>A</sub> and 1<sub>B</sub> in mouse. **The American Journal of Physiology**. 267:E260–E267, 1994.

BRUDER SP, FINK DJ, CAPLAN AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. **The Journal of Cellular Biochemistry**. 56:283-294, 1994.

BRUDER SP, JAISWAL N, HAYNESWORTH SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. **The Journal of Cellular Biochemistry**. 64: 278-294, 1997.

BRUDER SP, KURTH AA, SHEA M, HAYES WC, JAISWAL N, KADIYALA S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. **The Journal of Orthopedic Research**. 16:155-162, 1998.

BRUNNER HR, KIRSHMAN JD, SEALEY JE, LARAGH JH. Hypertension of renal origin: evidence for two different mechanisms. **Science**. 174:1344-1346, 1971.

BUNTING KD, BRADLEY HL, HAWLEY TS, MORIGGL R, SORRENTINO BP, IHLE JN. Reduced lymphomyeloid repopulating activity from adult bone marrow and fetal liver of mice lacking expression of STAT5. **Blood**. 99(2):479-487, 2002.

BURMESTER G, PEZZUTTO A. **Color atlas of immunology**. 1st ed. New York: Thieme, 2003. 2p

CAI H, HARRISON DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular disease: the role of oxidant stress. **Circulation Research**. 87:840–844, 2000.

CALVI LM, ADAMS GB, WEIBRECHT KW, WEBER JM, OLSON DP, KNIGHT MC, MARTIN RP, SCHIPANI E, DIVIETI P, BRINGHURST FR, MILNER LA, KRONENBERG HM, SCADDEN DT. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. **Nature**. 425: 841-846, 2003.

CAMARGO FD, CHAMBERS SM, GOODELL MA. Stem cell plasticity: from transdifferentiation to macrophage fusion. **Cell Proliferation**. 37(1):55-65, 2004.

CAMPAGNOLI C, ROBERTS AG, KUMAR S, BENNETT PR, BELLANTUONO I, FISK NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**. 98:2396-2402, 2001.

CAMPBELL DJ, HABENER JF. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. **The Journal of Clinical Investigation**. 78: 31-39, 1986.

CANDIDO R, JANDELEIT-DAHM KA, CAO Z, NESTEROFF SP, BURNS WC, TWIGG SM, DILLEY RJ, COOPER ME, ALLEN TJ. Prevention of accelerated atherosclerosis by angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation**. 106(2):246-253, 2002.

CANDIDO R, ALLEN TJ, LASSILA M, CAO Z, THALLAS V, COOPER ME, JANDELEIT-DAHM KA. Irbesartan but not amlodipine suppresses diabetes-associated atherosclerosis. **Circulation**. 109(12):1536-1542, 2004.

CAPERS Q, ALEXANDER RW, LOU P, DE LEON H, WILCOX JN, ISHIZAKA N, HOWARD AB, TAYLOR WR. Monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic tissues of hypertensive rats. **Hypertension**. 30:1397-1402, 1997.

CAPLAN AI. The mesengenic process. **Clinical Plastic Surgery**. 21(3):429-435, 1994.

CARRETERO OA, GULATI OP. Effects of angiotensin antagonist in rats with acute, subacute and chronic two-kidney renal hypertension. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. 91:264-271, 1978.

CASHMAN JD, CLARK-LEWIS I, EAVES AC, EAVES CJ. Differentiation stage-specific regulation of primitive human hematopoietic progenitor cycling by exogenous and endogenous inhibitors in an in vivo model. **Blood**. 94:3722-3729, 1999.

CASSIS LA, RATERI DL, LU H, DAUGHERTY A. Bone marrow transplantation reveals that recipient AT1a receptors are required to initiate angiotensin II-induced atherosclerosis and aneurysms. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**. 27:380-386, 2007.

CERVENKA L, HORACEK V, VANECKOVA I, HUBACEK JA, OLIVERIO MI, COFFMAN TM, NAVAR LG. Essential role of AT<sub>1A</sub> receptor in the development of 2K1C hypertension. **Hypertension**. 40:735-741, 2002.

CERVENKA L, VANECKOVA I, MALY J, HORACEK V, EL-DAHR SS. Genetic inactivation of the B2 receptor in mice worsens two-kidney, one-clip hypertension: role of NO and the AT2 receptor. **Journal of Hypertension**. 21:1531–1538, 2003.

CHABRASHVILI T, TOJO A, ONOZATO ML, KITIYAKARA C, QUINN MT, FUJITA T, WELCH WJ, WILCOX CS. Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. **Hypertension**. 39:269–274, 2002.

CHARBORD P, TAVIAN M, HUMEAU L, PEAULT B. Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment. **Blood**. 87:4109-4119, 1996.

CHENG T, RODRIGUES N, DOMBKOWSKI D, STIER S, SCADDEN DT. Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27kip1. **Nature Medicine**. 6:1235-1240, 2000a.

CHENG T, RODRIGUES N, SHEN H. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. **Science**. 287:1804-1808, 2000b.

CHESHER S, MORRISON SJ, LIAO X, WEISSMAN L. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 96:3120-3125, 1999.

CHILSOM GM, STEIMBERG D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. **Free Radical Biological Medicine**. 28:1815-1826, 2000.

CHISI JE, WDZIECZAK-BAKALA J, THIERRY J, BRISCOE CV, RICHES AC. Captopril inhibits the proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells in murine long-term bone marrow cultures. **Stem Cells**. 17(6):339-344, 1999.

CHISI JE, BRISCOE CV, EZAN E, GENET R, RICHES AC, WDZIECZAK-BAKALA J. Captopril inhibits in vitro and in vivo the proliferation of primitive haematopoietic cells induced into cell cycle by cytotoxic drug administration or irradiation but has no effect on myeloid leukaemia cell proliferation. **The British Journal of Haematology**. 109(3):563-570, 2000.

CHOW DC, WINNING LA, MILLER WM, PAPOUTSAKIS ET. Modeling pO<sub>2</sub> (2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model. **Biophysical Journal**. 81(2):675-684, 2001.

CIESLA B. Hematology in practice. 1<sup>th</sup>ed. Philadelphia: F. A. Davis Company, 2007.

CIVIN CI, LOKEN MR. Cell surface antigens on human marrow cells: dissection of hematopoietic development using monoclonal antibodies and multiparameter flow cytometry. **International Journal of Cell Cloning**. 5(4):267-288, 1987.

CLARK S C, KAMEN R. The human haematopoietic colony stimulating factors. **Science**. 236: 1229-1237, 1987.

COLE J, ERTOY D, LIN H, SUTLIFF RL, EZAN E, GUYENE TT, CAPECCHI M, CORVOL P, BERNSTEIN KE. Lack of angiotensin II-facilitated erythropoietin causes anemia in angiotensin-converting enzyme-deficient mice. **The Journal of Clinical Investigation**. 106(11):1391-1398, 2000.

COLLINS R, PETO R, MacMAHON S, HEBERT P, FIEBACH NH, EBERLEIN KA, GODWIN J, QIZILBASH N, TAYLOR JO and HENNEKENS CH. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, Short-term reductions in blood pressure: overview of randomized drug trials in their epidemiological context. **Lancet**. 335: 827-838, 1990.

