UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

CLARISSA LOUREIRO TONINI

ANÁLISE TEMPORAL DO NÚMERO E GENOTOXICIDADE DE CÉLULAS-TRONCO DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS ATEROSCLERÓTICOS

Vitória
2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

CLARISSA LOUREIRO TONINI

ANÁLISE TEMPORAL DO NÚMERO E GENOTOXICIDADE DE CÉLULAS-TRONCO DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS ATEROSCLERÓTICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Profa. Dra. Silvana dos Santos Meyrelles

Vitória
2008

CLARISSA LOUREIRO TONINI

ANÁLISE TEMPORAL DO NÚMERO E GENOTOXICIDADE DE CÉLULAS TRONCO DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS ATEROSCLERÓTICOS

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

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Profª Dr.ª Silvana dos Santos Meyrelles
Orientadora

_____

Profª Drª Robéria Maria Mendes Pontes Arruda

_____

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez

_____

Prof. Dr. José Geraldo Mill

Vitória, _____de_____de_____.

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

Tonini, Clarissa Loureiro.
T665a Análise temporal do número e genotoxicidade de células tronco de medula óssea de camundongos ateroscleróticos. / Clarissa Loureiro Tonini. – 2008.
94f. : ilust.

Orientadora: Silvana dos Santos Meyrelles.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Aterosclerose. 2. Celulas – Tronco. 3. Genotoxicidade. I. Meyrelles, Silvana dos Santos. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU:61

AGRADECIMENTOS

À minha família e amigos pelo apoio e carinho em todos os momentos da minha vida.

À Bianca pela amizade e ajuda em todos os experimentos.

Aos professores Vasquez e Silvana, agradeço a oportunidade de aprender e as demonstrações de confiança.

Aos professores José Geraldo Mill e Robéria Arruda pelas sábias colocações que colaboraram para o aperfeiçoamento desta dissertação.

Ao professor Rodrigo Rodrigues do Núcleo de Doenças Infecciosas da UFES pela ajuda no citômetro de fluxo.

À FAPES-PRONEX pelo financiamento concedido para realização de nosso estudo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....15

1.1 ATEROSCLEROSE.....15
1.1.1 HISTÓRICO.....15
1.1.2 DEFINIÇÃO.....15
1.1.3 FATORES DE RISCO.....16
1.1.4 ATEROGÊNESE.....19
1.1.5 CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES.....20
1.1.6 ESTRESSE OXIDATIVO.....23
1.1.7 ESTRESSE OXIDATIVO E ATEROSCLEROSE.....25
1.2. CAMUNDONGO APOE-KO.....26

1.3. CÉLULAS TRONCO.....27
1.3.1 HISTÓRICO.....27
1.3.2 DEFINIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO.....28
1.3.3 MEDULA ÓSSEA.....30
1.3.4 CLASSIFICAÇÃO.....31
1.3.4.1 QUANTO A POTENCIALIDADE.....31
1.3.4.2 QUANTO A ORIGEM.....32
1.3.4.3 QUANTO AOS TIPOS.....32
1.3.4.3.1 HEMATOPOÉTICAS.....33
1.3.4.3.2 MESENQUIMAIS.....35

1.4 SENESCÊNCIA.....37
1.4.1. CÉLULAS TRONCO E SENESCÊNCIA.....38

2. OBJETIVOS.....40
2.1 OBJETIVO GERAL.....40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....40

3. METODOLOGIA.....42
3.1. ANIMAIS.....42
3.2. ISOLAMENTO DAS CÉLULAS TRONCO.....43
3.3. QUANTIFICAÇÃO EM CÂMARA DE NEUBAUER.....46
3.4. CONGELAMENTO.....48
3.5. DESCONGELAMENTO.....48
3.6. CITOMETRIA DE FLUXO.....49
3.6.1. ANÁLISE QUANTITATIVA.....49
3.6.2. MARCAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO.....49
3.6.3. ANÁLISE DOS DADOS DO CITÔMETRO.....50
3.7. ENSAIO DO COMETA.....50
3.7.1. PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS.....51
3.7.2. LISE.....52
3.7.3. DESENOVELAMENTO.....52
3.7.4. ELETROFORESE.....52
3.7.5. NEUTRALIZAÇÃO.....53
3.7.6. SECAGEM.....53
3.7.7. COLORAÇÃO COM BROMETO DE ETÍDEO.....53
3.7.8. ANÁLISE EM MICROSCÓPIO DE FLUORESCÊNCIA.....54
3.8 ANÁLISE DA SENESCÊNCIA.....55
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....55

4. RESULTADOS.....57
4.1 QUANTIFICAÇÃO EM CÂMARA DE NEUBAUER.....57
4.2 ANÁLISE DO PESO.....58
4.3 ANÁISE DO NÚMERO DE CÉLULAS PELO PESO.....59
4.4 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR.....60
4.5 QUANTIFICAÇÃO PELA CITOMETRIA DE FLUXO.....61
4.5.1 PERCENTUAL DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS.....62
4.5.2 PERCENTUAL DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS.....64
4.6 ANÁLISE DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA.....66
4.6.1 FRAGMENTAÇÃO EM C57 E APOE.....67
4.6.1.1 GRUPO 57.....67
4.6.1.2 GRUPO APOE.....68

4.7 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA SENESCÊNCIA.....69

5. DISCUSSÃO.....71

6. CONCLUSÃO.....84

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....86

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Macrófagos na camada íntima..... 19

Figura 2 – Aorta com estrias lipídicas.....21

Figura 3 – Progressão da Placa Aterosclerótica.....23

Figura 4 – Estresse Oxidativo.....24

Figura 5 – NADPH oxidase.....25

Figura 6 – Lipoproteínas dos camundongos ApoE-KO.....26

Figura 7 – Divisão Assimétrica das células tronco.....29

Figura 8 – Medula Óssea.....30

Figura 9 – Linhagens das células tronco hematopoéticas.....33

Figura 10 – Remoção do fêmur e da tíbia.....43

Figura 11 – Remoção do tecido dos ossos.....44

Figura 12 – Corte das epífises 44

Figura 13 – *Flush* da medula óssea..... 44

Figura 14 – Gradiente de densidade..... 45

Figura 15 – Anel de células mononucleares..... 46

Figura 16 – Quadrantes de contagem da câmara de Neubauer..... 47

Figura 17 – Câmara de Neubauer..... 48

Figura 18 – Preparação da lâmina..... 51

Figura 19 – Solução de lise 52

Figura 20 - Eletroforese das lâminas em cuba vertical..... 53

Figura 21 - Níveis de fragmentação do DNA 54

Figura 22 – Gráfico da Contagem das células mononucleares.....57

Figura 23 - Gráfico que mostra a relação do peso com as diferentes idades.....58

Figura 24 - gráfico da correlação entre peso nas diferentes idades e número de células quantificadas. 59

Figura 25 - Gráfico representativo da viabilidade..... 60

Figura 26 - Gráficos típicos utilizados na citometria de fluxo..... 61

Figura 27 - Gráfico da Variação da população de CTH / Gráfico da relação entre população de CTH do grupo aterosclerótico pelo grupo C57..... 63

Figura 28 - Gráfico do número de células tronco mesenquimais.....64

Figura 29 - Gráfico da relação Número de CTM de ApoE-KO/C57.....65

Figura 30 - Escala dos níveis de fragmentação de DNA.....66

Figura 31 - Fotos representativas da senescência e placa aterosclerótica..... 69

Tabela 1 – Classificação das células tronco quanto a potencialidade.....31

Tabela 2 – Níveis de fragmentação encontrados no grupo C57.....67

Tabela 3 - Níveis de fragmentação encontrados no grupo C57.....68

LISTA DE ABREVIATURAS

ApoE – Apolipoproteina E

ApoE-KO – Apolipoproteina E *Knock-out*

CFU-F – Colônia formadora de unidades de fibroblastos

CMN – Células mononucleares

CTH – Célula tronco Hematopoética

CTM – Célula tronco Mesenquimal

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Médium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

EDTA – Ácido Etilenodiaminatetracético

FGF – Fator de crescimento derivado de fibroblastos

GCSF – Fator de estimulação de colônia por granulócitos

HDL – Lipoproteína de alta densidade

IDL – lipoproteína de densidade intermediária

IL-1 – Interleucina 1

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LMP – *Low Melting Point*

MO – Medula Óssea

NADPH – Nicotinamida Adenina dinucleotídeo fosfato

NK – *Natural Killer*

NMA – *Normal Melting Agarose*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – *Phosphate Buffer Solution*

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

RNA – Ácido Ribonucléico

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SFB – Soro Fetal Bovino

SGC – *Single Cell Gel*

TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

VCAM-1 – Molécula de Adesão Vascular

RESUMO

As células tronco têm sido alvo de muitos estudos atualmente, muitos deles utilizando a terapia celular nas doenças cardiovasculares. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos que alteram a função e a mobilização das células tronco quando expostas a senescência e a aterosclerose. A análise das células tronco dos camundongos ApoE-KO mostrou que a aterosclerose aumenta o número de células tronco mesenquimais e hematopoéticas da medula óssea provavelmente através do aumento das divisões simétricas estimuladas pela progressão da placa aterosclerótica. Nos animais controle observamos aumento progressivo do número de células tronco hematopoéticas e diminuição do número de células tronco mesenquimais. Na análise de genotoxicidade das células da medula óssea observamos alto nível de fragmentação do DNA nas células mononucleares da medula óssea dos animais ateroscleróticos possivelmente pela ação dos radicais livres produzidos durante a progressão da placa aterosclerótica, o que também foi evidenciado pela senescência dos arcos aórticos analisados. Em contraste, o grupo C57 apresentou baixo nível de fragmentação do DNA e, portanto uma baixa senescência vascular, ou seja, o sistema de reparo é eficiente. Observamos também que o avanço da idade aumentou do número de células tronco hematopoéticas, ou seja, nessa linhagem de células não ocorre perda da capacidade proliferativa, o que não acontece com a linhagem mesenquimal.

Palavras-chave: Aterosclerose. Células Tronco. Genotoxicidade

ABSTRACT

Currently stem cells have been target of many studies, many of them using cellular therapy in the cardiovascular diseases. However, little is known about the mechanisms that modify function and mobilization of the stem cells when submitted to the senescence and atherosclerosis. The analysis of stem cells of the ApoE-KO mice disclosed that atherosclerosis increases the number of mesenchymal and hematopoietic cells on the bone marrow probably through the increase of the symmetrical divisions stimulated by the progression of the atherosclerotic plaque. Analysis of control group showed increased number of hematopoietic stem cells and diminished number of mesenchymal stem cells. Genotoxicity assay revealed high level of DNA fragmentation in the mononuclear cells of the bone marrow in the atherosclerotic group that occurs because of the production of free radicals in atherosclerosis, what also it was evidenced by the senescence of the analyzed aortic root. In contrast, the C57 group presented low level of DNA fragmentation and, therefore low vascular senescence. We also observed that aging increased the number of hematopoietic stem cell in this group, that is, this lineage of cells does not loss the proliferative capacity, and it does not happen with the mesenchymal lineage.

Keywords: Atherosclerosis. Stem Cells. Genotoxicity.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. ATEROSCLEROSE

1.1.1. HISTÓRICO

A primeira descrição da aterosclerose foi dada na segunda metade do século XIX, por Virchow que propôs que as lesões seriam decorrentes da “insudação” de plasma para a camada íntima das artérias resultando em um processo proliferativo localizado. (GIANNINI, 2000) A outra teoria, da “incrustação”, foi defendida por Von Rokitansky, em 1852, na qual ele imaginava que inicialmente, as alterações vasculares ocorriam em virtude de pequenos trombos, que ao se organizarem, incorporavam e espessavam a camada íntima. Segundo sua teoria os lipídios se acumulariam secundariamente na íntima. (BOGLIOLO, 2006).

Atualmente sabe-se que a aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão ao endotélio vascular, acometendo a camada íntima de artérias de grande e médio calibre. (LIBBY, 2006)

Embora possa ser encontrada em qualquer artéria de grande ou médio calibre, a doença é mais comum na aorta, especialmente na porção abdominal, e nos seus ramos principais, como artérias coronárias, carótidas, ilíacas, femorais e também é freqüente nos óstios das artérias renais e mesentéricas. (BOGLIOLO, 2006)

1.1.2. DEFINIÇÃO DE ATEROSCLEROSE

A OMS define a aterosclerose como a doença de artérias de grande e médio calibre caracterizada por alterações representadas pelo acúmulo, na íntima, de lipídios, carboidratos complexos, componentes do sangue, células e material intercelular. (BOGLIOLO, 2006)

Segundo as III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias, a aterosclerose é um processo dinâmico, evolutivo, a partir de dano endotelial de origem multifatorial, com características de reparo tecidual. (III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias, 2001)

1.1.3. FATORES DE RISCO

A aterosclerose resulta da interação de vários fatores como, por exemplo: genéticos, dieta, tabagismo, sedentarismo, hipertensão arterial, diabetes e obesidade. De todos eles, a hiperlipidemia é o mais importante.

HIPERLIPIDEMIA – Os lipídios são transportados no sangue sob a forma de agregados moleculares, as lipoproteínas, que são incorporadas às células por meio de receptores específicos da membrana e metabolizadas por sistemas enzimáticos próprios. As lipoproteínas são divididas em classes, que se diferenciam pelo tamanho, pela densidade e pela composição tanto lipídica quanto como apoprotéica:

1) Quilomícron, partícula rica em triglicerídios, produzida no intestino após as refeições;
2) Lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), a principal carreadora de triglicerídios endógenos (produzida no fígado);
3) Lipoproteína de densidade intermediária (IDL), que deriva da transformação de VLDL em LDL e tem vida curta;
4) Lipoproteína de baixa densidade (LDL), derivada da IDL, é a principal transportadora do colesterol para as células;
5) Lipoproteína de alta densidade (HDL), que transporta o colesterol das células para o fígado, de onde é excretado pela bile.

(TOUTOUZAS *et al*.,1998; BOGLIOLO, 2006)

Os lipídios exercem vários efeitos nas artérias:

- Hiperlipidemia, especialmente hipercolesterolemia, causa disfunção endotelial que, entre outras conseqüências, provoca diminuição da síntese de substâncias vasodilatadoras. Pelo aumento dos espaços interendoteliais, as lipoproteínas atravessam a camada endotelial e acumulam-se no espaço subendotelial das artérias, o que representa um passo inicial importante da gênese da doença.

- Acúmulo progressivo de lipídios na íntima contribui para a formação e crescimento das lesões ateromatosas.

- Sob a ação de radicais livres, LDL transforma-se em LDL oxidada. Suas principais propriedades são: (1) A LDL oxidada permanece mais tempo na circulação e penetra mais facilmente na íntima das artérias; (2) é rapidamente fagocitada por macrófagos através dos receptores *scavengers*. Como a degradação da LDL oxidada é mais difícil, as células transformam-se em células espumosas; (3) exerce quimiotaxia para leucócitos e induz a síntese de moléculas de adesão na superfície endotelial, facilitando a aderência de monócitos; (4) é citotóxica para células endoteliais; (5) estimula a liberação de fatores de crescimento para células musculares lisas; (6) é imunogênica, induzindo a produção de anticorpos. (BOGLIOLO, 2006)

DIETA POBRE EM ANTIOXIDANTES

A oxidação da LDL é importante na gênese da aterosclerose, por isso os antioxidantes são importantes na prevenção da doença.

HIPERTENSÃO ARTERIAL

Indivíduos hipertensos apresentam disfunção endotelial e redução da síntese de óxido nítrico, o que resulta em aumento da resistência vascular periférica e proliferação da musculatura lisa.

TABAGISMO

- Disfunção endotelial
- Aumento dos radicais livres no sangue
- Viscosidade é aumentada, podendo formar trombos
- Aumento do colesterol plasmático
- Aumento da oxidação de LDL

DIABETES MELLITUS

- Disfunção endotelial com diminuição da síntese de substâncias vasodilatadoras
- Alterações da matriz extracelular
- Aumento da oxidase de glicídeos e lipídios no plasma
- A insulina atua como fator de crescimento para células musculares lisas
- Aumento da adesividade de plaquetas
- Hipoglicemia causa ativação de monócitos
- Sistema de antioxidantes são menos eficientes

ETNIA

Indivíduos afro-descendentes têm, em geral, maior tendência a níveis elevados de pressão arterial sistólica e diastólica.

SEXO

Os homens são mais susceptíveis a desenvolver aterosclerose que as mulheres na idade fértil devido aos hormônios protetores femininos.

OBESIDADE

Além de a obesidade estar associada a fatores genéticos, muitas vezes os obesos tem outros fatores de risco associados como hiperlipidemia, hipertensão e diabetes.

ALCOOL

O consumo moderado de álcool pode diminuir o risco de desenvolvimento de aterosclerose, aumentando a síntese de HDL.

ENVELHECIMENTO

Diminuição dos fatores de relaxamento do endotélio, diminuição da liberação de óxido nítrico.

(TOUTOUZAS *et al*.,1998; BOGLIOLO, 2006)

1.1.4. ATEROGÊNESE

Os fatores de risco já citados como, por exemplo, hipertensão, diabetes e tabagismo são capazes de lesar o endotélio vascular causando disfunção endotelial. Com a disfunção do endotélio a camada íntima fica mais permeável a lipoproteínas que ficam retidas no espaço subendotelial. (PAOLETTI *et al.,*2004)

O LDL aprisionado sofre oxidação, provavelmente pela ativação do complexo NADPH oxidase dos macrófagos, e torna-se imunogênico causando assim liberação de fatores inflamatórios. Ocorre aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície endotelial, principalmente VCAM-1 e P-selectinas, que resulta no recrutamento de mais leucócitos, principalmente os da linhagem mononuclear (monócitos e linfócitos) que são atraídos para o local da formação da placa. (PAOLETTI *et al*.,2004; LIBBY,2002)

Uma vez na íntima, os monócitos são transformados em macrófagos (Figura 1) que possuem receptores especiais chamados *scavengers* (depuradores) que fagocitam as moléculas de LDL oxidado. A estrutura formada por macrófagos com LDL oxidado é chamada de células espumosas, que são componentes das estrias gordurosas e caracterizam a lesão inicial da aterosclerose. (IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose, 2007; PAOLETTI *et al*.,2004; LIBBY,2002).

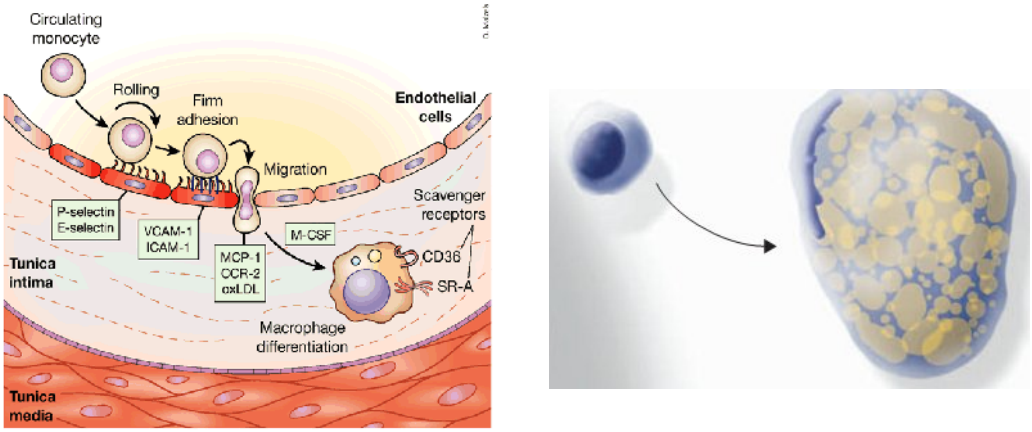


Figura 1 – Entrada dos monócitos na camada íntima (esquerda) transformação em macrófagos que fagocitam LDL oxidada (direita). (LI & GLASS, 2002).

Com a evolução da placa aterosclerótica, os macrófagos e os linfócitos T são estimulados a secretar fatores inflamatórios como, por exemplo, interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) que aumentam o recrutamento de leucócitos para o local da placa. Também são secretados fatores de crescimento, como por exemplo, fatores de crescimento derivados de plaquetas e fibroblastos (PDGF, FGF) que fazem com que as células musculares lisas da camada média migrem para a camada íntima e proliferem. A partir deste estágio a placa passa a ser considerada ateromatosa. (LIBBY, 2002)

Em seres humanos existem dois tipos de placas ateroscleróticas, as estáveis e as instáveis. As placas ateroscleróticas estáveis caracterizam-se por predomínio de colágeno, organizado com capa fibrótica espessa, escassas células inflamatórias e núcleo lipídico menos proeminente. As instáveis têm atividade inflamatória intensa, grande atividade proteolítica, núcleo lipídico proeminente e capa fibrosa tênue, podendo ocorrer ruptura/trombose. (IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose; PAOLETTI *et al*.,2004; LIBBY,2002).

1.1.5. CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES ATEROMATOSAS

As lesões podem ser:

1. Estrias gordurosas (em inglês: *fatty streaks*): lesões planas, de coloração amarelada, sob a forma de faixas com elevado teor de gordura, são as lesões mais precoces da doença, podendo ser observadas nas primeiras décadas de vida.
2. Placas fibrosas ou fibrolipídicas: formações de consistência aumentada, elevadas na superfície da íntima, diminuem um pouco a luz do vaso.
3. Lesões complicadas: determinadas por distúrbios (hemorragia, ulceração, trombose, calcificação) na placa fibrosa, podendo ser responsável por importantes manifestações clínicas, como por exemplo, interromper o fluxo sanguíneo para diversos órgãos. (GIANNINI, 2000)

Baseada na estrutura microscópica e histoquímica, as lesões ateroscleróticas podem ser classificadas em:

Lesão inicial (tipo I)

É representada pelo acúmulo de lipoproteínas e poucos macrófagos contendo lipídios (células espumosas) na íntima. As alterações são discretas e, macroscopicamente, a artéria é normal. Essa lesão ocorre nas artérias elásticas, como a aorta. Essas modificações só podem ser identificadas por meio microscópico ou quimicamente. Não há dano tecidual visível.

Estria lipídica ou gordurosa (tipo II)

Na intima são vistas áreas amareladas planas, acompanhando o eixo do vaso: ao microscópio são vistas células espumosas, sobretudo macrófagos e, em menor quantidade, células musculares lisas.

Estrias lipídicas (Figura 2) podem ser encontradas já na infância. Com o tempo podem desaparecer ou aumentar.

Figura 2 – Aorta mostrando estrias lipídicas coradas com Sudam Vermelho (esquerda) e não corada (direita). (RUBIN *et al*., 2008)

Placa Pré-ateromatosa (lesão intermediária, tipo III)

Progressão da lesão tipo II, representada por acúmulos exacerbados de lipídios extracelulares na lesão, contudo, sem a formação de um núcleo central com lipídios.

Placa Ateromatosa (tipo IV)

Apresenta-se macroscopicamente como lesão arredondada, ovóide ou alongada, cor amarelada e consistência macia, formando um núcleo de gordura (*lipid core*) que faz saliência para luz vascular. Histologicamente, a lesão é formada por massa de material amorfo, branco amarelado, localizada na intima e recoberta por capa fibrosa e densa. São vistos também macrófagos e células musculares lisas, muitas contendo lipídeos no citoplasma e formando as células espumosas.

Placa Fibroateromatosa (tipo V)

É formada por fibroblastos e musculatura lisa, podendo conter pequenos depósitos de lipídeos. Essa lesão resulta da reabsorção de lipídios pelo organismo, processo esse que reduz o tamanho da lesão e a transforma em uma placa fibrosada.

Lesões complicadas (tipo VI)

Ocorre ulceração ou ruptura da placa. A ulceração decorre da ruptura da capa fibrosa e resulta em exposição da massa necrótica ao sangue circulante. Com a liberação de fragmentos do material necrótico na circulação, formam-se pequenos êmbolos que podem causar obstrução de arteríolas e capilares.

Lesão calcificada (tipo VII)

Lesão avançada com presença de cálcio. Presença de deformidade estrutural.

Lesão fibrótica (tipo VIII)

Qualquer lesão avançada com composição predominante de colágeno, lípides em mínima quantidade ou ausentes.

(BOGLIOLO, 2006; GIANNINI, 2000)

A figura 3 mostra a evolução da placa aterosclerótica.

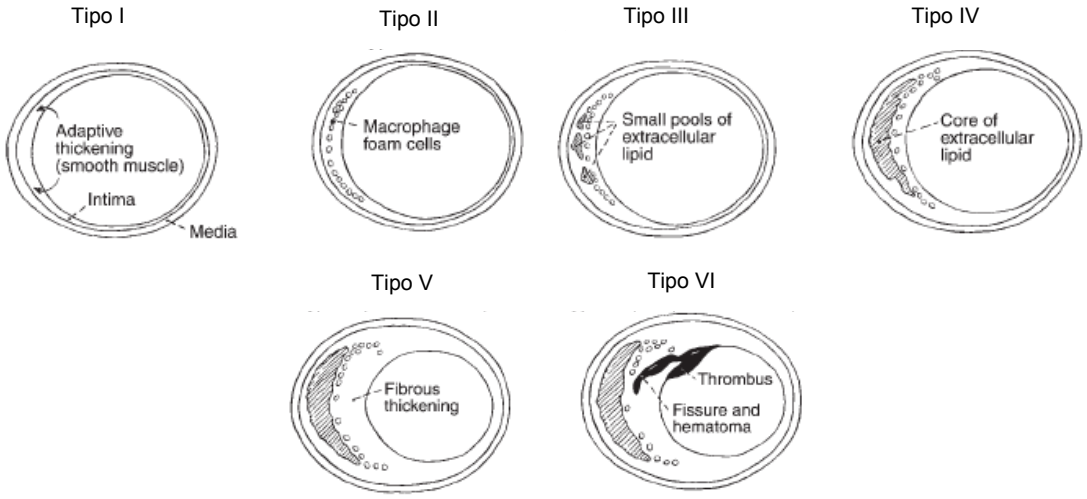


FIGURA 3 – A figura acima mostra a progressão da placa aterosclerótica dos estágios inicias (tipos 1 e 2) aos estágios mais avançados (tipos 3, 4, 5 e 6) (STARY et al., 1995).

1.1.6. ESTRESSE OXIDATIVO

Os radicais livres têm sido implicados em um grande número de doenças que afetam o ser humano. Radicais livres são moléculas que contém um ou mais elétrons não pareados em seu orbital e, portanto, apresentam alta avidez para reagir com átomos de outras moléculas. Essas espécies químicas são instáveis, têm uma meia vida muito curta (cerca de segundos) e reagem rapidamente com diversos compostos e alvos celulares. (RODRIGUES, 2007; OGA, 1996)

O oxigênio desempenha papel fundamental na formação de radicais livres, dando origem às espécies reativas de oxigênio (ROS). (RODRIGUES, 2007) As células vivas presentes em uma atmosfera rica em oxigênio estão constantemente expostas aos possíveis danos causados pelas ROS, que podem ser geradas endogenamente e exogenamente.

As fontes exógenas que originam às ROS incluem as radiações ultravioleta e ionizantes e agentes químicos. Já as ROS endógenas são formadas pelo próprio metabolismo celular através da mitocôndria. Processos patológicos também produzem ROS, como no caso das respostas inflamatórias. (BERRA & MENCK, 2006)

A respiração mitocôndrial é fonte de produção de energia para todos os seres vivos e, além disso, maior produtora de espécies reativas de oxigênio. Porém, em um organismo sadio os radicais produzidos são neutralizados pelo sistema antioxidante. (WEINERT & TIMIRAS, 2003)

O estresse oxidativo refere-se ao desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo (Figura 4), decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos, devido à menor formação ou maior consumo, ou do aumento da geração de espécies oxidantes. Tudo isso gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares. (BARROS, 2007; OGA, 1996)

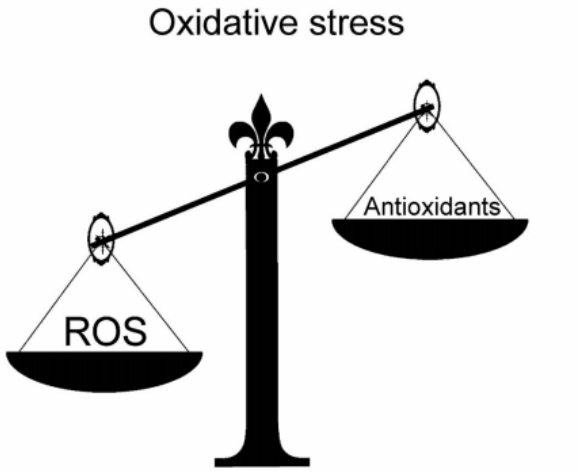


Figura 4 – Estresse oxidativo. (KUNITOMO, 2007)

As espécies reativas de oxigênio por serem espécies altamente instáveis interagem com proteínas, lipídios e principalmente com o DNA, produzindo danos que se não forem reparados podem se tornar irreversíveis. (BARJA, 2002).

Foram identificados até hoje mais de 20 tipos de danos no DNA, causados por radicais livres. Os principais tipos de dano ao DNA são quebras simples ou duplas das fitas, bases modificadas, sítios abásicos e *crosslinks* de DNA com DNA e proteínas. (ONUKI, 2000).

Sabe-se que o reparo do DNA está intimamente ligado com a manutenção normal do ciclo celular, transcrição e replicação. Quando o tipo e a quantidade de danos superam a capacidade de reparo das células, os mecanismos básicos e essenciais para regulação do ciclo celular são afetados, podendo provocar efeitos genotóxicos severos. (BERRA & MENCK, 2006)

1.1.7. ESTRESSE OXIDATIVO E ATEROSCLEROSE

Muitos estudos mostram a presença de danos na molécula de DNA tanto nos linfócitos da circulação quanto nas placas ateroscleróticas de indivíduos doentes. Aproximadamente $2x10^4$ eventos que causam danos ao DNA ocorrem em cada célula por dia. A maior parte dos danos é causada pelas espécies reativas de oxigênio. No vaso a principal fonte produtora de ROS é a enzima NADPH oxidase. (MAHMOUDI *et al*., 2006)

O complexo enzimático NADPH oxidase (Figura 5) é um dos maiores produtores de radicais livres no organismo. Está presente nas membranas celulares de macrófagos, células endoteliais, neutrófilos, fibroblastos e outras células. Sabe-se que há um aumento na produção de radicais livres nas doenças cardiovasculares. Logo, ocorre aumento da atividade da enzima NADPH oxidase, onde os radicais são liberados na circulação sanguínea e interagem com lipídios, proteínas e principalmente moléculas de DNA. (DWORAKOWSKI, 2006)

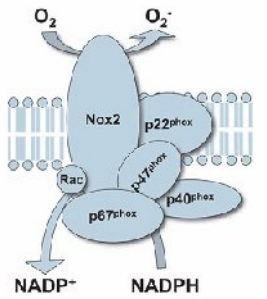


Figura 5 – Estrutura do complexo NADPH oxidase. (DWORAKOWSKI, 2006)

As ROS possuem um papel importante no desenvolvimento da aterosclerose através do complexo NADPH oxidase que causa: 1) dano oxidativo do endotélio vascular, 2) ativação de monócitos e macrófagos podendo gerar mais ROS, 3) modificação dos receptores de LDL sobre o macrófago na lipoperoxidação, 4) peroxidase LDL que pode causar danos nas células endoteliais, 5) produtos da oxidação de LDL que promovem calcificação nas lesões. (GONZALES *et al*., 2001).

1.2. CAMUNDONGO APOE KNOCKOUT (KO)

O camundongo Knockout para apolipoproteina E foi desenvolvido para representar um modelo de estudo da aterosclerose. Em 1992 dois laboratórios produziram simultaneamente o modelo de hipercolesterolemia. Para isso o gene que codifica a apoliproteina E foi inativado nas células tronco embrionárias de um camundongo saudável. Em seguida essas células foram inseridas em blastômeros de camundongos C57.

Foram gerados filhotes heterozigotos e homozigotos para a ApoE-*Knockout*. Através de cruzamentos entre as linhagens homozigotas foi originado o camundongo ApoE-KO que apresenta elevados níveis de VLDL no plasma (Figura 6). (PLUMP *et al*., 1992)

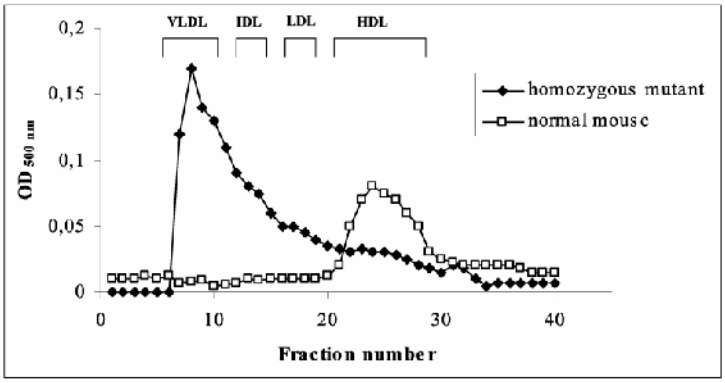


Figura 6 – Frações de colesterol (VLDL, ILD, LDL e HDL) encontradas em camundongos saudáveis e ApoE-KO homozigotos. (JAWIEN *et al*., 2004)

A apolipoproteina E é uma glicoproteína, presente na membrana das lipoproteínas. É sintetizada primariamente no fígado, mas também pode ser produzida em vários tecidos. Pode ser encontrada no plasma mas reside preferencialmente nas VLDL, IDL e HDL respectivamente. A ApoE tem a função de retirar do plasma as VLDL e IDL via receptor de LDL.