COVAS DT, SIUFI JL, SILVA AR, ORELLANA MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 36(9):1179-1183, 2003.

DAMPLE B, HARRISON L. Repair of oxidative damage to DNA: Enzymologist and biology. **Annual Reviews in Biochemistry**. 63: 915–924, 1994.

DATASUS. Indicadores e dados básicos para saúde no Brasil: conceitos e aplicações. Secretaria Executiva do Ministério da Saúde. 2ªed. Brasil. 2005. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br/idb>

da CUNHA V, THAM DM, MARTIN-McNULTY B, DENG G, HO JJ, WILSON DW, RUTLEDGE JC, VERGONA R, SULLIVAN ME, WANG YX. Enalapril attenuates angiotensin II-induced atherosclerosis and vascular inflammation. **Atherosclerosis**. 178(1):9-17, 2005.

DAUGHERTY A, MANNING MW, CASSIS LA. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. **The Journal of Clinical Investigation**. 105:1605–1612, 2000.

de GASPARO M, CATT KJ, INAGAMI T, WRIGHT JW, UNGER T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. **Pharmacology Reviews**. 52: 415-472, 2000.

de HAAN G, NIJHOF W, VAN ZANT G. Mouse strain-dependent changes in frequency and proliferation of hematopoietic stem cells during aging: correlation between lifespan and cycling activity. **Blood**. 89:1543–1550, 1997.

de HAAN JB, BLADIER C, LOTFI-MIRI M, TAYLOR J, HUTCHINSON P, CRACK PJ, HERTZOG P, KOLA I. Fibroblasts derived from Gpx1 knockout mice display senescent-like features and are susceptible to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated cell death. **Free Radical Biological Medicine**. 36(1):53-64, 2004.

De KEULENAER GW, CHAPPELL DC, ISHIZAKA N, NEREM RM, ALEXANDER RW, GRIENGLING KK. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affects human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. **Circulation Research**. 82(10):1094-1101, 1998.

De MELLO WC, DANSER AH. Angiotensin II and the heart: on the intracrine rennin angiotensin system. **Hypertension**. 35:1183-1188, 2000.

DENNIS JE, MERRIAM A, AWADALLAH A, YOO JU, JOHNSTONE B, CAPLAN AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. **Journal of Bone and Mineral Research**. 14:700-709, 1999.

DENNIS JE, CHARBORD P. Origin and differentiation of human and murine stroma. **Stem Cells**. 20:205-214, 2002.

DIODOVICH C, BIANCHI MG, BOWE G, ACQUATI F, TARAMELLI R, PARENT-MASSIN D, GRIBALDO L. Response of human cord blood cells to styrene exposure: evaluation of its effects on apoptosis and gene expression by genomic technology. **Toxicology**. 5(200):45-57, 2004.

DIZDAROGLU M. Free radical-induced formation of an 8,5'-cyclo-2'-deoxyguanosine moiety in deoxyribonucleic acid. **Biochemical Journal**. 238: 247-254, 1986.

DOBRIAN AD, SCHRIVER SD, PREWITT RL. Role of angiotensin II and free radicals in blood pressure regulation in a rat model of renal hypertension. **Hypertension**. 38: 361–366, 2001.

DONAVAN PJ. Growth factor regulation of mouse primordial germ cell development. **Current Topics in Developmental Biology**. 29:189-225, 1994.

DONNELLY S. Why is erythropoietin made in the kidney? The kidney functions as a critmeter. **The American Journal of Kidney Disease**. 38(2):415-425, 2001.

DOSTAL DE, BAKER KM. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? **Circulation Research**. 85:643–650, 1999.

DOUGLAS JG e HOPFER U. Novel aspect of angiotensin receptors and signal transduction in the kidney. **Annual Reviews in Physiology**. 56: 649–669, 1994.

DZAU VJ. Vascular renin-angiotensin system in hypertension. New insights into the mechanism of action of angiotensin converting enzyme inhibitors. **The American Journal of Medicine**. 84(4A):4-8, 1988.

DZAU VJ. Theodore Cooper Lecture: tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. **Hypertension**. 37:1047-1052, 2001.

DZAU VJ, BERNSTEIN K, CELERMAJER D, COHEN J, DAHLOF B, DEANFIELD J, DIEZ J, DREXLER H, FERRARI R, van GILST W, HANSSON L, HORNIG B, HUSAIN A, JOHNSTON C, LAZAR H, LONN E, LUSCHER T, MANCINI J, MIMRAN A, PEPINE C, RABELINK T, REMME W, RUILOPE L, RUZICKA M, SCHUNKERT H, SWEDBERG K, UNGER T, VAUGHAN D, WEBER M. The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: Manifestations in mechanistic and endpoint data. **American Journal of Cardiology**. 88:1L–20L, 2001a.

EBERT BL, BUNN HF. Regulation of the erythropoietin gene. **Blood**. 94:1864-1877, 1999.

EGLITIS MA, MEZEY E. Hematopoietic cell differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 94:4080-4085, 1997.

EVANS MJ, KAUFMAN M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**. 292:154-156, 1981.

FANDREY J. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. 286, R977–R988, 2004.

FAZAN R Jr, SILVA VD, SALGADO HC. Modelos de hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**. 8:19-29, 2001.

FERRARI G, CUSELLA-De ANGELIS G, COLETTA M, PAOLUCCI E, STORNAIUOLO A, COSSU G, MAVILIO F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science**. 279:1528-1530, 1998.

FLIEDNER TM. The role of blood stem cells in hematopoietic cell renewal. **Stem Cells**. 16:361–374, 1998.

FOLKMANN JK, LOFT S, MOLLER P. Oxidatively damaged DNA in aging dyslipidemic ApoE<sup>-/-</sup> and wild-type mice. **Mutagenesis**. 2:105-110, 2007.

FRIEDENSTEIN AJ, CHAILAKHJAN RK, LALIKINA KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell and Tissue Kinetics**. 4:393-403, 1970.

FROHLICH ED, APSTEIN C, CHOBANIAN AV, DEVEREUX RB, DUSTAN HP, DZAU V, FOUAD-TARAZI F, HORAN MJ, MARCUS M, MASSIE B, PFEFFER MA, RE RN, ROCCELLA EJ, SAVAGE D, SHUB C. The heart in hypertension. **The New England Journal Medicine**. 327:998-1007, 1992.

FUCHS E, TUMBAR T, GUASCH G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. **Cell**. 116:769-778, 2004.

FURUKAWA Y. Cell cycle control during hematopoietic cell differentiation. **Human Cell**. 10(3):159-164, 1997.

GALLI SM, PHILLIPS MI. Angiotensin II AT1A receptor antisense lowers blood pressure in acute 2-kidney, 1-clip hypertension. **Hypertension**. 38(part 2):674–678, 2001.

GALMICHE MC, KOTELIANSKY VE, BRIERE J, HERVE P, CHARBORD P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. **Blood**. 82: 66-76, 1993.

GASTÓN RS, JULIAN BA, CURTIS JJ. Posttransplant erythrocytosis: an enigma revisited. **The American Journal of Kidney Disease**. 24(1):1-11, 1994.

GAVA AL, PEOTTA VA, CABRAL AM, VASQUEZ EC, MEYRELLES SS. Overexpression of eNOS prevents the development of renovascular hypertension in mice. **The Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. 86:458-464, 2008.

GAVRAS H. Angiotensin II antagonism: a new avenue of hypertension management. **Blood Pressure**. 1(Suppl):42-46, 1997.

GILBERT SF. *Developmental Biology*. 6th ed. Sunderland, 2000. 314-320p.

GIMBLE J, GUILAK F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization and differentiation potential. **Cytotherapy** 5: 362-369, 2003.

GOLDBLATT H, LYNCH J, HANZEL RF, SUMMERVILLE WW. Studies on experimental hypertension-II: The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischaemia. **The Journal of Experimental Medicine**. 59:347-379, 1934.

GOLDSBY RA, KINDT TJ, KUBY J, OSBORNE BA. *Immunology*. 5th ed. New York: WH Freeman and Co, 2002.

GRIBALDO L. Haematotoxicology: scientific basis and regulatory aspects. **Alternatives to Laboratory Animal**. 30(Suppl 2):111-113, 2002.

GRIENGLING KK, MINIERI CA, OLLERENSHAW JD, ALEXANDER RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circulation Resesearch**. 74:1141–1148, 1994.

GRIENGLING KK, USHIO-FUKAI M, LASSEGUE B, ALEXANDER RW. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle: New concepts. **Hypertension**. 29:266–373, 1997.

GRIENGLING KK, SORESCU D, LASSEGUE B, USHIO-FUKAI M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**. 20:2175–2183, 2000.

GRITTI A, PARATI EA, COVA L, FROLICHSTHAL P, GALLI R, WANKE E, FARAVELLI L, MORASSUTTI DJ, ROISEN F, NICKEL DD, VESCOVI AL. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferative and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. **Journal of Neuroscience**. 16:1091-1100, 1996.

GRONTHOS S, MANKANI M, BRAHIM J, ROBEY PG, SHI S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 97(25):13625-13630, 2000.

GU JW, ANAND V, SHEK EW, MOORE MC, BRADY AL, KELLY WC, ADAIR TH. Sodium induces hypertrophy of cultured myocardial myoblasts and vascular smooth muscle cells. **Hypertension**. 31:1083-1087, 1998.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E.; LOHMEIER, T.E.; JACKSON, T.E.; KASTNER, P.R. Blood pressure regulation: basic concepts. **Federation Proceedings**. 40:2252-2256, 1981.

GUYTON AC, HALL JE. Textbook of Medical Physiology. 11<sup>th</sup> ed. Pennsylvania: Elsevier Saunders. pp. 223-227, 2006.

GYLLENHAMMAR H. Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. **Journal of Immunological Methods**. 97: 209–213, 1987.

HALL PA, WATT FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. **Development**. 106:619-633, 1989.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical Journal**. 219:1-14, 1984.

HAYAKAWA H, COOFEE K, RAIJ L. Endothelial dysfunction and cardiorenal injury in experimental salt-sensitive hypertension: effects of antihypertensive therapy. **Circulation**. 96: 2407-2413, 1997.

HAYASHIDA W, HORIUCHI M, DZAU VJ. Intracellular third loop domain of angiotensin II type-2 receptor. Role in mediating signal transduction and cellular function. **The Journal of Biological Chemistry** 271: 21985-21992, 1996.

HAYEK T, KAPLAN M, RAZ A, KEIDAR S, COLEMAN R, AVIRAM M. Ramipril administration to atherosclerotic mice reduces oxidized low-density lipoprotein uptake by their macrophages and blocks the progression of atherosclerosis. **Atherosclerosis**. 161(1):65-74, 2002.

HAYNES WG, SIVITZ WI, MORGAN DA, WALSH SA, MARK AL. Sympathetic and cardiorenal actions of leptin. **Hypertension**. 30: 619–623, 1997.

HAYNES WG, MORGAN DA, WALSH SA, SIVITZ WI, MARK AL. Cardiovascular consequences of obesity: role of leptin. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. 25: 65–69, 1998.

HAZNEDAROGLU IC, TUNCER S, GÜRSOY M. A local renin-angiotensin system in the bone marrow. **Medical Hypotheses**. 46(6):507-510, 1996.

HAZNEDAROGLU IC, OZTURK MA. Towards the understanding of the local hematopoietic bone marrow rennin-angiotensin system. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. 35: 867-880, 2003.

HEBBEL RP. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. 107(5):401-404, 1986.

HEITZER T, WENZEL U, HINK U, KROLLNER D, SKATCHKOV M, STAHL RA, MacHARZINA R, BRASEN JH, MEINERTZ T, MUNZEL T. Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. **Kidney International**. 55: 252–260, 1999.

HEENEMAN S, SMITS JF, LEENDERS PJ, SCHIFFERS PM, DAEMEN MJ. Effects of angiotensin II on cardiac function and peripheral vascular structure during compensated heart failure in the rat. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**. 17(10):1985-1994, 1997.

HERZOG EL, CHAI L, KRAUSE DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**.102(10):3483-3493, 2003.

HEESCHEN C, LEHMANN R, HONOLD J, ASSMUS B, AICHER A, WALTER DH, MARTIN H, ZEITHER AM, DIMMELER S. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. **Circulation**. 109(13):1615-1622, 2004.

HIGASHI Y, SASAKI S, NAKAGAWA K, MATSUURA H, OSHIMA T, CHAYAMA K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. **The New England Journal of Medicine**. 346:1954–1962, 2002.

HILGERS KF, HARTNER A, PORST M, MAI M, WITTMANN M, HUGO C, GANTEN D, GEIGER H, VEELKEN R, MANN JFE. Monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage Infiltration in hypertensive kidney injury. **Kidney International**. 58:2408-2419, 2000.

HILL JM, ZALOS G, HALCOX JP, SCHENKE WH, WACLAWIW MA, QUYYUMI AA, FINKEL T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function and cardiovascular risk. **The New England Journal of Medicine**. 348(7):593-600, 2003.

HIMMELSTEIN SI, KLOTMAN PE. The role of thromboxane in two-kidney-one-clip Goldblatt hypertension in rats. **American Journal of Physiology** 257:F190-F 196, 1989.

HINGLAIS N, HEUDES D, NICOLETTI A, MANDET C, LAURENT M, BARIÉTY J, MICHEL JB. Colocalization of myocardial fibrosis and inflammatory cells in rats. **Laboratory Investigations**. 70(2):286-294, 1994.

HIRSCH AT, PINTO YM, SCHUNKERT H, DZAU VJ. Potential role of the tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of congestive heart failure. **The American Journal of Cardiology**. 66: 22D-30D, 1990.

HIYOSHI H, KATSUTOSHI Y, MASAOKI T, OKAMOTO H. Angiotensin type 2 receptor-mediated phosphorylation of eNOS in the aortas of mice with 2-kidney, 1-clip hypertension. **Hypertension**. 45:967-973, 2005.

HORTON R, RICE-EVANS C, FULLER BJ. The effects of iron-mediated oxidative stress in isolated renal cortical brush border membrane vesicles at normothermic and hypothermic temperatures. **Free Radical Research Communications**. 5(4-5):267-75, 1989.