Portanto, sem a apolipoproteina E ocorre aumento do colesterol plasmático para valores superiores a 500mg/dl, a maioria de VLDL. A dieta rica em colesterol pode quadruplicar esse valor. A partir dos 3 meses de idade, com dieta normal, já é possível observar na aorta destes animais a presença de estrias gordurosas. Na 15ª semana de vida observa-se a presença de lesões intermediárias com células espumosas e células musculares lisas. Placas fibrosas aparecem na 20ª semana de vida. (MEIR & LEITERSDORF, 2004; PLUMP *et al*., 1992)

1.3. CÉLULAS TRONCO

1.3.1. HISTÓRICO

O Titan grego Prometheus, é um símbolo de luta para a medicina regenerativa. Como punição por ter dado o fogo aos homens, Zeus ordenou que Prometheus fosse acorrentado a uma pedra e que uma águia comesse dia após dia seu fígado. O fígado de Prometheus era capaz de regenerar-se a cada dia, permitindo que ele sobrevivesse. Atualmente poderíamos explicar esse fenômeno mitológico através das células tronco. Pesquisadores de todo o mundo esperam fazer com que o lendário conceito de regeneração se torne realidade com o desenvolvimento de terapias celulares utilizando as células tronco. (NIH, *Regenerative Medicine*, 2006)

Há séculos os cientistas sabem que alguns animais têm a capacidade de regenerar partes lesionadas de seu corpo. Na verdade os humanos compartilham desta característica especial. Apesar de não sermos capazes de regenerar um membro, o nosso organismo repõe constantemente nossas células sanguíneas, pele e outros tecidos quando necessário. A identificação das células tronco capazes de regeneração ocorreu através de experimentos por volta de 1950 envolvendo a medula óssea. (*National Academy of Sciences, Understanding Stem cells*, 2005)

A busca por células tronco começou depois do ataque das bombas atômicas em Hiroshima e Nagasaki em 1945. Pessoas que morreram nos anos seguintes à tragédia tiveram seus sistemas hematopoéticos comprometidos. Altas doses de radiação mataram as células do trato intestinal destas pessoas, resultando em uma morte rápida. O conceito de célula tronco originou-se dos estudos de Till e McCulloch em 1961, que mostraram a reconstituição do sistema hematopoético de camundongos letalmente irradiados após o transplante de células da medula óssea de camundongos singênicos saudáveis. (NIH, *Regenerative Medicine*, 2006; ZAGO & COVAS, 2006; TILL & McCULLOCH, 1961).

Surpreendentemente, os pesquisadores descobriram que se um osso do animal é poupado da radiação, este pode regenerar todo o sistema hematopoético através das células da medula óssea. A partir deste descobrimento varias pesquisas foram realizadas com intuito de tratar casos de regeneração do sistema hematopoético através da injeção de células de medula óssea intacta nos pacientes. (NIH, *Regenerative Medicine*, 2006; ZAGO & COVAS, 2006)

1.3.2. DEFINIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

Apesar da enorme diversidade de células encontradas nos tecidos adultos de um organismo, todas elas derivam de uma única célula-ovo, gerada na fecundação do óvulo pelo espermatozóide. A célula-ovo tem a capacidade de formar a partir daí todos os tipos de tecidos de um indivíduo adulto. Esta célula começa a sofrer mitose e formar várias células que, com o tempo, vão se tornando especializadas em somente um tipo de tecido.

No entanto, existem as células que além de se diferenciarem em células específicas do tecido, também mantém a própria reserva de células indiferenciadas, as células tronco. (ZAGO & COVAS, 2006)

De maneira geral as células tronco podem ser definidas como aquelas capazes de auto-renovação ilimitada ou prolongada e que podem também dar origem a pelo menos um tipo celular em estágio de diferenciação mais avançado. (MEIRELLES, 2007).

As células tronco diferem de outras células do organismo por apresentarem características importantes. Primeiramente são células indiferenciadas e não especializadas, capaz de se multiplicar por longos períodos mantendo-se indiferenciada, ou seja, produzindo células idênticas à célula mãe.

Outra característica muito especial é que estas são capazes de fazer divisão assimétrica (Figura 7), produzindo duas células filhas, uma é idêntica à célula mãe, indiferenciada, e que continua contribuindo para reposição celular, e a outra que se diferencia conforme a necessidade do tecido. (ZAGO & COVAS, 2006; FISCHBACH & FISCHBACH, 2004)

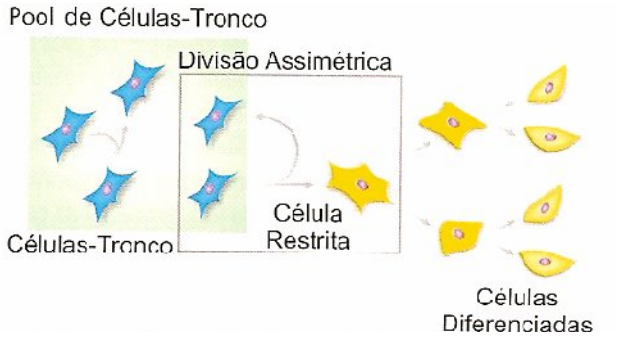


Figura 7 – A figura mostra a divisão simétrica, que dá origem a células tronco idênticas a célula mãe e a divisão assimétrica, a qual dá origem a uma célula idêntica a célula mãe e outra especializada . (ZAGO & COVAS, 2006)

1.3.3. MEDULA ÓSSEA

Durante o desenvolvimento dos mamíferos, as células tronco mudam de nicho, ocupando sequencialmente o saco vitelino, fígado fetal e a medula óssea, que é a principal fonte de células tronco na fase adulta. (ZAGO & COVAS, 2006)

O compartimento medular é muitas vezes descrito compondo-se basicamente de compartimentos hematopoéticos e estromais, o qual é composto de fibroblastos, adipócitos, nervos e sistema vascular (Figura 8). (MEIRELLES, 2007; KOPP *et al*., 2005)

Devido à sua localização e densa compactação celular, o microambiente das células tronco é pouco acessível a estudos *in vivo*, de modo que grande parte do conhecimento sobre função e componentes ainda é superficial. (ZAGO & COVAS, 2006).

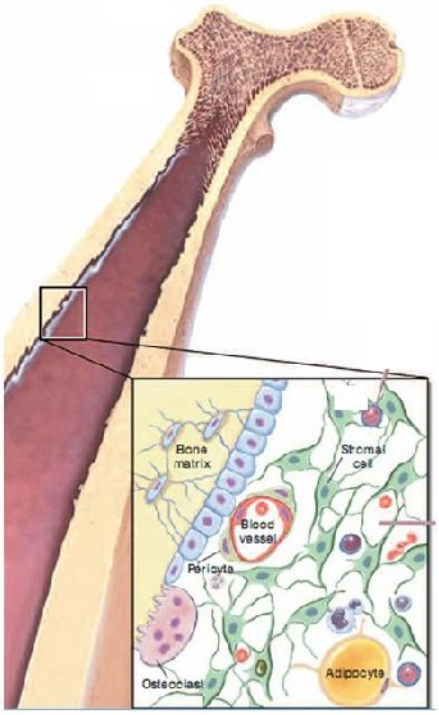


Figura 8 – Medula óssea com compartimento estromal e hematopoético (Modificado de ZAGO & COVAS, 2006)

1.3.4. CLASSIFICAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO

1.3.4.1. QUANTO A POTENCIALIDADE

As células tronco são classificadas quanto à potencialidade, ou seja, capacidade de gerar tipos celulares, em quatro grupos: totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes.

O zigoto e as células resultantes das primeiras divisões são chamados de totipotentes. Até a fase de oito células podem-se gerar todos os tipos de tecidos e até um organismo inteiro.

As células pluripotentes são aquelas derivadas da massa interna do blastocisto e conseguem diferenciar-se na maioria dos tecidos, exceto nos anexos embrionários.

As células multipotentes têm a capacidade de originar, até onde se sabe, um tipo de tecido, mas se estimulada pode dar origem a um número limitado de tecidos. Já as células tronco unipotentes têm capacidade de se dividir apenas em um tipo específico de célula. (NETO & DESSEN, 2005)

Tabela 1 – Classificação quanto a potencialidade das células tronco.

CLASSIFICAÇÃO	DESCRIÇÃO
Totipotente	Dá origem ao embrião e anexos placentários. No grupo destas células estão zigoto e primeiros blastômeros.
Pluripotente	Dão origem aos 3 folhetos embrionários. Encontram-se neste grupo as células da massa interna do blastocisto e epiblasto.
Multipotente	Dão origem a somente um tipo de folheto embrionário.
Unipotente	São células tronco específicas para um tipo de tecido.

1.3.4.2. QUANTO A ORIGEM

As células tronco também podem ser classificadas quanto a origem em embrionárias e adultas. As células tronco embrionárias, células pluripotentes dotadas de grande plasticidade, compreendem aquelas da massa interna do blastocisto de um embrião nos primeiros estágios de divisão. As células tronco adultas são encontradas no indivíduo adulto, por exemplo, células hematopoéticas e mesenquimais obtidas da medula óssea, células de cérebro, pele, gordura, polpa dentária, cordão umbilical, placenta entre outras. Até o momento não foram identificadas nos tecidos adultos células pluripotentes capazes de se diferenciarem em todos os tipos de tecido.

De fato, as células tronco multipotentes encontradas no tecido adulto têm capacidade de diferenciação ampla sendo muito importante na manutenção do tecido. Até pouco tempo, sabia-se pouco da existência de células tronco em tecidos adultos, as principais eram: as células tronco hematopoéticas da medula óssea, células gastrintestinais, células da camada epidérmica e espermatogônias.

Acreditava-se que estas células nos tecidos adultos tinham apenas função de reposição quando necessário, entretanto, estudos recentes mostram que a potencialidade, ou seja, a capacidade de diferenciação em outros tipos de células era maior do que se imaginava. (NETTO & DESSEN, 2005).

1.3.4.3 QUANTO AOS TIPOS

1.3.4.3.1.HEMATOPOÉTICAS

Pesquisas com células troco hematopoéticas (CTH) começaram em 1945 com pessoas que foram expostas a radiação após as bombas em Hiroshima. Experimentos com camundongos irradiados logo mostraram o efeito benéfico do transplante de medula óssea de camundongos sadios para camundongos irradiados. Os animais saudáveis continham em sua medula óssea células tronco hematopoéticas multipotentes capazes de regenerar o sistema hematopoético dos camundongos doentes. (NIH, *Stem Cells*, 2001)

As células tronco hematopoéticas têm habilidade de: 1) auto-renovação 2) diferenciação em vários tipos de células do sangue (Figura 9), linhagem mielóide – granulócitos, monócitos, plaquetas e eritrócitos e linhagem linfóide – linfócitos B e T e NK 3) mobilizar-se para fora da medula óssea em direção ao sangue periférico 4) sofrer morte programada (apoptose). (NIH, *Stem Cells*, 2001)

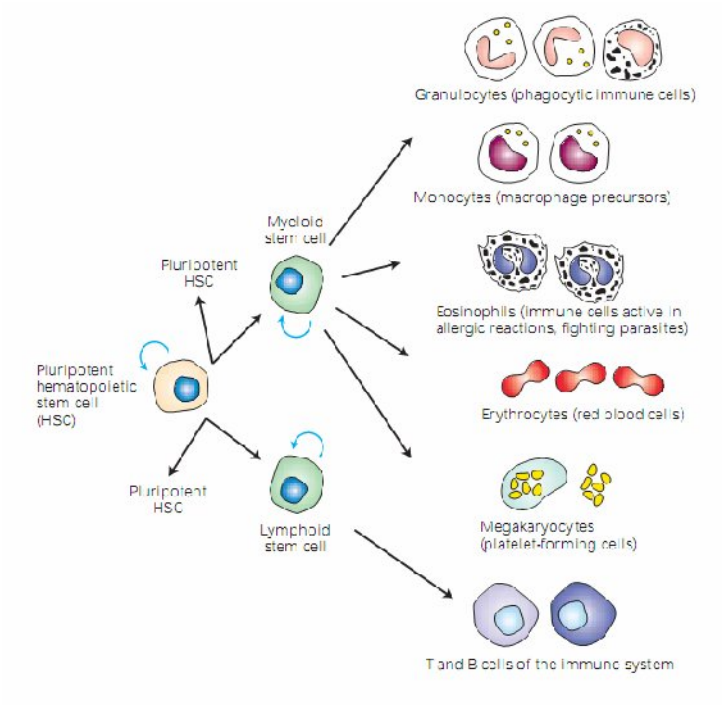


Figura 9 – Células tronco hematopoéticas e linhagens. (Modificada de LODISH *et al*., 2004)

As CTH constituem uma população de células multipotentes muito rara, correspondendo a aproximadamente 0,05% a 0,5% do total de células da medula óssea e menos ainda no sangue periférico. Em um individuo normal, os níveis das células maduras no sangue são mantidos dentro de limites estreitos e, em resposta a emergências como perda sanguínea ou infecções, os tecidos hematopoéticos são capazes de responder rapidamente aumentando a produção celular. Em adultos, diariamente são produzidos bilhões de novas células sanguíneas devido ao curto período de vida destas células. (ZAGO & COVAS, 2006).

Para identificar e estudar uma célula tronco hematopoética é necessário conhecer seus antígenos de superfície os quais são proteínas que podem ser utilizadas como marcadores de populações celulares e que permitem sua seleção.

A célula tronco hematopoética possui uma infinidade de marcadores de superfície, como por exemplo CD34+, CD38-, CD33-, Thy-1 ^{low}, CD71-, lin-, Ho33342, c-kit. Esse conjunto de marcadores de superfície tem sido explorado para o isolamento das CTH por citometria de fluxo ou através do emprego de microesferas magnéticas. (ZAGO & COVAS, 2006)

A medula óssea é a principal fonte de CTH. Há mais de 40 anos o transplante de medula óssea é utilizado como fonte de células para pessoas com problemas no sistema hematopoético. As CTH podem ser obtidas também do sangue periférico pela mobilização através de citocinas, como GCSF, por exemplo, no qual as CTH são recrutadas a partir da medula para o sangue aumentando muito o número de células para o transplante. (ZAGO & COVAS, 2006)

Estudos mostraram que as CTH são capazes de se diferenciarem não somente em células sanguíneas, mas também em vários outros tipos de células como células musculares (miócitos e cardiomiócitos), cerebrais, fígado, intestinais, pele, pulmão, rins e pancreáticas. (NIH, *Regenerative Medicine*, 2006)

Outra característica importante que as CTH possuem é o *homing*, que corresponde à capacidade que essas células tem de migrar do sangue periférico para a medula óssea. Esse fenômeno foi conservado durante a evolução dos mamíferos e tem a finalidade de repovoar a medula óssea quando necessário. Um exemplo dessa ação é o retorno das células tronco hematopoéticas para a medula óssea após um transplante. (NIH, *Stem Cells*, 2001)

Entre o grande número de células tronco adultas atualmente conhecidas, a célula tronco hematopoética ocupa a honrosa posição de ter sido a primeira descrita, sendo ainda a melhor compreendida e utilizada. O transplante de células tronco hematopoéticas é ainda hoje a única forma de tratamento com células tronco humanas cuja aplicação já faz parte do arsenal médico no mundo todo. (ZAGO & COVAS, 2006).

Estudos recentes demonstraram que as células tronco da medula óssea adulta apresentam capacidade semelhante às células embrionárias pluripotentes, capazes de promover reparos em tecidos, como tecido muscular cardíaco, músculo esquelético, cerebral, epitelial e células do fígado entre outras funções. Por esse motivo essas células têm sido alvo de inúmeras pesquisas na área médica. (NIH, *Regenerative Medicine*, 2006)

1.3.4.3.2. MESENQUIMAIS

A primeira evidência da existência de células tronco mesenquimais, ou estromais, advém das observações feitas pelo patologista Julius Cohnheim em 1867. Em seus estudos de cicatrização ele reparou que a maioria das células presentes na lesão eram derivadas da circulação. Além das células inflamatórias, Cohnheim descreveu células com formato de fibroblastos que acreditava ser proveniente da medula óssea. (MEIRELLES, 2007) Somente em 1966 essas células foram descritas mais detalhadamente por Friedenstein e colaboradores.

Em seus experimentos, amostras de suspensão de medula óssea com meio de cultura eram cultivadas em frascos de cultura. A fração de células que aderia ao frasco era cultivada separadamente. Após alguns dias eram vistos na cultura aglomerados de células em forma de fibroblastos, que foram denominadas células formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F = *colony forming units - fibroblastic*). (Friedenstein *et al.,*1966).

Nos anos seguintes, pesquisadores observaram que as células que eram cultivadas pelo método de Friedenstein eram capazes de se diferenciar em osteoblastos, condroblastos, adipócitos e mioblastos. (MEIRELLES, 2007; ZAGO & COVAS, 2006; FEHRER & LEPPERDINGER, 2005) Em 1991 Arnold Caplan sugeriu a denominação células tronco mesenquimais para este tipo celular (CAPLAN, 1991)

A célula tronco mesenquimal encontrada na medula óssea, é uma população rara de células multipotentes, aproximadamente 1 em cada 27.000 células nucleadas da medula óssea ou cerca de 0,001% a 0,01% são CTM. (ZAGO & COVAS, 2006; MEIRELLES, 2007) Além da medula óssea alguns estudos descrevem também

outras fontes de células tronco mesenquimais como parede das artérias, tecido adiposo, cordão umbilical, placenta, fluido amniótico, sangue periférico, fígado fetal, pulmão e polpa dentária. (BOBIS *et al*., 2006)

Portanto, essas células são importantes porque são capazes de gerar sob estímulos específicos: ossos, tendão, cartilagem, tecidos adiposo e musculares, estroma medular e até mesmo células com características neurais. (ZAGO & COVAS, 2006; MEIRELLES, 2007)

Estudos mostraram que também podem originar células endoteliais e células musculares cardíacas o que as torna úteis no tratamento das doenças cardiovasculares. (ZAGO & COVAS, 2006) Além disso, as células tronco mesenquimais encontradas na medula óssea são essenciais para formação do microambiente no qual as células hematopoéticas crescem e desenvolvem (RATAJCZAK *et al.,* 2007).