HU Y, LIAO L, WANG Q, MA L, MA G, JIANG X, ZHAO RC. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. 141(5):342-349, 2003.

HUMPHRIES RK, EAVES AC, EAVES CJ. Self-renewal of hematopoietic stem cells during mixed colony formation in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 78:3629-3633, 1981.

HUNG SC, CHEN NJ, HSIEH SL, LI H, MA HL, LA WH. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. **Stem Cells**. 20:249-258, 2002.

HUSS R, LANGE C, WEISSINGER EM, KOLB HJ, THALMEIER K. Evidence of peripheral blood-derived , plastic-adherent CD349 (-/low) hematopoietic stem clones with mesenchymal stem cell characteristics. **Stem Cells**. 18:252-260, 2000.

IMANISHI T, HANO T, NISHIO I. Angiotensin II accelerates progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. **The Journal of Hypertension**. 23:97-104, 2005.

IMLAY JA, LINN S. DNA damage and oxygen radical toxicity. **Science**. 240:1302-1309, 1988.

ISMAIL A, KHOSRAVI H, OLSON H. The role of infection in atherosclerosis and coronary artery disease: a new therapeutic target. **Heart Disease**. 1: 233-240, 1999.

IZUMO S, NADAL-GINARD B, MAHDAVI V. Proto-oncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 85:339-343, 1988.

JANOWSKA-WIECZOREK A, MAJKA M, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ. Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. **Stem Cells**. 19: 99-107, 2001.

JAVASON EH, COLTER DC, SCHWARZ EJ, PROCKOP DJ. Rat marrow stroma cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. **Stem Cells**. 19:219-225, 2001.

JIANG Y, JAHAGIRDAR BN, REINHARDT RL, SCHWARTZ RE, KEENE CD, ORTIZ-GONZALEZ XR, REYES M, LENVIK T, LUND T, BLACKSTAD M, DU J, ALDRICH S, LISBERG A, LOW WC, LARGAESPADA DA, VERFAILLIE CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**. 418:41-49, 2002.

JOHNSTONE B, YOO JU. Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. **Clinical Orthopedics and Related Research**. 367: S156-S162, 1999.

JOHNSTONE B. Mesenchymal stem cells and chondrogenesis. **European Cells and Materials Journal**. 4(Suppl I):1473-2262, 2002.

JONES SA, O'DONNELL VB, WOOD JD, BROUGHTON JP, HUGHES EJ, JONES OT. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. **The American Journal of Physiology**. 271(4 Pt 2):H1626-H1634, 1996.

JULIAN BA, BRANTLEY RR Jr, BARKER CV, STOPKA T, GASTON RS, CURTIS JJ, LEE JY, PRCHAL JT. Losartan, an angiotensin II type 1 receptor antagonist, lowers hematocrit in posttransplant erythrocytosis. **Journal of the American Society of Nephrology**. 9(6):1104-1108, 1998.

JUNG O, SCHREIBER JG, GEIGER H, PEDRAZZINI T, BUSSE R, BRANDES RP. gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. **Circulation** 109:1795–1801, 2004.

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. Histologia Básica. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 192-205p.

KADIYALA S, YOUNG RG, THIEDE MA, BRUDER SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and *in vitro*. **Cell Transplant**. 6: 125-134, 1997.

KAKAR SS, SELLERS JC, DEVOR DC, MUSGROVE LC, NEILL JD. Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 183: 1090-1096, 1992.

KAMMINGA LM, BYSTRYKH LV, de BOER A, HOUWER S, DOUMA J, WEERSING E. The Polycomb group gene Ezh2 prevents hematopoietic stem cell exhaustion. **Blood**. 107(5):2170-2179, 2006.

KATO H, ISHIDA J, IMAGAWA S, SAITO T, SUZUKI N, MATSUOKA T, SUGAYA T, TANIMOTO K, YOKOO T, OHNEDA O, SUGIYAMA F, YAGAMI K, FUJITA T,

YAMAMOTO M, NANGAKU M, FUKAMIZU A. Enhanced erythropoiesis mediated by activation of the renin-angiotensin system via angiotensin II type 1a receptor. **Hypertension** 19(14):2023-2025, 2005.

KATSURA, Y. Redefinition of lymphoid progenitors. **Nature Reviews**. 2:1-6, 2002.

KIM JA, BERLINER JA, NADLER JL. Angiotensin II increases monocyte binding to endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,. 226: 862-868, 1996.

KIM S, IWAO H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. **Pharmacological reviews**. 52(1):11-34, 2000.

KIMURA S, ROBERTS AW, METCALF D, ALEXANDER WS. Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 95(3):1195-1200, 1998.

KIRKMAN HN, GAETANI GF. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 81(14):4343-4347, 1984.

KIRKMAN HN, ROLFO M, FERRARIS AM, GAETANI GF. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stochiometry. **The Journal of Biological Chemistry**. 274(20):13908-13914, 1999.

KIRSCHSTEIN R, SKIRBOLL LR. Stem cell: Scientific progress and future research directions. 1thed. Maryland: National Institutes of Health, 2001

KOLLER MR, MANCHEL I, PALSSON BO. Importance of parenchymal:stromal cell ratio for the ex vivo reconstitution of human hematopoiesis. **Stem Cells**. 15: 305-313,1997.

KONAT GW. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced higher order chromatin degradation: a novel mechanism of oxidative genotoxicity. **Journal of Bioscience**. 28(1):57-60, 2003.

KONDO M, WAGERS AJ, MANZ MG, PROHASKA SS, SCHERER DC, BEILHACH GF, SHIZURU JA, WEISSMAN IL. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. **Annual Review of Immunology**. (21):759-806, 2003.

KRANTZ SB. Erythropoietin. **Blood**. 77(3):419-434, 1991.

KRAUSE DS, THEISE ND, COLLECTOR MI, HENEGARIU O, HWANG S, GARDNER R, NEUTZEL S, SHARKIS SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. **Cell**. 105(3):369-377, 2001.

KREJCY K, EICHLER HG, JILMA B, KAPIOTIS S, WOLZT M, ZANASCHKA G, GASIC S, SCHUTZ W, WAGNER O. Influence of angiotensin II on circulating adhesion molecules and blood leukocyte count in vivo. **The Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. 74: 9-14, 1996.

KUCIA M, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ. Are bone marrow stem cells plastic or heterogeneous: that is the question. **Experimental Hematology**. 33(6):613-623, 2005.

LANDMESSER U, HARRISON DG. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. **Coronary Artery Disease**. 12: 455–461, 2001.

LARAGH JH. Renin-angiotensin-aldosterone system for blood pressure and electrolyte homeostasis and its involvement in hypertension, in congestive heart failure and in associated cardiovascular damage (myocardial infarction and stroke). **Journal of Human Hypertension**. 9: 385-390, 1995.

LASSEGUE B, SORESCU D, SZOCS K, YIN Q, AKERS M, ZHANG Y, GRANT SL, LAMBETH JD, GRIENGLING KK. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth

muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. **Circulation Research**. 11;88(9):888-894, 2001.

LASSEGUE B, CLEMPUS RE. Vacular NAD(P)H oxidases: specific features, expression and regulation. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. 285:R277-R297, 2003.

LAURSEN JB, RAJAGOPALAN S, GALIS Z, TAROEY M, FREEMAN BA, HARRISON DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. **Circulation**. 95(3):588-593, 1997.

LEE HS, CRANE GG, MEROK JR, TUNSTEAD JR, HATCH NL, PANCHALINGAM K, POWERS MJ, GRIFFITH LG, SHERLEY JL. Clonal expansion of adult rat hepatic stem cell lines by suppression of asymmetric cell kinetics (SACK). **Biotechnology and Bioengineering**. 83(7):760-771, 2003.

LERMAN LO, NATH KA, RODRIGUEZ-PORCEL M, KRIER JD, SCHWARTZ RS, NAPOLI C, ROMERO JC. Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension. **Hypertension**. 37:541–546, 2001.

LESSARD J, SAUVAGEAU G. Polycomb group genes as epigenetic regulators of normal and leukemic hematopoiesis. **Experimental Hematology**. 31(7):567-585, 2003.

LI L, XIE T. Stem cell niche: structure and function. **Annual Reviews in Cell and Developmental Biology**. 21:605–631, 2005.

LIN H. The stem-cell niche theory: lessons from flies. **Nature Reviews Genetic**. 3:931–940, 2002.

LINDPAINTNER K, WILHELM MJ, JIN M, UNGER T, LANG RE, SCHOELKENS BA, GANTEN D. Tissue renin-angiotensin systems: focus on the heart. **Journal of Hypertension Supplement**. 5(2):S33-S38, 1987.

LOCKWOOD TD. Redox control of protein degradation. **Antioxidant and Redox Signaling**. 2(4):851-78, 2000.

LOFT S, POULSEN HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. **Journal of Molecular Medicine**. 74:297–312, 1996.

LOTEM J, SACHS L. Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia. **Oncogene**. 21(21):3284-94, 2002.

LUFT FC. Workshop: mechanisms and cardiovascular damage in hypertension. **Hypertension** 37: 594-598, 2001.

MACKAREHTSCHIAN K, HARDIN JD, MOORE KA, BOAST S, GOFF SP, LEMISCHKA IR. Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. **Immunity**. 3(1):147-161, 1995.

MacMAHON S, PETO R, CULTER J, COLLINS R, SORLIE P, NEATON J, ABBOTT R, GODWIN J, DYER A, STAMLER J. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1: Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. **Lancet**. 335: 765-774, 1990.

MAHMOUDI M, MERCER J, BENNETT M. DNA damage and repair in atherosclerosis. **Cardiovascular Research**. 71(2):259-268, 2006.

MAJUMDAR MK, THIEDE MA, MOSCA JD, MOORMAN M, GERSON SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. **Journal of Cellular Physiology**. 176: 57-66, 1998.

MARTINEZ-MALDONADO M. Pathophysiology of renovascular hypertension. **Hypertension**. 17:707-719, 1991.

MATÉS JM, PÉREZ-GÓMEZ C, CASTRO IN. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**. 32(8):595-603, 1999.

MATSUSHITA K, WU Y, OKAMOTO Y, PRATT RE, DZAU VJ. Local renin angiotensin expression regulates human mesenchymal stem cell differentiation to adipocytes. **Hypertension**. 48(6):1095-1102, 2006.

MAY AG, VAN DE BERG L, DEWEESE JA, ROB CG. Critical arterial stenosis. **Surgery**. 54:250–259, 1963.

McINNIS GT. Clinical potential: angiotensin converting enzyme inhibitor or angiotensin II antagonist? **Journal of Hypertension**. 19:S61–S67, 2001.

MEADE TW, COOPER JA, PEART WS. Plasma renin activity and ischemic heart disease. **The New England Journal of Medicine**. 329:616-619, 1993.

MEDVINSKY AL, DZIERZAK EA. Development of the definitive hematopoietic hierarchy in the mouse **Developmental and Comparative Immunology**. 22:289-301, 1998.

MEGHJI S. Bone remodelling. **Brazilian Dental Journal**.172:235–242, 1992.

MELARAGNO MG, FINK GD. Enhanced Slow Pressor Effect of Angiotensin II in Two-Kidney, One Clip Rats. **Hypertension**. 25:288-293, 1995.

MIKSCHE LW, MIKSCHE U, GROSS F. Effect of sodium restriction on renal hypertension and on renin activity in the rat. **Circulation Research**. 27:973-984, 1970.

MINGUELL JJ, ERICES A, CONGET P. Mesenchymal stem cells. **Experimental Biology Medicine Maywood**. 226: 507-520, 2001.

MINOTTI G, AUST SD. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. **The Journal of Biological Chemistry**. 262(3):1098-1104, 1987.

MOHAZZAB KM, KAMINSKI PM, WOLIN MS. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. **The American Journal of Physiology**. 266(6 Pt 2):H2568-H2572, 1994.

MOLLNAU H, WENDT M, SZOCS K. Effects of angiotensin infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. **Circulation Research**. 90:E58-E65, 2002.

MONGEAU JG. Heredity and blood pressure. **Seminars in Nephrology**. 9:208-216, 1989.

MOORE K.A. Recent advances in defining the hematopoietic stem cell niche. **Current Opinions in Hematology**. 11:107–111, 2004.

MORLEY A, BLAKE J. An animal model of chronic aplastic marrow failure. I. Late marrow failure after busulfan. **Blood**. 44:49–56, 1979.

MORRISON SJ, WEISSMAN IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. **Immunity**. 1:661–673, 1994.

MORRISON SJ, UCHIDA N, WEISSMAN IL. The biology of hematopoietic stem cells. **Annual Reviews of Cell Developmental Biology**. 11:35-71, 1995.

MORRISON SJ, WANDY CZ AM, AKASHI K, GLOBERSON A, WEISSMAN IL. The aging of hematopoietic stem cells. **Nature Medicine**. 2:1011–1016, 1996.

MRUG M, STOPKA T, JULIAN BA, PRCHAL JF, PRCHAL JT. Angiotensin II stimulates proliferation of normal early erythroid progenitors. **The Journal of Clinical Investigation**. 100(9):2310-2314, 1997.

MUGURUMA Y, YAHATA T, MIYATAKE H, SATO T, UNO T, ITOH J, KATO S, ITO M, HOTTA T, ANDO K. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. **Blood**. 107:1878–1887, 2006.

MÜLLER-SIEBURG CE, DERYUGINA, E. The stromal cells: guide to the stem cell universe. **Stem Cells**. 13: 477-486, 1995.

MULLER-SIEBURG CE, RIBLET R. Genetic control of the frequency of hematopoietic stem cells in mice: mapping of a candidate locus to chromosome 1. **Journal of Experimental Medicine**.183: 1141–1150, 1996.

NAKAHATA T, OGAWA M. Hematopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono and multipotential hematopoietic progenitors. **The Journal of Clinical Investigation**. 70:1324-1328, 1982.

NATARAJ C, OLIVERIO MI, MANNON RB, MANNON PJ, AUDOLY LP, AMUCHASTEGUI CS, RUIZ P, SMITHIES O, COFFMAN TM. Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. **The Journal of Clinical Investigation**. 104:1693-1701, 1999.