Fenotipicamente, as células tronco mesenquimais expressam um grande número de marcadores de superfície. Entretanto poucos são específicos. Entre os marcadores mais utilizados estão: CD105, CD73, CD44, CD90 (Thy-1), CD71, Stro-1 e moléculas de adesão CD106 (VCAM-1 = vascular cell adhesion molecule), CD166 (ALCAM = activated leukocyte cell adhesion molecule), ICAM-1(intercellular adhesion molecule) e CD29. (CHAMBERLAIN *et al*., 2007).

Outra propriedade muito importante das células tronco mesenquimais é que estas quando são liberadas na circulação sanguínea, via infusão intravenosa, são capazes de migrar especificamente para locais de injúria. Esta extraordinária habilidade de procurar o local de dano foi demonstrada em estudos de fratura óssea, infarto do miocárdio, injúria cerebral isquêmica. (Barry & MURPHY, 2004) O interesse neste tipo celular cresceu muito nos últimos anos devido ao grande potencial de regeneração de tecidos e órgãos lesados.

1.4. SENESCÊNCIA

O organismo responde ativamente aos estímulos e necessidades de seu meio, adaptando-se prontamente as novas circunstâncias. Componentes fundamentais das células, como DNA, proteínas e lipídios são protegidos para garantir o bom funcionamento do organismo. Danos moderados são tolerados, porém, quando acontecem oxidações severas em proteínas estas são automaticamente degradadas e eliminadas, evitando assim uma disfunção celular. O mesmo procedimento é adotado quando o DNA sofre uma mutação que compromete sua função. Entram em cena os mecanismos de reparo e excisão de bases para corrigir o erro. (GONZALES *et al*., 2001)

Quando esses processos fisiológicos de reparo ou eliminação entram em declínio, não necessariamente todos ao mesmo tempo, inicia-se o envelhecimento ou senescência. O termo senescência surgiu através dos experimentos de Hayflick com culturas, ele observou que após algum tempo as células perdiam a capacidade de se dividir entrando em um estado que ele chamou de senescência. (HAYFLICK & MOORHEAD, 1961)

O envelhecimento é um processo natural e complexo que envolve cada molécula, célula e órgão do corpo. Neste sentido, o envelhecimento é resultado do acúmulo de danos somáticos durante toda vida. Entretanto, estas mutações que ocorrem durante a vida não são necessariamente problemáticas, e usualmente não afetam a viabilidade das células, resultam em senescência celular. (GORBUNOVA *et al*., 2007)

1.4.1. CÉLULAS TRONCO E SENESCÊNCIA

O processo de envelhecimento afeta não só as células somáticas de um organismo, mas também as células tronco que apesar de parecerem intocáveis com suas propriedades auto-replicativas também podem estar sujeitas aos efeitos da senescência. Entretanto, ainda não existe um consenso sobre como o envelhecimento afeta as células tronco.

Alguns estudos sugerem que possivelmente as células-tronco sofrem danos cumulativos produzidos pela exposição natural das células a um ambiente favorável aos radicais livres afetando também sua molécula de DNA. Portanto, acarretando declínio funcional com paralela diminuição da capacidade de responder à injúria ao estresse. (RANDO, 2006; SHARPLESS & DEPINHO, 2007)

Confirmando que há ainda muita controvérsia nesta área de estudo, outros trabalhos mostraram que as células tronco, ao entrarem no estágio de senescência, não perdem sua capacidade proliferativa, ao contrário, até a aumentam. Alguns trabalhos mostram aumento do *pool* de células tronco em animais idosos. (EFFROS & GLOBERSON, 2002)

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar o número e a genotoxicidade das células tronco de medula óssea em camundongos ateroscleróticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em camundongos ateroscleróticos de 2, 6 e 18 meses de idade:

- Quantificar células mononucleares da medula óssea e verificar a viabilidade
- Analisar a influência do peso/idade dos animais sobre o número de células mononucleares da medula óssea
- Quantificar a população de células tronco hematopoéticas e mesenquimais da medula óssea
- Avaliar a fragmentação do DNA das células mononucleares de medula óssea
- Verificar a influência da senescência na genotoxicidade das células mononucleares de medula óssea

METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos isogênicos C57BL/6 e transgênicos *Knockout* para Apolipoproteina E (ApoE-KO), machos com 2, 6 e 18 meses de idade pesando entre 20-35g aproximadamente. Todos os animais foram provenientes do biotério do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular (LTCC), do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum*, ambiente com controle claro/escuro num ciclo de 12 horas, bem como controle de temperatura (22ºC) e umidade (70%). Os animais utilizados no experimento foram divididos em 2 grupos: C57 (Controle) e ApoE-KO (Aterosclerótico). Cada grupo foi subdividido em:

Grupo C57: 2, 6, 18 meses, n = 10 animais em cada grupo

Grupo Aterosclerótico: 2, 6, 18 meses, n = 10 animais em cada grupo

Foram considerados;
2 meses – Grupo Jovem
6 meses – Grupo Adulto
18 meses – Grupo Idoso

3.2. ISOLAMENTO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA

O isolamento das células tronco, independente de sua origem, medula óssea, sangue periférico ou cordão umbilical, inicia-se com a separação da fração denominada células mononucleares, que contém células tronco, linfócitos e monócitos.

Para o isolamento das células mononucleares os animais foram selecionados de modo pareado, um aterosclerótico e um controle. O peso dos animais foi anotado e eles foram sacrificados com injeção intraperitoneal de tiopental sódico (40mg/kg). Todo o material utilizado no experimento foi previamente autoclavado para evitar a contaminação das células. Após serem sacrificados, os animais foram levados para a câmara de fluxo laminar e higienizados com álcool 70%. Em seguida, com auxílio de uma tesoura foi feita uma incisão no membro inferior, na região acima do acetábulo, para remoção da pele e dos tecidos que recobrem os fêmures e tíbias (Figura 10).

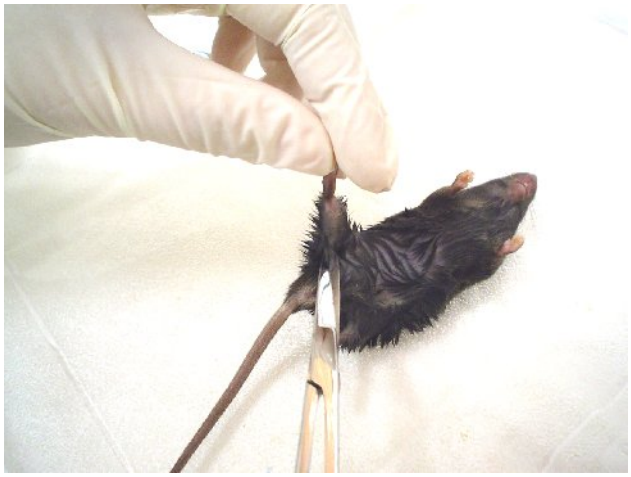


Figura 10 – Remoção da pele para retirada do fêmur e da tíbia.

Uma pinça do tipo “dente de rato” foi utilizada para dissecção do tecido excedente das tíbias e fêmures. Os ossos foram retirados e separou-se a tíbia do fêmur com auxílio de uma tesoura. Os ossos foram mantidos em uma placa de Petri contendo meio de cultura DMEM (GIBCO), que tem função de nutrir as células da medula até o próximo passo do experimento. (Figura 11)

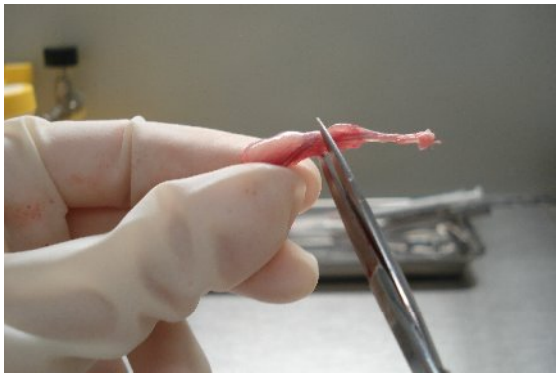
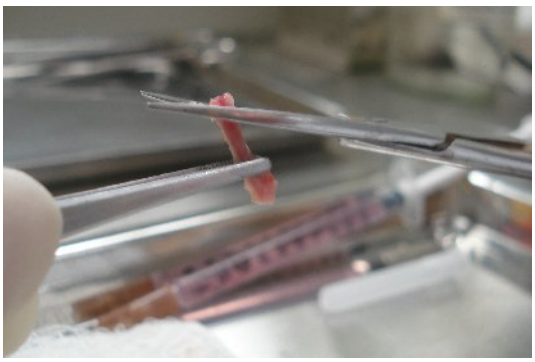


Figura 11 – Remoção do tecido dos ossos

Para colher a medula óssea que está inserida dentro dos ossos, as epífises dos ossos foram cortadas na altura da diáfise. O *flush* das células da medula óssea foi feito utilizando-se uma seringa cheia de meio de cultura (DMEM GIBCO), inserindo uma agulha (tamanho 26G) na epífise superior do osso e, usando o meio de cultura, a medula foi expulsa para um tubo *falcon* vazio (BD). O processo foi repetido até a medula se soltar completamente do osso. A medula coletada no tubo *falcon* foi homogeneizada para um volume de 10ml (células + meio de cultura) e, em seguida centrifugada por 10 minutos a 1200 rpm (rotações por minuto). (Figuras 12 e 13)



Figuras 12 e 13 – Corte das epífises (esquerda) e *flush* da medula óssea (direita).

O sobrenadante foi descartado e as células, no fundo do tubo, foram homogeneizadas em 4 ml de meio de cultura DMEM. Em um outro tubo *falcon* foram adicionados 4ml de gradiente de densidade Histopaque 1083® (SIGMA ALDRICH), que consiste de uma solução de polisacarose e diatrizoato de sódio com densidade de 1,083 g/ml, específico para células de ratos e camundongos.

A função do gradiente de densidade é separar em diferentes camadas as células mononucleares (células tronco, linfócitos e monócitos), plaquetas e eritrócitos. Os 4ml de células com meio de cultura foram pipetados e colocados delicadamente no outro tubo pela parede sobre o gradiente de densidade Histopque, com muito cuidado para não misturar as duas fases.

Os tubos contendo 4ml de células com meio de cultura e 4ml de gradiente de densidade Histopaque, totalizando um volume final de 8ml de solução, foram então levados para centrífuga (Eppendorf 5702) com rotor *swing-bucket*, sem freio, por 30 minutos a 1500rpm. A utilização da centrífuga com rotor móvel e sem freio é imprescindível para este tipo de experimento, pois permite a separação da camada de células mononucleares sem a contaminação pelo gradiente ou pelos eritrócitos e plaquetas. (Figura 14)

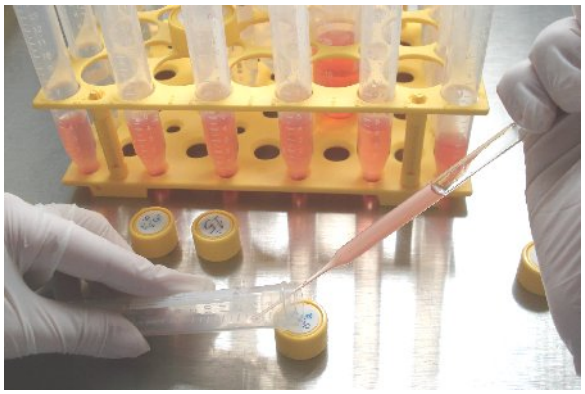


Figura 14 – Gradiente de densidade histopaque 1083

Durante a centrifugação, os eritrócitos e os leucócitos granulócitos atravessam a fase orgânica, que consiste o gradiente de densidade Histopaque, e sedimentam no fundo do tubo. A “nuvem” de células mononucleares encontra-se na interface entre as duas soluções e, as plaquetas e proteínas plasmáticas localizam-se na fase aquosa (fase superior).

Observa-se um anel celular na interface entre as fases orgânica (Histopaque, fase inferior) e aquosa (fase superior), onde estão presentes as células mononucleares (Figura 15). O anel de células mononucleares formado entre o meio de cultura e o gradiente de densidade foi imediatamente e delicadamente colhido utilizando-se uma pipeta Pasteur de vidro e colocado em um novo tubo *falcon*.

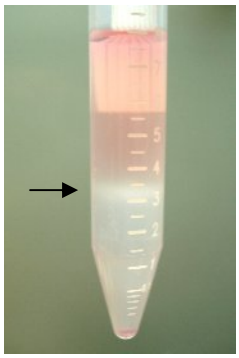


Figura 15 – Anel de células mononucleares separado pelo gradiente.

O gradiente de densidade Histopaque é extremamente tóxico para as células, por isso, quando as células mononucleares são colhidas do tubo, é normal que esta contenha também resíduos deste gradiente. Logo, foi necessário centrifugar as células por 10 minutos a 1200 rpm e em seguida adicionar uma solução salina tamponada (*Phosphate Buffer Solution* - PBS 10%) para lavar o excesso de gradiente. A lavagem foi repetida três vezes para garantir a remoção completa de qualquer vestígio de gradiente de densidade. A última etapa consistiu em retirar todo excesso de PBS após a última lavagem e ressuspender as células em 1ml de meio de cultura.

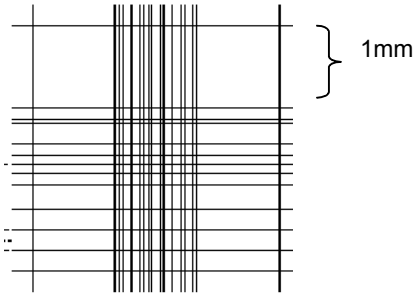
3.3. QUANTIFICAÇÃO EM CÂMARA DE NEUBAUER

A contagem das células mononucleares em câmara de Neubauer, também denominada de hemocitômetro, é um método manual tradicional que permite estimar o número de células por mililitro da suspensão. A câmara de Neubauer é um tipo especial de lâmina de microscópio composta por duas câmaras de contagens separadas por uma depressão transversal.

Cada câmara contém uma superfície espelhada quadriculada de dimensão 3x3 mm.

A região quadriculada é dividida em nove quadrantes, cada qual de dimensão 1x1 mm. Os quadrantes utilizados para a contagem são os quatro quadrantes externos. (Figura 16) Quando cobertos, por uma lamínula específica da câmara, cada quadrante confere um volume de 0,1mm^3, ou 1x10 $^{-4}$ ml. A contagem total do numero de células é realizada nos quatro quadrantes das duas câmaras de contagem. Foram feitas 3 contagens e a média do número de células foi calculado.

O cálculo para contagem das células é o seguinte:



$$Q = \frac{\text{Fator de Diluição} \times 10^4 \times \text{Volume} \times \text{Total de Células}}{4}$$

$$Q = \frac{40 \times 10^4 \times 1 \times \text{Número Total de Células}}{4}$$

Figura 16 – Quadrantes de contagem da câmara de Neubauer.

A câmara de Neubauer (Figura 17) também foi utilizada para estimativa da viabilidade celular, procedimento indispensável em diferentes situações de manipulação das células. Para a contagem foi estabelecida a diluição de 40 vezes da amostra obtida. Logo, foram pipetados 10 ul da suspensão de 1ml de células e adicionados 90 ul de PBS. Dessa mistura foram pipetados 10 ul e adicionados em um novo microtubo contendo 10ul de azul de tripano. Novamente foram pipetados 10ul dessa amostra e colocados em um novo tubo contendo 10ul de solução de Turk. Foram retirados 10 ul dessa amostra e colocados na câmara de Neubauer para contagem no microscópio óptico em aumento de 40X.

O corante azul de tripano é usado para análise de viabilidade celular, as células mortas têm sua membrana celular danificada por isso incorporam o corante e tornam-se azuis. As células que apresentaram coloração azul escuro foram contadas como células mortas e as de coloração clara foram contadas como vivas.

A estimativa da viabilidade é feita através do cálculo: número de células vivas dividido pelo número total de células contadas.

.

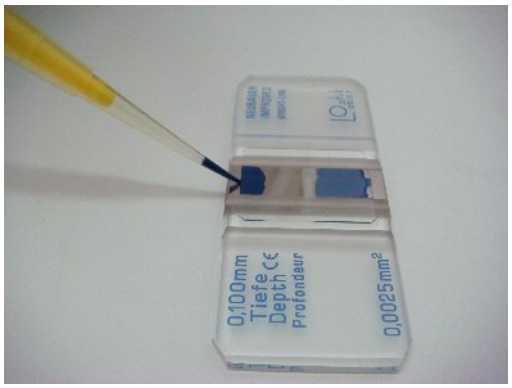


Figura 17 – Câmara de Neubauer

3.4. CONGELAMENTO DAS CÉLULAS

Após a quantificação, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos para retirada do meio de cultura. O meio foi descartado e as células foram suspensas em 950ul de soro fetal bovino (SFB - GIBCO) e 50ul de dimetilsulfóxido (DMSO), um agente criopreservante das membranas celulares. O congelamento das células foi feito de modo gradual e progressivo para manter a integridade estrutural das células. Primeiramente os criotubos foram colocados no freezer (-18ºC) e somente 24 horas depois os criotubos foram levados para o nitrogênio líquido (-196ºC). O nitrogênio líquido garante a integridade celular por até 15 anos.