NICOLETTI A, HEUDES D, MANDET C, HINGLAIS N, BARIETY J, MICHEL JB. Inflammatory cells and myocardial fibrosis: spatial and temporal distribution in renovascular hypertensive rats. **Cardiovascular Research**. 32: 1096-1107, 1996.

NOGUEIRA BV, PEOTTA VA, MEYRELLES SS, VASQUEZ EC. Evaluation of aortic remodeling in Apolipoprotein E-deficient mice and renovascular hypertensive mice. **Archives of Medical Research**. 38(8):816-821, 2007.

NORDBERG J, ARNÉR ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system **Free Radical Biology and Medicine**. 31(11):1287-312, 2001.

OLIVE PL, BANÁTH JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature Protocols**. 1(1): 23-29, 2006.

OMS. Organização Mundial de Saúde. 2007. Disponível em: <http://www.who.int>

ORIE NN, ZIDEK W, TEPEL M. Reactive oxygen species in essential hypertension and non-insulin-dependent diabetes mellitus. **The American Journal of Hypertension**. 12:1169–1174, 1999.

ORKIN SH. Diversification of hematopoietic stem cells to specific lineages. **Nature Reviews Genetic**. 1: 57-64, 2000.

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

ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. **Pediatric Transplant**. 7:86–88, 2003.

PAGANO PJ, ITO Y, TORNHEIM K, GALLOP PM, TAUBER AI, COHEN RA. An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. **The American Journal of Physiology**. 268(6 Pt 2):H2274-H2280, 1995.

PALIS J, YODER MC. Yolk-sac hematopoiesis: The first blood cells of mouse and man. **Experimental Hematology**. 29:927-936, 2001.

PARENT-MASSIN, D. Relevance of clonogenic assays in hematotoxicology. **Cellular Biology and Toxicology**. 17:87–94, 2001.

PATTERSON C, RUEF J, MADAMANCHI NR, BARRY-LANE P, HU Z, HORAIST C, BALLINGER CA, BRASIER AR, BODE C, RUNGE MS. Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. **Journal of Biological Chemistry**. 274(28):19814-19822, 1999.

PEOTTA VA, GAVA AL, VASQUEZ EC, MEYRELLES SS. Evaluation of baroreflex control of heart rate in renovascular hypertensive mice. **The Journal of Canadian Physiology and Pharmacology**. 85: 761-766, 2007.

PERAZELLA M, MCPHEDRAN P, KLIGER A, LORBER M, LEVY E, BIA MJ. Enalapril treatment of posttransplant erythrocytosis: efficacy independent of circulating erythropoietin levels. **The American Journal of Kidney Disease**. 26(3):495-500, 1995.

PERRY HM Jr, MILLER JP, FORNOFF JR, BATY JD, SAMBHI MP, RUTAN G, MOSKOWITZ DW and CARMODY SE. Early predictors of 15-year end-stage renal disease in hypertensive patients. **Hypertension** 25: 587-594, 1995.

PETERSEN BE, BOWEN WC, PATRENE KD, MARS WM, SULLIVAN AK, MURASE N, BOGGS SS, GREENBERGER JS, GOFF JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. **Science**. 284:1168-1170, 1999.

PHILLIPS RL, REINHART AJ, VAN ZANT G. Genetic control of murine hematopoietic stem cell pool sizes and cycling kinetics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 89:11607–11611, 1992.

PITT B. Angiotensin-converting enzyme inhibitors in patients with coronary atherosclerosis. **American Heart Journal**. 128:1328-1332, 1994.

PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSHAK DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**. 284: 143-147, 1999.

POLIZIO AH, PEÑA C. Effects of angiotensin II type 1 receptor blockade on the oxidative stress in spontaneously hypertensive rat tissues. **Regulatory Peptides**. 128:1-5, 2005.

POTTEN CS, LOEFFLER M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. **Development**. 110:1001-1020, 1990.

PRESTON SL, ALISON MR, FORBES SJ, DIREKZE NC, POULSOM R, WRIGHT NA. The new stem cell biology: something for everyone. **Molecular Pathology**. 56:86-96, 2003.

PROCKOP DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues, **Science**. 276: 71-74, 1997.

PUEYO ME, GONZALEZ W, NICOLETTI A, SAVOIE F, ARNAL JF, MICHEL JB. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**. 20:645–651, 2000.

RAHMAN I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. **Journal of Biochemical and Molecular Biology**. 36(1):95-109, 2003.

RAJAGOPALAN S, KURZ S, MUNZEL T, TARPEY M, FREEMAN BA, GRIENDLING KK, HARRISON DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. **The Journal of Clinical Investigation**. 97:1916–1923, 1996.

RATHORE N, JOHN S, KALE M, BHATNAGAR D. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in isoproterenol induced oxidative stress in rat tissues. **Pharmacology Research**. 38(4):297-303, 1998.

RECKELHOFF JF, ROMERO JC. Role of oxidative stress in angiotensin induced hypertension. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. 284: R893–R912, 2003.

REDON J, OLIVA MR, TORMOS C, GINER V, CHAVES FJ, IRADI A. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. **Hypertension**. 41: 1096–1101, 2003.

REYA T. Regulation of hematopoietic stem cell self-renewal. **Recent Progress in Hormone Research**. 58:283-295, 2003.

REYNOLDS BA, WEISS S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. **Science**. 255:1707-1710, 1992.

RICHARDS M, HUIBREGTSE BA, CAPLAN AI, GOULET JA, GOLDSTEIN SA, Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction. **The Journal of Orthopedic Research**. 17: 900-908, 1999.

RODRIGUEZ-ITURBE B, PONS H, HERRERA-ACOSTA J, JOHNSON RJ. Role of immunocompetent cells in nonimmune renal diseases. **Kidney International**. 59:1626-1640, 2001.

ROHRWASSER A, MORGAN T, DILLON HF, ZHAO L, CALLAWAY CW, HILLAS E, ZHANG S, CHENG S, CHENG T, INAGAMI T, WARD K, TERRERO DA, LALOWEL JM. Elements of a paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. **Hypertension**. 34:1265-1274, 1999.

ROMANOV YA, SVINTSITSKAYA VA, SMIRNOV VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like Cells from umbilical cord. **Stem Cells**. 21:105-110, 2003.

ROMERO JC, RECKELHOFF JF. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. **Hypertension**. 34:943-949, 1999.

ROUSSEAU A, MICHAUD A, CHAUVET MT, LENFANT M, CORVOL P. The hemoregulatory peptide *N*-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotensin-converting enzyme. **Journal of Biological Chemistry**. 270:3656-3661, 1995.

ROUSSEAU-PLASSE A, WDZIECZAK-BAKALA J, LENFANT M, EZAN E, GENET R, ROBINSON S, BRISCOE T, MELVILLE J, RICHES A. Lisinopril, an angiotensin I-converting enzyme inhibitor, prevents entry of murine hematopoietic stem cells into

the cell cycle after irradiation in vivo. **Experimental Hematology**. 26(11):1074-1079, 1998.

RUECKSCHLOSS U, QUINN MT, HOLTZ J, MORAWIETZ H. Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells: Protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**. 22:1845–1851, 2002.

RUIZ-ORTEGA M, LORENZO O, RUPEREZ M, ESTEBAN V, SUZUKI Y, MEZZANO S, PLAZA JJ, EGIDO J. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. **Hypertension** 38: 1382-1387, 2001.

RUIZ-ORTEGA M, LORENZO O, SUZUKI Y, RUPEREZ M, EGIDO J. Proinflammatory actions of angiotensins. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**.10:321-329, 2001b.

RUOFF GE. The impact of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on hypertension: alternative analgesics for patients at risk. **Clinical Therapy**. 20: 376-387, 1998.

SADOSHIMA JI, IZUMO S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts: critical role of the AT1 receptor subtype. **Circulation Research**. 73:413-423, 1993.

SALGUERO G, AKIN E, TEMPLIN C, KOTLARZ D, DOERRIES C, LANDMESSER U, GROTE K, SCHIEFFER B. Renovascular hypertension by two-kidney one-clip enhances endothelial progenitor cell mobilization in a p47<sup>phox</sup>-dependent manner. **Journal of Hypertension**. 26: 257-268, 2008.

SAMANI NJ, SWALES JD. Molecular biology of the vascular renin-angiotensin system. **Blood Vessels**. 28:210-216, 1991.

SARAFIDIS PA, BAKRIS GL. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and hypertension: an epidemiologic approach. **Journal of the Cardiometabolic Syndrome**. 1(5):334-342, 2006.

SARUGASER R, LICKORISH D, BAKSH D, HOSSEINI MM, DAVIES JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: A source of mesenchymal progenitors. **Stem Cells**. 23(2): 220-229, 2005.

SCHMIDT-OTT KM, KAGIYAMA S, PHILLIPS MI. The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis. **Regulatory Peptides**. 93:65–77, 2000.

SCHUPP N, SCHMID U, RUTKOWSKI P, LAKNER U, KANASE N, HEIDLAN A, STOPPER H. Angiotensin II-induced genomic damage in renal cells can be prevented by angiotensin II type 1 receptor blockage or radical scavenging. **The American Journal of Physiology. Renal Physiology**. 292:F1427-F1434, 2007.

SESA. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: relatório de situação. Secretaria Estadual de Saúde do Espírito Santo. Ministério da Saúde, 2005. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/svs>

SHERLEY JL. Asymmetric cell kinetics genes: the key to expansion of adult stem cells in culture. **Stem Cells**. 20(6):561-72, 2002.

SHIBATA H, SUZUKI H, MURAKAMI M, SATO A, SARUTA T. (1994). Angiotensin II type 1 receptor messenger RNA levels in human blood cells of patients with primary and secondary hypertension: Reference to renin profile. **Journal of Hypertension**. 12: 1275–1284, 1994.

SHORT B, BROUARD N, OCCHIODORO-SCOTT T, RAMAKRISHNAN A, SIMMONS PJ. Mesenchymal stem cells. **Archives of Medical Research**. 34:565–571, 2003.

SIMMONS PJ, TOROK-STORB B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. **Blood**. 78: 2848-2853, 1991.

SINGH NP, MCCOY MT, TICE RR, SCHNEIDER EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. 175, 184–191, 1988.

SLUPPHAUG G, KAVLI B, KROKAN HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutation Research**. 531(1-2): 231-251, 2003.

SMITH C. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. **Cancer Control**. 10:9-16, 2003.

SMITHIES O, KIM HS, TAKAHASHI N, EDGELL MH. Importance of quantitative genetic variations in the etiology of hypertension. **Kidney International**. 8:2265-2280, 2000.

SOMERS MJ, MAVROMATIS K, GALIS ZS, HARRISON DG. Vascular superoxide production and vasomotor function in hypertension induced by deoxycorticosterone acetate-salt. **Circulation**. 101:1722-1728, 2000.

SORESCU D, WEISS D, LASSÈGUE B, CLEMPUS RE, SZÖCS K, SORESCU GP, VALPPU L, QUINN MT, LAMBETH JD, VEGA JD, TAYLOR WR, GRIENDLING KK. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. **Circulation**. 105(12):1429-1435, 2002.

SPRADLING A, DRUMMOND-BARBOSA D, KAI T. Stem cells find their niche. **Nature**. 414:98–104, 2001.

STADTMAN ER, LEVINE RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**. 25(3-4):207-218, 2003.

STEINBERG D, WITZTUM JL. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? **Circulation**. 105:2107–2111, 2002.

STIGANT CE, COHEN J, VIVERA M, ZALTZMAN JS. ACE inhibitors and angiotensin II antagonists in renal transplantation: an analysis of safety and efficacy. **American Journal of Kidney Diseases**. 35:158-163, 2000.

SUZUKI Y, RUIZ-ORTEGA M, EGIDO J. Angiotensin II: a double-edged sword in inflammation. **Journal of Nephrology**. 13(Suppl.3):S101-110, 2000.

SWARTZ HM, DUNN JF. Measurements of oxygen in tissues: overview and perspectives on methods. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 530:1-12, 2003.

SZILVASSY SJ, HUMPHRIES RK, LANSDORP PM, EAVES AC, EAVES CJ. Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 87:8736–8740, 1990.

TAICHMAN RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. **Blood** 105: 2631–2639, 2005.

TAMURA H, OKAMOTO S, IWATSUKI K, FUTAMATA Y, TANAKA K, NAKAYAMA Y, MIYAJIMA A, HARA T. In vivo differentiation of stem cells in the aorta-gonad-mesonephros region of mouse embryo and adult bone marrow. **Experimental Hematology**. 30: 957-966, 2002.

TAVASSOLI M. Embryonic and fetal hematopoiesis: an overview. **Blood Cells**. 17:269-281, 1991.

TEPPER OM, GALIANO RD, CAPLA JM, KALKA C, GAGNE PJ, JACOBOWITZ GR, LEVINE JP, GURTNER GC. Human endothelial progenitor cell from type II diabetics exhibit impaired proliferation into vascular structures. **Circulation**. 106(22):2781-2786, 2002.

TEXTOR SC, NOVICK A, MUJ AIS SK, ROSS R, BRAVO EL, FOUAD FM, TARAZI RC. Responses of the stenosed and contralateral kidneys to [Sar1, Thr8] All in human renovascular hypertension. **Hypertension**. 5:796–804, 1983.

THOLLON C, ILIOU JP, CAMBARRAT C, ROBIN F, VILAINE JP. Nature of the cardiomyocyte injury induced by lipid hydroperoxides. **Cardiovascular Research**. 30(5):648-655, 1995.

THOMSON JA, KALISHMAN J, GOLOS TG, DURNING M, HARRIS CF, BECKER RA, HEARN JP. Isolation of a primate embryo stem-cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 92: 7844-7848, 1995.

TILL JE, MCCULLOCH EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Radiation Research**. 14, 213–215, 1961.

TILL JE, McCULLOCH EA, SIMINOVITCH L. Isolation of variant cell lines during serial transplantation of hematopoietic cells derived from fetal liver. **Journal of the National Cancer Institute**. 33:707-720, 1964.

TIMMERMANS PB, SMITH RD. The diversified pharmacology of angiotensin II-receptor blockade. **Blood Press Suppl 2**: 53-61, 1996.

TOUYZ RM, TABET F, SCHIFFRIN EL. Redox-dependent signaling by angiotensin II and vascular remodeling in hypertension. **Clinical Experimental Pharmacology and Physiology**. 30(11):860-866, 2003.