3.5. DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS

Os criotubos contendo as células tronco mononucleares foram retirados do nitrogênio líquido (-196ºC) e levados ao freezer (-18ºC) para um descongelamento gradual até o momento do experimento. No fluxo laminar foram preparados dois béqueres com água limpa a 37ºC. Em um béquer foi colocado um tubo contendo meio de cultura (20% de soro fetal bovino inativado a temperatura de 56ºC) e no outro o criotubo contendo as células mononucleares. Todos os tubos foram higienizados com álcool 70% antes de serem abertos. Para descongelar as células sem promover danos, o meio de cultura com 20% de SFB foi adicionado lentamente

ao criotubo com as células. O conteúdo foi homogeneizado e transferido para um tubo *falcon* até completar o volume de 5ml. O tubo foi centrifugado a 1200rpm por 10 minutos para recuperação das células e descarte do sobrenadante. As células foram suspensas no volume necessário para cada experimento a serem submetidas.

3.6 CITOMETRIA DE FLUXO

A identificação precisa das células tronco é possível utilizando marcadores de superfície que, em conjunto, refletem as características biológicas e funcionais das células de forma geral e permitem, por outro lado, a individualização de um determinado tipo celular. Esses marcadores são chamados de anticorpos.
Para identificação dessas moléculas de superfície são empregadas outras moléculas acopladas com substâncias marcadoras (fluorocromos ou enzimas) que indicam, por diferentes cores, a ocorrência da molécula na superfície celular.

3.6.1 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E HEMATOPOÉTICAS

Para detecção das frações hematopoéticas e mesenquimais utilizamos os anticorpos CD117 (c-Kit) e CD90.2 (Thy-1.2), acoplados respectivamente aos fluorocromos FITC (cor verde) e PE (cor amarelo). O anticorpo CD117 é um marcador de células tronco e o anticorpo CD90.2 é marcador de células tronco hematopoéticas e mesenquimais que nos gráficos de citometria de fluxo podem ser identificadas pelas frações *Low* e *High* respectivamente.

3.6.2. MARCAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO

As células mononucleares foram previamente descongeladas e homogeneizadas em 500ul de solução de meio de cultura com 20% de soro fetal bovino inativado (SFB – Invitrogen). Foi feita a recontagem das amostras e retirada uma alíquota de 50ul para que obtivesse a concentração final de $1x10^6$ células/ml, que é necessária para marcação com os anticorpos.

A etapa seguinte foi toda realizada em ambiente com pouca luminosidade para evitar a perda da fluorescência dos fluorocromos. Para cada animal foram usados 2 tubos de polipropileno, no primeiro tubo, que é o controle, foram adicionados nesta ordem; 50 ul da suspensão de células, 50 ul de meio de cultura (20% SFB) para completar um volume de 100ul e 5 ul de cada anticorpo isotipo IgG_{2a}-PE (do anticorpo CD90.2) e IgG_{2b}-FITC (do anticorpo CD117), totalizando 110ul para o tubo controle.

No outro tubo foram adicionados 50 ul de células, 50 ul de meio de cultura (20% SFB) para completar um volume de 100ul e 5 ul de cada anticorpo, CD117-FITC e CD90.2-PE (*BD- Becton & Dickinson*), totalizando também um total de 110ul para o tubo com marcação.

Os 2 tubos foram gentilmente vortexados e logo após foram incubados na geladeira (no escuro) por 20 minutos. Foram retirados da geladeira, e adicionados 2ml de PBS para lavar o excesso de anticorpo. Os tubos foram centrifugados por 7 minutos a 1400rpm. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 400ul de solução fixadora MACS-FACS (BD) que agiu por 30 minutos na geladeira. Em seguida os tubos foram levados ao citômetro de fluxo FACSort (BD) para aquisição dos dados.

3.6.3. ANÁLISE DE DADOS DO CITÔMETRO DE FLUXO

Os dados foram adquiridos e analisados pelo software CellQuest do citômetro de fluxo FACS (Núcleo de Doenças Infecciosas da UFES).

3.7. ENSAIO DO COMETA

A eletroforese alcalina em gel de única célula (SCG – *single cell gel*) , conhecida como ensaio do cometa é usada para investigar a genotoxicidade de produtos químicos industriais, biocidas, agroquímicos e farmacêuticos. Ostling e Johanson desenvolveram a técnica em 1984 usando um pH neutro que limitava seus experimentos (OSTLING & JOHANSON, 1984). Porém Singh em 1988 aprimorou a técnica utilizando o pH >13 (básico) que aumenta a velocidade de migração do DNA. (TICE et al., 2000; SINGH et al., 1988). O princípio básico do ensaio do cometa é a

migração da molécula de DNA em um gel de agarose em condições de eletroforese. Quando vista no microscópio, a célula tem a aparência de um cometa, com uma cabeça (região do núcleo) e uma cauda contendo fragmentos de DNA que migram em direção ao pólo positivo. Dentre os vários protocolos, o que apresentou melhor resultado foi o de pH > 13, pois possibilita detectar no DNA quebras de fita simples e dupla, sítios abásicos, *crosslinks* de DNA/DNA e DNA/Proteínas entre outros. O ensaio do cometa pode ser aplicado em qualquer tipo de tecido desde que as células tenham núcleo. Ratos e camundongos são as espécies mais utilizadas neste tipo de experimento. Os passos básicos do ensaio incluem preparação das lâminas de microscópio embebidas em agarose, lise das membranas celulares para que haja liberação do DNA, desenovelamento da fita de DNA, eletroforese, neutralização, marcação do DNA e análise. Todos os reagentes utilizados no experimento foram preparados frescos e todo procedimento foi realizado em ambiente com pouca luz para evitar danos ao DNA das células, uma vez que estes estavam expostos e sujeitos a ação de enzimas.

3.7.1. PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

Foram utilizadas lâminas convencionais de microscópio com a ponta fosca para identificação. Antes de começar o experimento as lâminas foram higienizadas com álcool 70% e secas com um papel macio. A agarose *Normal Melting* (NMA - GIBCO) foi preparada na concentração de 1,5% em PBS e colocada sobre a lâmina com auxílio de uma pipeta de 1ml (Figura 18). As lâminas cobertas com agarose foram levadas à geladeira para secar por até 24 horas. Após a secagem das lâminas foram colocadas sobre elas uma mistura de células (5ul) com a agarose especial (75ul), de baixo ponto de fusão – *Low Melting Point* (LMP- GIBCO, 0,5%) preparada cuidadosamente em banho-maria (37ºC). Por fim, foram colocadas as lamínulas e as lâminas foram mantidas em geladeira para secagem (4ºC).

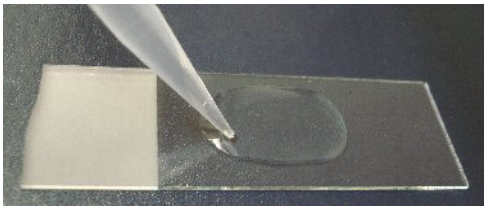


Figura 18 – Preparação da lâmina com banho de agarose

3.7.2. LISE (ROMPIMENTO) DAS MEMBRANAS CELULARES

Após a solidificação da agarose em geladeira, as lamínulas foram gentilmente retiradas e as lâminas foram colocadas em uma cuba vertical (Figura 19) contendo solução de lise (100mM de EDTA, 2,5M de cloreto de sódio e 10mM de Tris-base / 1% de Triton e 10% de DMSO adicionados na hora do uso, pH 10), que tem como objetivo lisar as membranas plasmáticas e nucleares das células, expondo o DNA.
A cuba foi mantida na geladeira por, no mínimo, 1 hora. A solução de lise foi mantida gelada desde o início do procedimento para evitar o descolamento do gel de agarose nas lâminas.

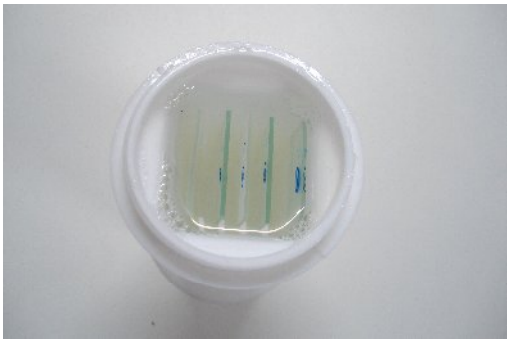


Figura 19 – Lâminas em solução de lise

3.7.3. DESENOVELAMENTO DO DNA

Após a etapa de lise as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese horizontal contendo solução tampão de eletroforese (1mM de EDTA e 300mM de hidróxido de sódio, pH >13), por 20 minutos, em ambiente escuro, com o objetivo de descondensar a molécula de DNA antes de ser submetida a corrida.

3.7.4. ELETROFORESE

Após o desenrolamento das fitas de DNA, a cuba foi ligada e a eletroforese (Figura 20) transcorreu a 25V e 300mA, por um período de 25 minutos a baixa temperatura e protegida da luz.

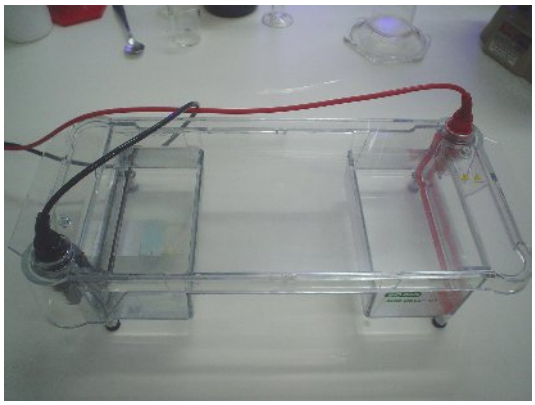


Figura 20 – Eletroforese das lâminas em cuba vertical

3.7.5. NEUTRALIZAÇÃO

Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e colocadas em um recipiente contendo solução de neutralização (Tris-base pH 7,5) por 5 minutos. Ao fim dos 5 minutos as lâminas foram transferidas para outro recipiente contendo água destilada por 5 minutos, a água é necessária para retirada do excesso de solução de neutralização. Este procedimento foi repetido três vezes.

3.7.6. SECAGEM DAS LÂMINAS

As lâminas foram colocadas para secar por 2 horas na estufa a 37ºC ou *overnight*. No dia seguinte foram fixadas com metanol por 2 minutos para serem coradas com brometo de etídio e analisadas em microscópio de fluorescência.

3.7.7. COLORAÇÃO COM BROMETO DE ETÍDEO

Em cada lâmina foram adicionados 70ul de Brometo de Etídio a 2ug/ml, cobertas com lamínulas. As lâminas coradas foram armazenadas em um recipiente resfriado e protegido da luz e levadas imediatamente para análise em Microscópio de Fluorescência (Microscópio do Núcleo de Doenças Infecciosas - NDI da UFES).

3.7.8. ANÁLISE EM MICROSCÓPIO DE FLUORESCÊNCIA

No microscópio de fluorescência foram contadas aleatoriamente, em um campo pré-estabelecido, 100 células por cada lâmina, sendo que foram montadas, para cada animal duas lâminas.

A contagem das células com danos no DNA foi feita de maneira qualitativa observando-se o tamanho da cauda do cometa. Os danos no DNA são classificados por cinco níveis de fragmentação de DNA: 0, 1, 2, 3 e 4.

Sendo:

Nível 0 – Sem fragmentação de DNA

Nível 1 – Nível baixo de fragmentação

Nível 2 – Nível de fragmentação moderado

Nível 3 – Nível alto de fragmentação de DNA

Nível 4 – Severo / Apoptose

A leitura das lâminas foi feita de maneira cega, foram feitas médias do percentual calculado para cada nível de fragmentação.

A figura 21 mostra a classificação dos danos em 5 níveis de fragmentação:

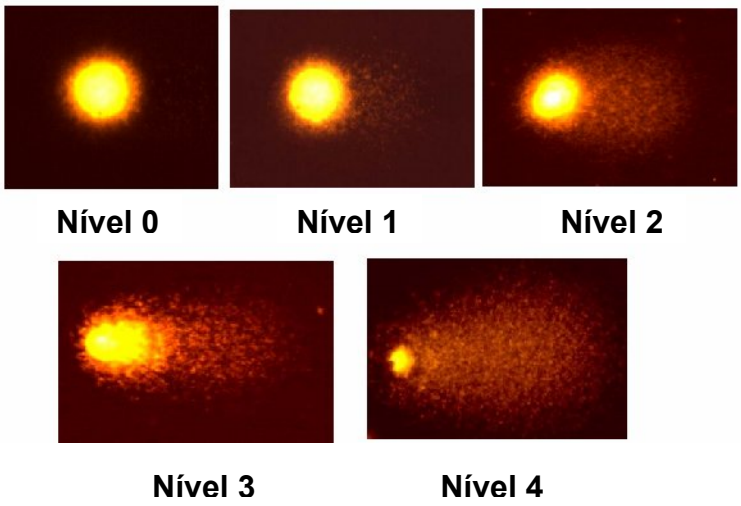


Figura 21 – Fotomicrografias típicas dos níveis de fragmentação do DNA. (*Comet Assay* – Índia)

3.8 ANÁLISE DA SENESCÊNCIA E DA LESÃO ATEROSCLERÓTICA

A análise da senescência dos arcos aórticos dos camundongos 57 e ApoE-KO foi feita anteriormente em experimentos do laboratório. Para isso foi retirada a aorta dos animais ateroscleróticos e C57 para análise da senescência. O arco aórtico foi aberto longitudinalmente a fim de expor a camada íntima do vaso, permitindo o contato com a solução X-gal (NaCl 150mM, $MgCl_2$ 2mM, K_3 5mM, K_4 5mM, ácido cítrico 40mM, Na_2HPO_4 12mM e 1mg/ml de X-gal), o qual cora os arcos senescentes com a cor azul. Os arcos foram incubados na solução de X-gal e colocados na estufa a 37ºC por aproximadamente 18 horas e em seguida lavados duas vezes em PBS. As fotos foram capturadas utilizando câmera digital Cannon Rebel XTI 10.1 *megapixels*. Após o protocolo de senescência as amostras foram coradas com *Oil-red* para análise de lipídios na parede dos arcos e novas imagens foram capturadas com a câmera digital.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos com média ± EPM. Para análise estatística, foi usado o teste ANOVA de 2 vias, seguido do *post hoc* de Fisher, com * $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES EM CÂMARA DE NEUBAUER

As células mononucleares isoladas da medula óssea dos camundongos ateroscleróticos e C57 foram contadas na câmara de Neubauer. O grupo de animais ateroscleróticos de 18 meses de idade apresentou um número maior de células ($2,39 \times 10^7$/ML ± 0,13), quando comparados com a contagem das células dos animais controle ($1,75 \times 10^7$/ML ± 0,11) e ateroscleróticos ($1,77 \times 10^7$/ML ± 0,17) de 2 meses. O número de células mononucleares não variou significativamente nos demais grupos. Os animais ateroscleróticos e C57 de 6 meses apresentaram 1,99 ± 0,25 e 2,32 ± 0,20 x 10^7 células/ML, enquanto o grupo C57 de 18 meses de idade tinha 2,14 ± 0,17 $\times 10^7$ células/ML. Os dados estão plotados na figura 22.

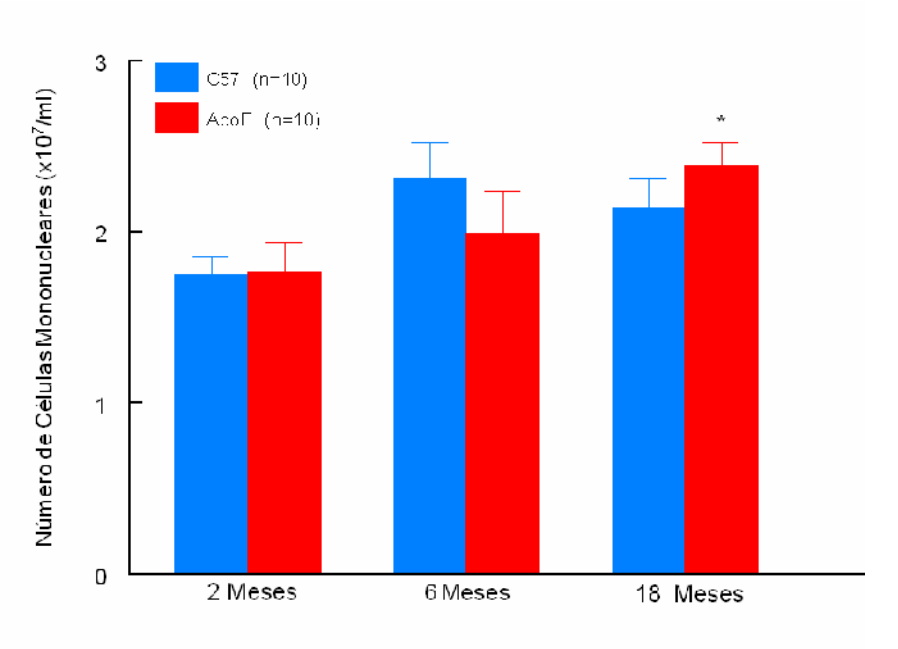


Figura 22 – Contagem das células mononucleares extraídas da medula óssea dos grupos C57 e ApoE-KO, nas diferentes idades estudadas. Dados apresentados como média±epm. *p< 0,05 quando comparado aos animais com 2 meses de idade.