TUAN RS, BOLAND G, TULI R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering, **Arthritis Research and Therapy**. 5: 32-45, 2003.

TUMMALA PE, CHEN XL, SUNDELL CL, LAURSEN JB, HAMMES CP, ALEXANDER RW, HARRISON DG, MEDFORD RM. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. **Circulation**. 100: 1223-1229, 1999.

URSINI F, MAIORINO M, BRIGELIUS-FLOHÉ R, AUMANN KD, ROVERI A, SCHOMBURG D, FLOHÉ L. Diversity of glutathione peroxidases. **Methods in Enzymology**. 252:38-53, 1995.

VALKO M, RHODES CJ, MONCOL J, IZACOVIK M, MAZUR M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**. 160:1-40, 2006.

VAN ZANT G, ELDRIDGE PW, BEHRINGER RR, DEWEY MJ. Genetic control of hematopoietic kinetics revealed by analyses of allophenic mice and stem cell suicide. **Cell**. 35:639–645, 1983.

VAN ZANT G, HOLLAND BP, ELDRIDGE PW, CHEN JJ. Genotype-restricted growth and aging patterns in hematopoietic stem cell populations of allophenic mice. **Journal of Experimental Medicine**. 171:1547–1565, 1990.

VOGEL W, GRUNEBACH F, MESSAM CA, KANZ L, BRUGGERW, BUHRING HJ. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. **Haematologica**. 88: 126-133, 2003.

WAGERS AJ, SHERWOOD RI, CHRISTENSEN JL, WEISSMAN IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. **Science**. 297:2256–2259, 2002.

WALKLEY CR, MCARTHUR GA, PURTON LE. Cell division and hematopoietic stem cells: not always exhausting. **Cell Cycle**. 4:893-896, 2005.

WANG HD, JOHNS DG, XU S, COHEN RA. Role of superoxide anion in regulating pressor and vascular hypertrophic response to angiotensin II. **American Journal of Physiology. Heart and Circulation Physiology**. 282: H1697–H1702, 2002.

WANG X, HISHA H, TAKETANI S, ADACHI Y, LI Q, CUI W, CUI Y, WANG J, SONG C, MIZOKAMI T, OKAZAKI S, LI Q, FAN T, FAN H, LIAN Z, GERSHWIN ME,

IKEHARA S. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from mouse fetal bone marrow. **Stem Cells** 24(3):482-493. 2005.

WASSMANN S, WASSMANN K, NICKENIG G. Regulation of antioxidant and oxidant enzymes in vascular cells and implications for vascular disease. **Current Hypertension Reports**. 8(1):69-78, 2006.

WATT FM, HOGAN BL. Out of Eden: stem cells and their niches. **Science**. 287:1427–1430, 2000.

WEINSTOCK JV, KASSAB J. Chemotactic response of splenic mononuclear cells to angiotensin II in murine schistosomiasis. **Journal of Immunology**.137:2020-2024, 1986.

WEISS D, KOOLS JJ, TAYLOR WR. Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. **Circulation**. 103:448–454, 2001.

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

WEISSMAN IL, ANDERSON DJ, GAGE F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. **Annual Reviews in Cell Developmental Biology**. 17:387-403, 2001.

WELCH WJ, MENDONÇA M, ASLAM S, WILCOX CS. Roles of oxidative stress and AT1 receptors in renal hemodynamics and oxygenation in the postclipped 2K,1C kidney. **Hypertension** 41(3 Pt 2):692–696, 2003.

WHETTON AD, GRAHAM GJ. Homing and mobilization in the stem cell niche. **Trends in Cell Biology**. 9:233-238. 1999.

WHO – ISH: Guidelines Subcommittee 1999 World Organization – International Society of Hypertension: Guidelines for the management of hypertension. **Journal of Hypertension**. 17:151-183, 1999.

WIESEL P, MAZZOLAI L, NUSSBERGER J, PEDRAZZINI T. Two-kidney, one clip and one-kidney, one clip hypertension in mice. **Hypertension**. 29(4):1025-30, 1997.

WOLF G. Angiotensin II is involved in the progression of renal disease: importance of non-hemodynamic mechanisms. **Nephrologie** 19: 451-456, 1998.

WOLLERT KC, DREXLER H. Mesenchymal stem cells for myocardial infarction: promises and pitfalls. **Circulation**. 112(2):151-153, 2005.

WORKING GROUP ON RENOVASCULAR HYPERTENSION. Detection, evaluation, and treatment of renovascular hypertension. Final report. **Archives in International Medicine**. 147:820–829, 1987.

YASUNARI K, MAEDA K, NAKAMURA M, YOSHIKAWA J. Oxidative stress in leukocytes is a possible link between blood pressure, blood glucose, and C-reactive protein. **Hypertension**. 39:777–780, 2002.

YOUNG RG, BUTLER DL, WEBER W, CAPLAN AI, GORDON SL, FINK DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. **Journal of Orthopedic Research**. 16: 406-413, 1998.

YUSUF S, PEPINE CJ, GARCES C, POULEUR H, SALEM D, KOSTIS J, BENEDICT C, ROUSSEAU M, BOURASSA M, PITT B. Effect of enalapril on myocardial infarction and unstable angina in patients with low ejection fractions. **Lancet** 340: 1173-1178, 1992.

ZAFARI AM, USHIO-FUKAI M, AKERS M, YIN O, SHAH A, HARRISON DG, TAYLOR WR, GRIENGLING KK. Novel role of NADH/NADPH oxidase-derived hydrogen peroxide in angiotensin II-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells. **Hypertension**. 32: 488–495, 1998.

ZAGO MA, COVAS DT. Células tronco: a nova fronteira da medicina. 1 ed. São Paulo: Editora Ateneu, 2006.

ZANDSTRA PW, LAUFFENBURGER DA, EAVES CJ. A ligand-receptor signaling threshold model of stem cell differentiation control: a biologically conserved mechanism applicable to hematopoiesis. **Blood**. 96:1215-1222, 2000.

ZSEBO KM, WILLIAMS DA, GEISLER EN, BROUDY VC, MARTIN FH, ATKINS HL, HSU RY, BIRKETT NC, OKINO KH, MURDOCK DC, JACOBSEN FW, LANGLEY KE, SMITH KA, TAKEISH T, CATTANACH BM, GALLI SJ, SUGGS SV. Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. **Cell**. 63(1):213-224, 1990.

ZHANG J, NIU C, YE L, HUANG H, HE X, TONG WG, ROSS J, HAUG J, JOHNSON T, FENG JQ, HARRIS S, WIEDEMANN LM, MISHINA Y, LI L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. **Nature**. 425:836–841, 2003.

ZHU J, EMERSON SG. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. **Oncogene**. 21(21):3295-3313, 2002.

ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H, HUANG J, FUTRELL JW, KATZ AJ, BENHAIM P, LORENZ HP, HEDRICK MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**. 7(2):211-28, 2001.

[http://www.planalto.gov.br/CCivil\\_03/Ato2004-006/2005/Decreto.htm](http://www.planalto.gov.br/CCivil_03/Ato2004-006/2005/Decreto.htm)