4.2. ANÁLISE DO PESO

O peso corpóreo foi relacionado com as idades estudadas nos 2 grupos. Os valores das médias encontradas no grupo C57 de 2, 6 e 18 meses de idade foram 22,42 ± 0,65, 33,0 ± 0,44, 38,70 ± 0,93 respectivamente. As médias do grupo aterosclerótico nas mesmas idades foram 24,5 ± 0,99, 32,08 ± 0,76, 34,9 ± 0,89. Os dados mostraram que há um aumento normal do peso com o aumento da idade em ambos os grupos. Entretanto, não há diferença de peso entre o grupo C57 e ApoE-KO. Os valores estão representados na Figura 23.

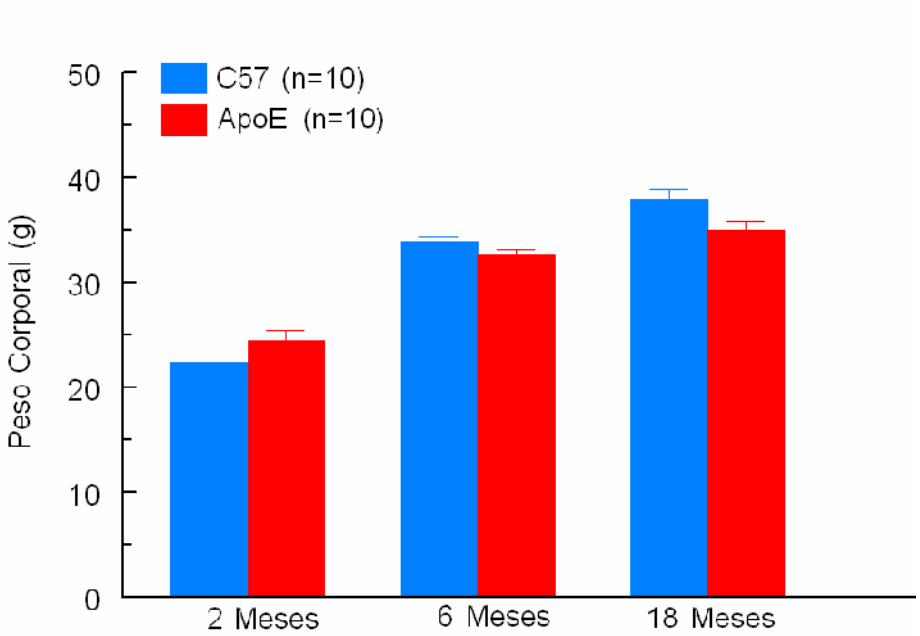


Figura 23 – Gráfico que mostra a relação do peso com as diferentes idades nos grupos C57 e ApoE-KO.

4.3. ANÁLISE DO NÚMERO DE CÉLULAS PELO PESO

Não há diferença entre o número de células mononucleares de medula óssea e o peso dos animais em diferentes idades. Portanto, o peso não influencia no número de células. Os valores das médias dos pesos e do número de células contadas já foram citadas anteriormente. A Figura 24 representa esta comparação.

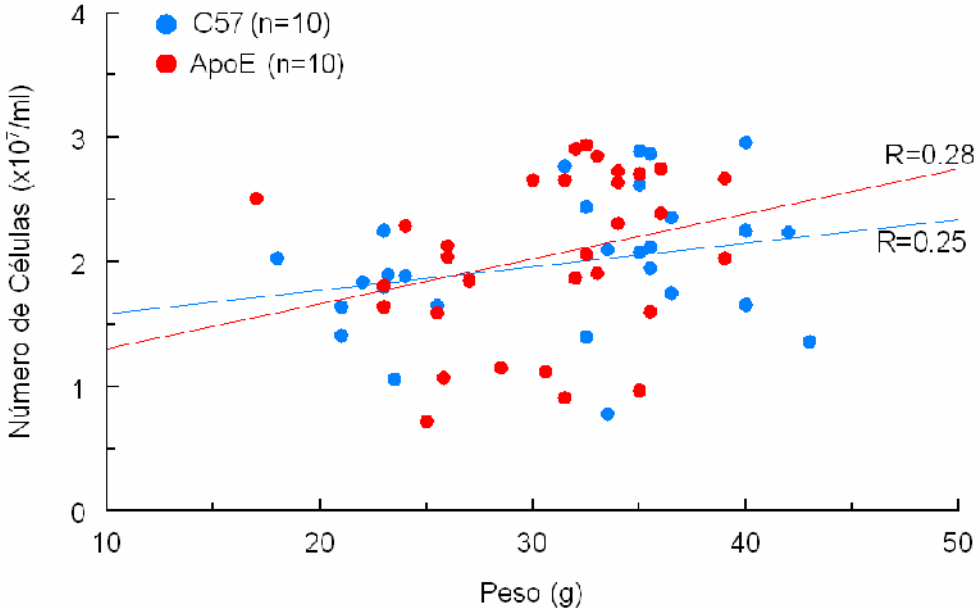


Figura 24 – O gráfico mostra a correlação entre número de células mononucleares da medula óssea e peso nas diferentes idades. Verificamos baixa correlação entre peso e número de células, fato comprovado pelo baixo valor do coeficiente de correlação (R).

4.4. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

A análise da viabilidade celular foi feita pelo método de exclusão do corante azul de tripano. As células vivas e mortas foram contadas e foi calculado o percentual de viabilidade. Todas as células mononucleares apresentaram viabilidade superior a 95%. Os animais ApoE-KO de 2, 6 e 18 meses de idade tinham 95.2 ± 1,28; 97.4 ± 0,56; 97.9 ± 0,72 % de células viáveis. O grupo C57 com as mesmas idades apresentou viabilidade de 95.4 ± 0,87; 95.9 ± 0,62; 96.1 ± 0,56 % de viabilidade. O percentual de viabilidade das células dos dois grupos estão representadas na Figura 25 abaixo.

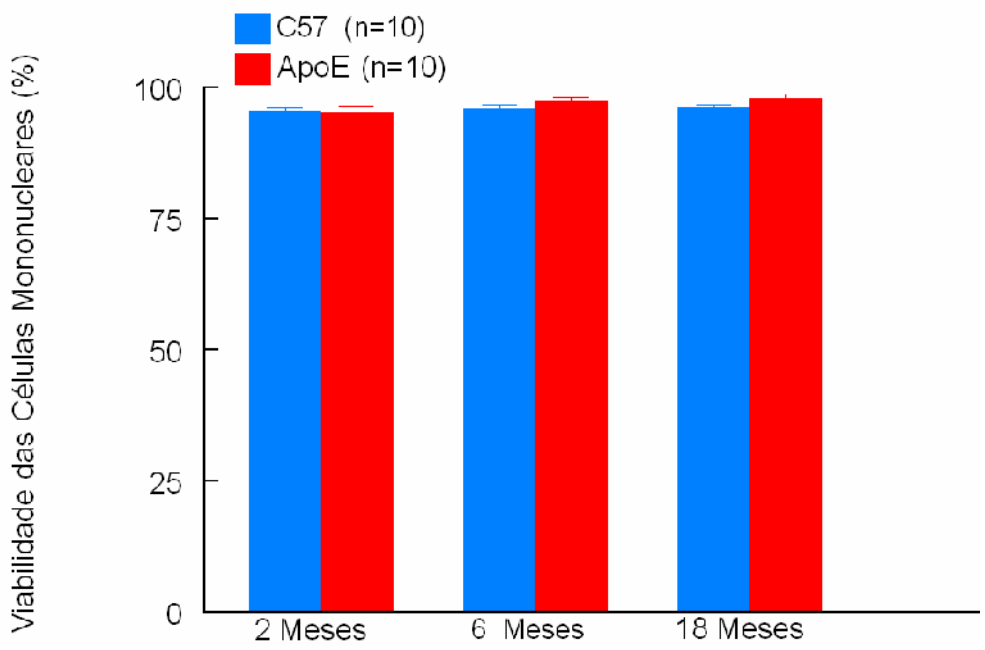


Figura 25 – Gráfico representativo da viabilidade das células mononucleares dos grupos ateroscleróticos e C57 em diferentes idades.

4.5. QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO PELA CITOMETRIA DE FLUXO

A análise das células de medula óssea foi feita através de marcadores de superfície específicos para células tronco hematopoéticas e mesenquimais, os anticorpos CD117-FITC e CD90.2-PE (BD) acoplados com seus respectivos fluorocromos. A população de células marcadas positivamente com o anticorpo CD90.2 foi separada em dois quadrantes R2 e R3. O quadrante R2 representa a população de células tronco marcadas pelo anticorpo $CD90.2_{low}$, ou seja, as células tronco hematopoéticas, enquanto o quadrante R3 representa as células marcadas pelo $CD90.2_{high}$, ou seja, as células tronco mesenquimais. A Figura 26 mostra os gráficos típicos obtidos das análises de citometria.

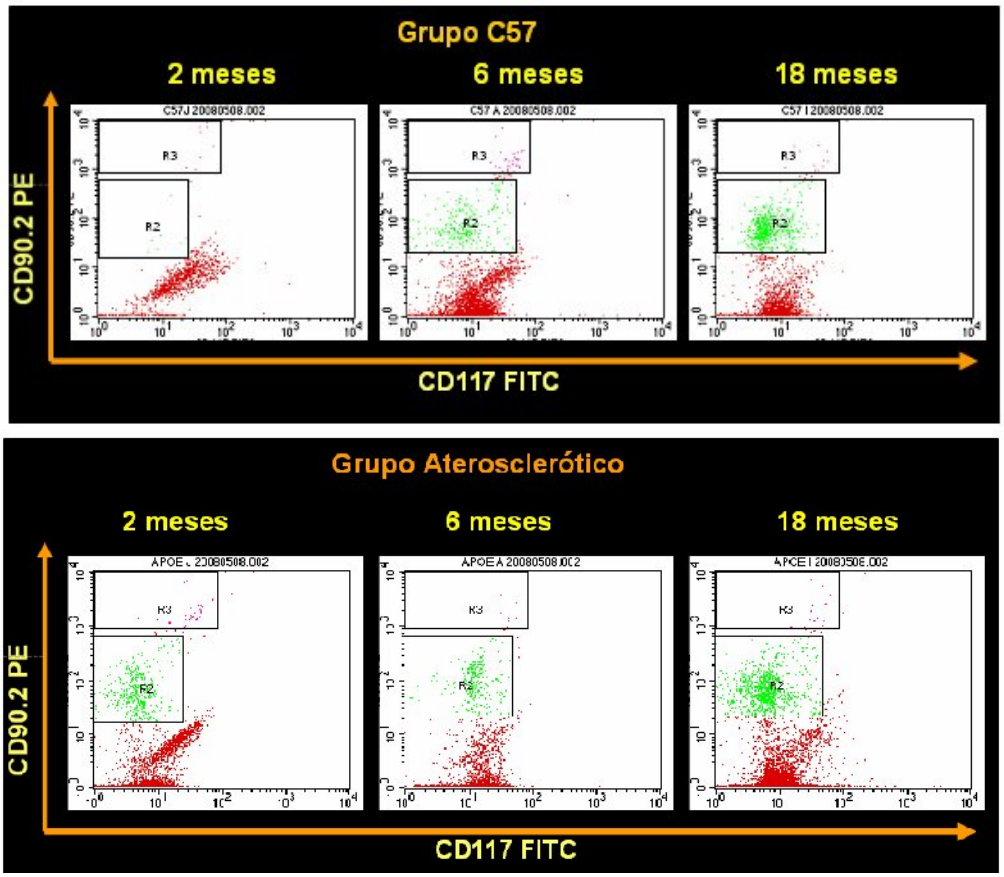


Figura 26 - Gráficos típicos utilizados na citometria de fluxo das células dos animais C57 (superior) e ateroscleróticos (inferior) para obtenção do percentual de células tronco hematopoéticas ($CD90.2_{low}$ – R2) e mesenquimais ($CD90.2_{high}$- R3).

4.5.1 ANÁLISE DO PERCENTUAL DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS

Os dados preliminares da quantificação da população de células tronco hematopoéticas ($CD90.2_{Low}$ positivas, quadrante R2) pela citometria de fluxo revelaram que a aterosclerose provoca um aumento no número de células tronco hematopoéticas da medula óssea quando comparados com os animais controle. A análise das células tronco pela citometria de fluxo mostrou que o grupo de animais ateroscleróticos de 2 meses de idade (9,05%) apresentou aumento do número de células tronco hematopoéticas quando comparados com os animais C57 de mesma idade (0,45%). Isso mostra que os animais ateroscleróticos aos 2 meses de idade têm aproximadamente 20 vezes mais células tronco hematopoéticas que o grupo controle. A análise nos animais de 6 meses de idade não mostrou diferença no número de células tronco hematopoéticas entre os grupos ApoE-KO (3,37%) e C57 (3,30%). Entretanto é importante ressaltar que comparado com a população de células tronco hematopoéticas do grupo aterosclerótico de 2 meses de idade (9,05%) a população do grupo aterosclerótico de 6 meses de idade (3,37%) sofreu uma queda de aproximadamente 3 vezes do número de células. A análise da população de células tronco hematopoéticas pela citometria de fluxo mostrou um aumento nos animais ateroscleróticos de 18 meses de idade (12,33%) quando comparadas com o grupo C57 de mesma idade (7,02%). Portanto, os animais ateroscleróticos de 18 meses de idade têm aproximadamente o dobro de células tronco hematopoéticas que um camundongo saudável idoso. Também é importante lembrar que os animais ateroscleróticos de 18 meses de idade apresentaram um aumento do número de CTH (12,33%) comparado com o grupo aterosclerótico de 6 meses de idade (3,37%), ou seja, o avanço da idade quadruplicou a população de CTH no grupo aterosclerótico. A Figura 27 superior mostra a variação da população de CTH nos grupos C57 e ateroscleróticos nas diferentes idades e a inferior mostra a relação população de CTH do grupo aterosclerótico por C57.

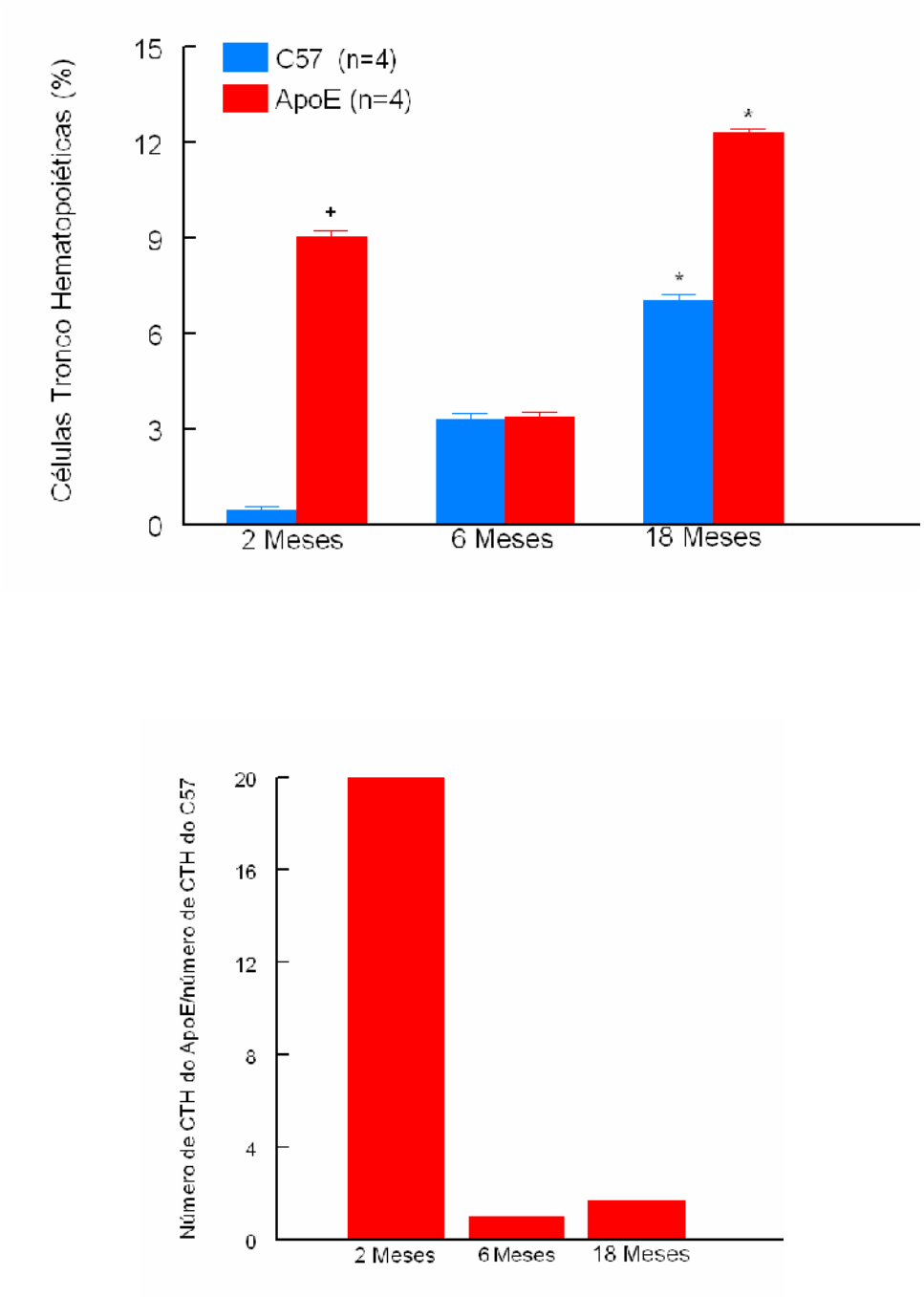


Figura 27 – Superior: Gráfico da Variação da população de CTH nos grupos ateroscleróticos e C57 em diferentes idades. Inferior: Gráfico da relação entre população de CTH do grupo aterosclerótico pelo grupo C57, mostra quantas vezes aumentou o número de CTH.

4.5.2 ANÁLISE DO PERCENTUAL DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

A análise da população de células tronco mesenquimais revelou uma queda no tamanho da população de células dos animais C57 de 2, 6 e 18 meses de idade: 0.51, 0.39 e 0.13% respectivamente. Portanto a senescência provocou uma queda na população de CTM na medula óssea dos animais controle. Entretanto, nos animais ateroscleróticos a população de CTM variou conforme a idade dos animais, ou seja, o grupo aterosclerótico de 2 meses tinha 0.67%, aos 6 meses apresentavam apenas 0,11% e aos 18 meses 0,40% de CTM na medula óssea. Os valores estão plotados na Figura 28.

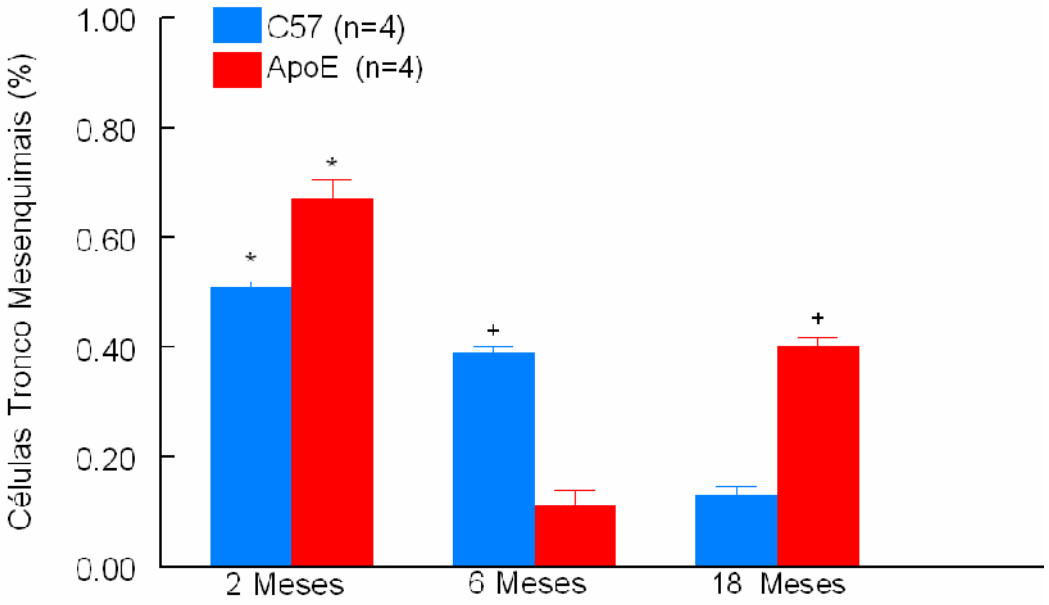


Figura 28 – Gráfico do número de células tronco mesenquimais dos grupos C57 e ateroscleróticos em diferentes idades.

Os animais ateroscleróticos de 2 meses de idade tinham 1,31 vezes mais células tronco mesenquimais que o grupo controle de mesma idade. Entretanto aos 6 meses de idade houve uma queda de 0,28 vezes na população de células tronco mesenquimais do grupo aterosclerótico quando comparados com os animais C57 de mesma idade. Já aos 18 meses de idade os animais ateroscleróticos aumentaram em 3,07 vezes a porcentagem de células tronco mesenquimais quando comparado com o grupo C57. Os dados da relação entre população de CTM de ApoE/C57 estão na Figura 29.

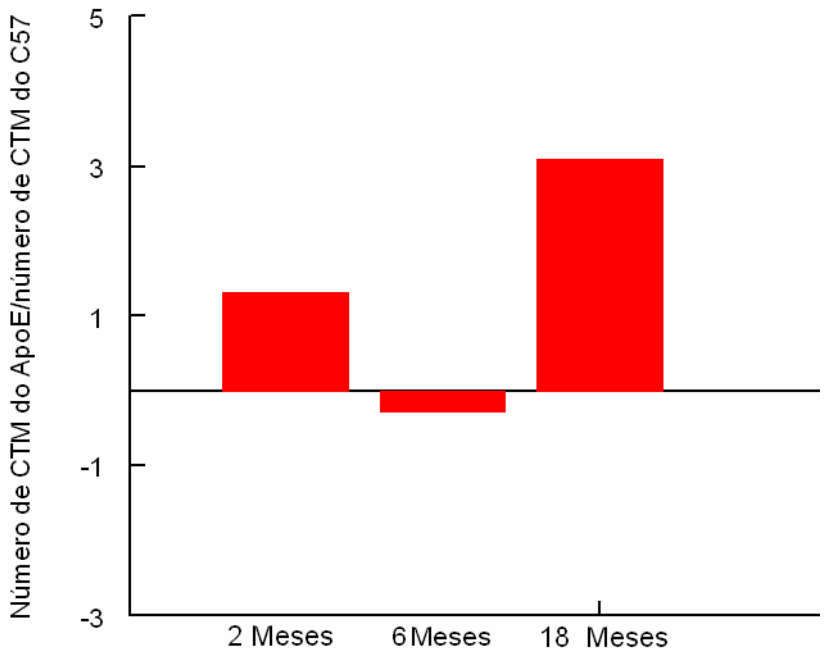


Figura 29 – Gráfico da relação Número de Células tronco mesenquimais dos animais ApoE-KO pelos C57, a qual representa de quantas vezes foi o aumento ou diminuição do número de células.

4.6. ANÁLISE DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA – ENSAIO DO COMETA

O ensaio do cometa que visa avaliar os níveis de fragmentação do DNA encontrados nas mononucleares de medula óssea são classificados segundo uma escala de dano de 0 a 4 onde:

Nível 0 – DNA intacto
Nível 1 – fragmentação leve
Nível 2 – fragmentação moderada
Nível 3 – fragmentação alta
Nível 4 – fragmentação severa ou apoptose

A Figura 30 mostra fotos típicas obtidas no microscópio de fluorescência na análise dos cometas formados pelas células mononucleares de medula óssea dos camundongos.

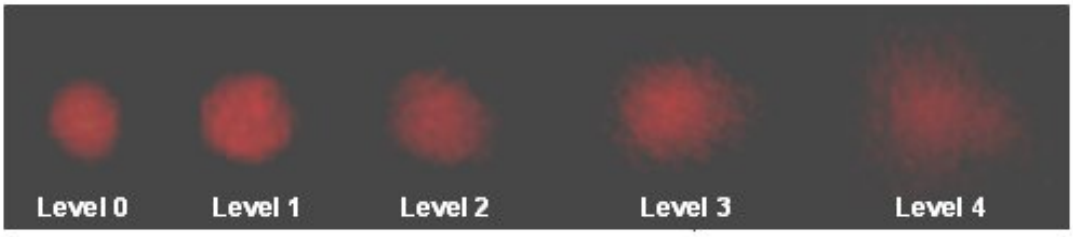


Figura 30 – Escala dos níveis de fragmentação de DNA.

4.6.1 FRAGMENTAÇÃO DO DNA NOS GRUPOS APOE-KO E C57

De acordo com a escala de fragmentação do DNA, o ensaio do cometa realizado nas células tronco dos animais controles (C57) revelou principalmente índices de fragmentação leve a moderado. Já os animais ateroscleróticos apresentaram visivelmente um aumento da fragmentação do DNA com o tempo e a progressão da placa aterosclerótica. Nestes, foram encontrados principalmente níveis altos e severos de fragmentação.

4.6.1.1 GRUPO C57

De acordo com a escala de fragmentação do DNA, o ensaio do cometa realizado nas células tronco dos animais controles (C57) detectou nível leve a moderado de fragmentação do DNA, em todo seu desenvolvimento, fases jovem, adulta e idoso, e até mesmo durante a senescência.

Nos animais de 2 meses de idade, que se encontravam na fase jovem, foram encontrados níveis de fragmentação 2 e 3 (44 e 32%). Aos 6 meses de idade, fase adulta, foram encontrados principalmente níveis 1 e 2 de fragmentação (aproximadamente 28 e 33% respectivamente). Já nos animais de 18 meses de idade foram encontrados principalmente níveis 1 e 2 de fragmentação (48 e 24%). Os dados estão expressos na tabela 2.

Tabela 2 – Níveis de fragmentação encontrados no grupo C57

Ensaio do Cometa no Grupo C57					
Níveis	**0** (sem dano)	**1** (leve)	**2** (moderado)	**3** (alto)	**4** (severo)
Jovem	10%	12%	44%	32%	2%
Adulto	15,5%	28%	33%	19,5%	4%
Idoso	22%	48%	24%	6%	0%

4.6.1.2 Grupo ApoE-KO

Já os animais ateroscleróticos apresentaram visivelmente um aumento da fragmentação do DNA com o tempo e a progressão da placa aterosclerótica.
Aos 2 meses de idade foram encontrados níveis 1 e 2 de fragmentação (41% e 39% aproximadamente). Com 6 meses de idade os animais apresentaram níveis 2 e 3 de fragmentação (42,6% e 30% aproximadamente). Finalmente aos 18 meses de idade estes animais já apresentavam níveis de fragmentação 3 e 4 (31 e 34% aproximadamente). Os dados estão expressos na tabela 3.

Tabela 3 - Níveis de fragmentação encontrados no grupo C57

Ensaio do Cometa no Grupo ApoE - KO					
Níveis	**0** (sem dano)	**1** (leve)	**2** (moderado)	**3** (alto)	**4** (severo)
Jovem	4%	41%	39%	14%	2%
Adulto	0 %	3,33%	42,6%	30%	24%
Idoso	7%	9%	31%	34%	19%

4.7. AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA SENESCÊNCIA E DA PLACA ATEROSCLERÓTICA

Dados do nosso Laboratório demonstraram a presença de senescência celular nas aortas dos camundongos de 2, 6 e 18 meses de idade. O aumento da área de placa aterosclerótica foi associado ao aumento da senescência celular nos animais ateroscleróticos. A análise dos animais C57 não revelou a presença de senescência com o aumento da idade. As imagens que revelam a senescência correlacionada com a placa aterosclerótica nas aortas dos animais estão representadas na Figura 31.

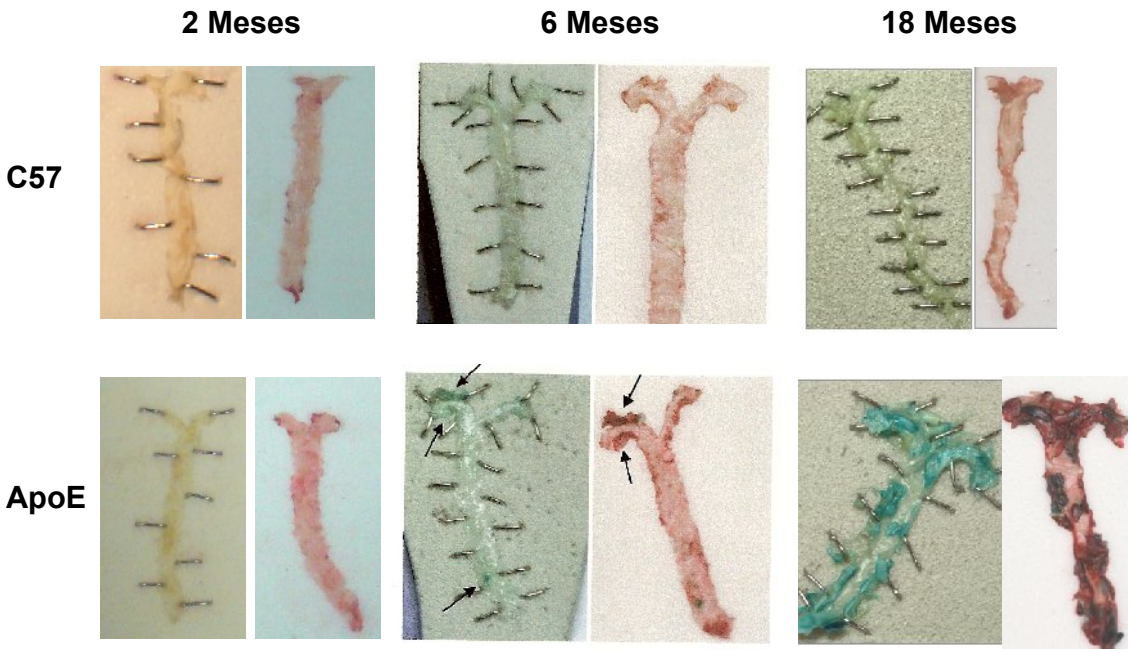


Figura 31 – Fotos representativas de senescência vascular e lesão aterosclerótica. (Lis Louro e Thiago Pereira – LTCC)

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

As células tronco diferem das demais células do organismo por apresentarem características especiais que as tornam únicas como, por exemplo, são indiferenciadas e não especializadas, podem se multiplicar por longos períodos mantendo-se indiferenciadas e, também, se diferenciar em células especializadas quando necessário. Apesar de possuírem todas essas propriedades as células tronco, assim como as demais células do organismo, sofrem modificações durante o período de senescência. Além disso, as doenças cardiovasculares modificam o comportamento qüiescente dessas células alterando seu padrão de mobilização e diferenciação. (ZAGO & COVAS, 2006) Entretanto, poucos estudos mostram como as células tronco se comportam na medula óssea durante esses dois eventos: senescência e aterosclerose.

As células tronco hematopoéticas e mesenquimais são essenciais para o reparo e regeneração de tecidos danificados durante processos patológicos ou lesões. Essas células têm capacidade de gerar novos vasos, tecidos, células endoteliais entre outros tipos de células. Portanto, seu potencial terapêutico é indiscutível tornando essas células referência absoluta no campo de estudos da medicina moderna. Não obstante sua relevância em ensaios clínicos, um grande número de questões ainda demanda investigação científica sobre como essas células se comportam diante de uma doença como a aterosclerose.

Nossos resultados mostraram um aumento do número de células mononucleares da medula óssea apenas nos animais ateroscleróticos de 18 meses de idade quando comparados com os grupos C57 e ApoE de 2 meses de idade. Isso acontece, pois na contagem das células mononucleares temos células indiferenciadas de todas as linhagens, hematopoéticas, mesenquimais e progenitoras endoteliais. Portanto, o animal aterosclerótico de 18 meses de idade tem um aumento tão grande da população de alguma dessas linhagens que fica evidente até na contagem da câmara de Neubauer. Foi comprovado posteriormente pela citometria de fluxo que esta linhagem aumentada corresponde a linhagem das CTH, o qual será discutido adiante.

Foi analisado também a influencia do aumento do peso, com o avançar das idades, sobre o número de células mononucleares de medula óssea. Nossos dados mostraram que o ganho de peso não é diferente entre os grupos C57 e ApoE e que, além disso, o peso não interfere no número de células mononucleares na medula óssea nestes animais.

Avaliamos também a viabilidade celular que é um parâmetro muito importante e deve ser considerado um quesito importante antes do estudo das células tronco. A análise da viabilidade das células mononucleares isoladas foi considerada ótima, >95%, e dentro dos parâmetros seguros para análise das células.

Em nosso estudo observamos um aumento do número de células tronco hematopoéticas, quantificadas pelo citômetro de fluxo, no grupo dos camundongos ateroscleróticos de 2 meses de idade quando comparados com o controle C57 de idade correspondente. A comparação intra-grupo aterosclerótico também mostrou aumento de 2 para 6 meses de idade nos ateroscleróticos. Este aumento ocorreu provavelmente porque a medula óssea dos animais ateroscleróticos se prepara para o futuro recrutamento de células indiferenciadas, como por exemplo, as células tronco, e diferenciadas, como por exemplo, os monócitos, para o local de inflamação da placa aterosclerótica.

Aos 2 meses de idade, os camundongos ApoE-KO já estão na fase inicial de desenvolvimento da placa aterosclerótica. Portanto, nessa fase o endotélio disfuncional induz o recrutamento de monócitos e linfócitos T para o local de lesão através das moléculas de adesão presentes na superfície do vaso. (NAKASHIMA *et al.,* 1994). Portanto, nesta fase a medula óssea recebe sinais que indicam a necessidade de divisão simétrica. Ou seja, a produção de células tronco hematopoéticas aumenta para que estas mais tarde, sejam direcionadas para fora da medula, pois haverá um aumento da demanda de células para o local de lesão.
Além das divisões simétricas a medula começa também a se dividir assimetricamente para produzir células especializadas como monócitos e linfócitos T que aos 2 meses já são recrutadas pelo endotélio vascular.

Entretanto, os mecanismos que regulam o destino das células-tronco hematopoéticas ainda são mal compreendidos. A diferenciação envolve não só a saída de um estado não comprometido como a opção por uma rota de desenvolvimento particular. Ainda não é completamente compreendido se estes processos são controlados independentemente nos mamíferos. No entanto, parece claro que o destino da célula tronco está sob controle de fatores intrínsecos e extrínsecos. (ZAGO & COVAS, 2006)

Aos 6 meses de idade, nos camundongos ApoE-KO, a placa aterosclerótica já se encontra na fase intermediária, ou seja, há presença de células espumosas, células musculares lisas e muitas células inflamatórias. Durante esta fase, observamos que o número de células tronco hematopoéticas na medula óssea diminuiu.

Sendo a medula óssea o local de produção das células tronco, ela recebe continuamente sinais que indicam a necessidade de produzir células especializadas e por isso é necessário que elas passem por divisão assimétrica. (ZAGO & COVAS, 2006)

É provável que devido a esse mecanismo a população de células tronco hematopoéticas na medula óssea sofre uma queda. Ora, aos 6 meses de idade, a medula óssea do animal aterosclerótico precisa fazer divisão assimétrica, ou seja, a necessidade no momento é a de células especializadas, como por exemplo, monócitos. Neste estágio, a placa aterosclerótica atrai cada vez mais linfócitos e monócitos. Além disso, a medula óssea precisa manter um pool de células tronco indiferenciadas, ou seja, também faz divisão simétrica.

Normalmente, a maior parte das células tronco hematopoéticas está em estado de quiescência e funciona como uma população reserva de células que protege o sistema hematopoético da exaustão quando estão sob condições de estresse, permitindo que exista sempre um *pool* reserva de células a espera de ser recrutado (WANG *et al*., 2006) Entretanto, com a progressão da placa aterosclerótica, essas células tronco indiferenciadas que são produzidas na tentativa de balancear a produção *vs* demanda, também recebem sinais para se direcionarem para a placa.

Provavelmente são por esses motivos que o número de células tronco na medula óssea cai aos 6 meses de idade nos camundongos ateroscleróticos.

Aos 18 meses de idade a placa aterosclerótica já se encontra estável, ao contrário do que acontece nos humanos, nesta fase a placa contém um número bem menor de células inflamatórias e logo atrai uma quantidade bem menor de células. Devido a esse processo a medula óssea, que necessita manter um *pool* de células tronco e progenitoras reserva, pode se recuperar dividindo simetricamente e aumentando o número de células tronco.

Nossos resultados mostraram um aumento no número de células tronco hematopoéticas na medula óssea dos animais ateroscleróticos de 18 meses de idade. Estudos mostraram que a capacidade proliferativa das células tronco hematopoéticas de animais idosos é maior que a de animais jovens. (ZAGO & COVAS, 2006) Portanto, além da capacidade proliferativa aumentada das células desses animais, a medula óssea desses animais que antes sofreu com a despopulação devido a grande demanda de células para a placa aterosclerótica, precisa mais do que nunca de mitose simétrica para repopular o seu *pool* reserva de células tronco.

O envelhecimento causa mudanças nos organismos em todos os níveis de organização biológica, especialmente limitando ao máximo as funções e diminuindo a homeostase. (BARJA, 2002)

Estudos indicam que a senescência altera a função das células tronco, entretanto o número não é afetado, muito pelo contrário, estudos mostram que em algumas linhagens de camundongos o número de células aumenta com o envelhecimento. (SHARPLESS & DEPINHO, 2007)

Nossos resultados também mostraram que com o avançar da idade, na medula óssea do camundongo C57 ocorre um aumento progressivo da população de células tronco hematopoéticas indicando que a senescência afeta o número de células tronco hematopoéticas da medula óssea.

Entretanto devido ao estado normal de quiescência das células tronco hematopoéticas e de sua capacidade de auto-renovação, não era de se esperar grandes flutuações no *pool* de células tronco na medula óssea. (HAAN & ZANT, 1999)

Estudos mostram que o efeito do envelhecimento sobre as células tronco é linhagem-específica. A linhagem de camundongos C57, utilizada em nosso experimento, é uma das linhagens que apresentam aumento do número de células tronco com o envelhecimento. (HAAN & ZANT, 1999)

Já foi demonstrado que a capacidade proliferativa das células de animais idosos é maior que a de animais jovens. Uma possível explicação para essa informação e para os resultados encontrados em nosso experimento está em um estudo que mostrou que a senescência provoca uma alteração nos genes envolvidos na regulação do ciclo celular, o que acaba provocando o aumento da divisão das células tronco em animais idosos. (SUDO *et al*., 2000; LIU & FINKEL, 2006).

Este estudo corrobora nossos dados, pois os camundongos C57 aumentaram progressivamente o número de células tronco hematopoéticas com o aumento da idade. Os camundongos de 18 meses de idade foram os que apresentaram o maior número de células.

Entretanto também há estudos como o de Kenyon e Gerson que mostraram que durante o envelhecimento o organismo tenta manter um balanço entre proliferação celular e manutenção dos tecidos. Porém devido à senescência, doenças e perda progressiva de partes das estruturas teloméricas, ocorre uma diminuição da capacidade de proliferação das células tronco hematopoéticas. (KENYON & GERSON, 2007).

Enquanto o número de células tronco hematopoéticas dos animais C57 aumenta com a senescência, observamos em nossa análise de citometria de fluxo que há uma redução na população de células tronco mesenquimais.

Vários estudos mostram que as células tronco mesenquimais, quando cultivadas *in vitro* mostram sinais de senescência após algumas passagens. Bonab em 2006 descreveu em seus experimentos com cultura de células tronco mesenquimais o comportamento dessas células quando atingiram o estágio de senescência. Ele observou que as células tronco mesenquimais perdem a capacidade proliferativa, perdem a capacidade de diferenciação e, portanto ocorre uma queda no número de colônias de células. (BONAB *et al*., 2006).

Enquanto a maioria dos trabalhos encontra diminuição da capacidade proliferativa das células tronco mesenquimais em senescência (METS & VERDONK, 1981; BAXTER *et al*., 2004; MURAGLIA *et al*., 2000), poucos não encontram diferença nenhuma (OREFFO *et al*, 1998).

Nossos resultados mostraram que a população de células tronco mesenquimais do grupo C57 sofreu uma queda. Entretanto, na análise da senescência celular pela enzima beta-galactosidade, os animais C57 não apresentaram senescência. Feher e colaboradores observaram esse mesmo padrão em seu estudo de senescência de células tronco mesenquimais. Eles notaram que os camundongos C57 apesar de apresentarem diminuição da capacidade proliferativa, não apresentaram senescência pelo marcador beta-galactosidase. (FEHRER *et al*., 2006).
Tokalov e colaboradores também avaliaram o número e a capacidade de diferenciação das células tronco mesenquimais in vitro de ratos com 2 e 48 semanas de vida. Eles observaram que as células tronco mesenquimais provenientes dos animais idosos tinham capacidade de diferenciação e número de colônias de células reduzida. Em seu estudo ele revela a importância da oxidação do DNA dessas células para que isso ocorra. (TOKALOV *et al*., 2007).

Os mecanismos moleculares que provocam a senescência ainda não são conhecidos. Um dos mecanismos envolve a geração de danos no DNA pelos radicais livres. Observamos, portanto que nossos animais C57 apesar de perderem a capacidade proliferativa das células tronco mesenquimais, não têm senescência celular, ou seja, as células presentes na medula óssea não sofrem ação dos radicais livres. A medula é conhecida por ser um ambiente com baixa tensão de oxigênio, logo a produção de radicais livres local é baixíssima. Portanto, a senescência das

células tronco mesenquimais na medula óssea se revela apenas com a queda do potencial de replicação. (WAGNER *et al*., 2008; PICCOLI *et al*., 2005).

Conforme já discutido anteriormente, nos camundongos ateroscleróticos o número de células tronco hematopoéticas na medula óssea varia conforme a placa aterosclerótica evolui. Assim como as células tronco hematopoéticas seguem esse comportamento as mesenquimais também apresentam o mesmo padrão. Aos 2 meses de idade, nos animais ateroscleróticos, a população de células tronco mesenquimais na medula óssea também está aumentada. Provavelmente pelo mesmo motivo que o número de células tronco hematopoéticas aumenta, ou seja, nesta idade a medula óssea desses animais se prepara para o recrutamento de células tronco e células especializadas, por isso, ela faz divisão simétrica, aumentando o *pool* de células tronco mesenquimais e hematopoéticas que serão recrutadas para o local de lesão aterosclerótica.

Logo, aos 6 meses de idade, o número de células tronco mesenquimais também cai, assim como verificado com relação ao número de células tronco hematopoéticas nesta idade. Durante esta fase, a placa aterosclerótica já recruta muitas células especializadas, como por exemplo monócitos para o local de lesão, é por esse motivo que a medula óssea precisa fazer divisão assimétrica. Além disso, células tronco mesenquimais e hematopoéticas são direcionadas para o local de lesão a fim de reparar o vaso lesado, por isso estas populações de células diminuem nesta fase.

Ao contrário do que ocorre em humanos, no camundongo ApoE-KO a placa aterosclerótica se estabiliza, ou seja, não evolui e não se rompe, em condições normais. Portanto, nos animais ApoE-KO de 18 meses de idade a placa está estabilizada, logo a placa estável não contêm muitas células inflamatórias e já não recruta tantas células para o local da lesão. Neste estágio, a medula óssea dos animais ateroscleróticos de 18 meses pode recuperar seu *pool* de células tronco através da divisão simétrica, aumentando portanto, o número de células tronco mesenquimais e como já observamos também de células tronco hematopoéticas.

O ensaio do cometa é uma técnica rápida e sensível de quantificação de lesões e detecção de efeitos de reparo no DNA em células individuais de eucariotos. O ensaio tem sido amplamente utilizado na genética médica, genética toxicológica, ecotoxicológica, em diagnósticos e tratamentos médicos, biomonitoramento ambiental, nutrição e outras aplicações.

Alguns estudos têm relacionado às doenças cardiovasculares com o estresse oxidativo e aparecimento de danos no DNA das células presentes nas placas ateroscleróticas dos indivíduos portadores dessas doenças. Entretanto, nenhum trabalho avaliou os danos oxidativos causados pela aterosclerose no DNA das células mononucleares de medula óssea. Portanto em nossa análise de genotoxicidade nas células mononucleares de medula óssea observamos um aumento progressivo de fragmentação do DNA concomitante com a progressão da placa aterosclerótica.
Muitos trabalhos já relacionaram estresse oxidativo com aterosclerose, porém todos mostram fragmentação de DNA ou na placa aterosclerótica ou em linfócitos do sangue periférico, mas nenhum mostra a influência da aterosclerose nas células de medula óssea.

Em 2001, Botto e colaboradores publicaram um estudo clínico que correlacionou a presença de fragmentos de DNA nos linfócitos de sangue periférico de pacientes com doença arterial coronariana utilizando o teste do micronúcleo. (BOTTO *et al*.,2001)

Andreassi em 2003 e Mahmoudi em 2006 também mostraram em seus estudos que danos ao DNA estavam presentes tanto nos linfócitos da circulação sanguínea quanto nas próprias placas ateroscleróticas de pacientes com doença arterial coronariana. Estes pacientes tinham quantidades elevadas de micronúcleos, ou seja, alta fragmentação de DNA, quando comparados com indivíduos sadios. Seus resultados foram associados ao aumento do estresse oxidativo na aterosclerose. (ANDREASSI, 2003; MAHMOUDI *et al*., 2006)

Folkmann e Colaboradores, estudaram a influência da idade e da placa aterosclerótica na oxidação do DNA em camundongos ApoE-KO e avaliaram as células de aorta, fígado e pulmão, encontrando níveis aumentados de oxidação somente no fígado desses animais. (FOLKMANN *et al*., 2007)

Ainda há também muita controvérsia neste aspecto, muitos trabalhos mostram que a ação dos radicais livres varia conforme o tecido, ou seja, sua ação é tecido-específica. Sabe-se que aproximadamente 2 x 10^4 danos no DNA ocorrem em cada célula por dia, a maioria via espécies reativas de oxigênio (ROS). Nas doenças cardiovasculares a produção de radicais livre aumenta mais ainda. (ANDREASSI, 2003; MAHMOUDI *et al*., 2006)

Quando os mecanismos de reparo e o sistema antioxidante do organismo estão comprometidos ocorre o estresse oxidativo que culmina com dano ao DNA das células, senescência e morte celular. (MAHMOUDI *et al*., 2006).
Os radicais livres são produzidos no local da placa aterosclerótica. A principal fonte de radicais livres, na aterosclerose é o complexo de enzima NADPH oxidase que está presente nas membranas celulares das células endoteliais, células de músculo liso, macrófagos e neutrófilos. (SINGH *et al*, 1988) Na presença de algum fator estressante ou patologia este complexo é ativado e produz em curto período de tempo uma grande quantidade de ânions superóxidos (O_2^-). (SINGH *et al.,* 1988).

Os macrófagos são os principais produtores de radicais livres durante a progressão da lesão aterosclerótica, pois ativam o complexo enzimático NADPH oxidase que está presente em sua membrana plasmática, e oxidam o LDL na camada intima da parede arterial. O LDL oxidado é capturado pelos receptores *scavengers* dos macrófagos transformando-se em células espumosas que formam as estrias gordurosas. Portanto, a atividade enzimática de NADPH oxidase é de extrema relevância na progressão da placa aterosclerótica. (SORESCU *et al*., 2002)

As células endoteliais e de músculo liso também produzem radicais livres que permanecem na circulação sanguínea. Esses radicais são altamente reativos e, portanto, interagem com as moléculas de DNA produzindo danos reparáveis como, por exemplo, quebras da fita de DNA (dupla ou simples), crosslinks, entre outros. No

entanto, estes danos somente são reparáveis em um organismo sadio. (SORESCU *et al*., 2002)

Em nosso estudo utilizamos camundongos ateroscleróticos, ou seja, a produção de radicais livres nesses animais é exacerbada pela presença da placa. Os sistemas antioxidante e de reparo não são capazes de corrigir todos os danos na molécula de DNA destes animais gerando dessa forma um aumento da fragmentação que foi evidenciado nesse grupo pelo ensaio do cometa.

Esses dados são comprovados por outros pesquisadores que estudaram o efeito da aterosclerose na produção de radicais livres, como o estudo de Satoh e colaboradores em 2007 que mostraram uma maior taxa de fragmentação de DNA nas células progenitoras endoteliais de pacientes ateroscleróticos. (SATOH *et al*., 2007)

Possivelmente a presença de fragmentação do DNA nas células de medula óssea dos camundongos ateroscleróticos é explicada pelo aumento da produção de radicais livres durante a evolução da placa aterosclerótica. A produção é tão intensa que afeta até mesmo as células presentes na medula óssea do animal.

Nossas células estão expostas diariamente a agentes oxidantes, radicais livres de todos os tipos, portanto é normal que sofram fragmentação de DNA. Entretanto mecanismos de reparo e enzimas antioxidantes agem continuamente gerando um balanço positivo nessa batalha. O resultado em um organismo saudável é o equilíbrio dessas duas forças: radicais livres e antioxidantes. Se a oxidação do DNA aumenta ou não com o envelhecimento ainda não há um consenso. Enquanto muitos trabalhos mostram a existência dessa correlação outros mostram o inverso.

A medula óssea é um órgão que apresenta uma tensão de oxigênio muito baixa implicando em um comportamento quase anaeróbico com baixo gasto de energia pelas células que, por isso, se encontram sempre no estado qüiescente. Portanto este ambiente é desfavorável à produção de radicais livres, protegendo as células da medula óssea de danos oxidativos dependentes de idade. (PICCOLI *et al*., 2005)

As células mononucleares são produzidas e residem na medula óssea até que recebam sinais para deixar este nicho. A maioria dos trabalhos mostra que quando as células saem da medula óssea em direção a circulação há uma correlação positiva entre senescência e dano oxidativo no DNA. Guo em 2001 relatou a presença de DNA oxidado nas células de camundongos de 26 meses de idade comparados com animais de 6 meses. (GUO *et al*., 2001)
Outros estudos mostram que os radicais livres são tecido-específicos, ou seja, em seu estudo com ratos senescentes, Fraga mostrou que os radicais livres não agem em todos tecidos de maneira igual. Ele encontrou altos níveis de oxidação de DNA no fígado, rim e intestino, mas no cérebro e nos testículos o índice de dano era considerado normal. (FRAGA *et al*., 1990).

Nossos resultados mostraram que os camundongos C57 apesar de senescentes não apresentaram níveis de fragmentação de DNA elevados nas células mononucleares de medula óssea. Provavelmente essas células de medula só são afetadas pelos radicais livres circulantes quando estes estão muito aumentados devido à presença de uma doença, como por exemplo, foi observado nos camundongos ateroscleróticos. Portanto, os animais saudáveis são capazes de manter um equilíbrio entre produção de ROS e sistema de reparo/ antioxidante.

Vários estudos correlacionam à presença de senescência celular com as doenças cardiovasculares, especialmente com a aterosclerose. Vários fatores são responsáveis por provocar a senescência, um dos mais importantes é estresse oxidativo. A produção exagerada de radicais livres leva a oxidação do DNA das células, o que desencadeia o processo de senescência. (MINAMINO & KOMURO, 2007)

Já discutimos anteriormente que a aterosclerose aumenta a produção de radicais livres levando à senescência. Os estudos realizados em nosso laboratório mostraram perfeitamente essa associação. A análise do arco aórtico dos animais ApoE-KO mostrou alta atividade da enzima beta-galactosidade revelada através da coloração azul, indicando a presença de senescência.

Em contraste, os animais C57 apesar da idade avançada, 18 meses de idade, não apresentaram senescência na aorta. Mostramos anteriormente com os resultados do ensaio do cometa, que os animais C57 também não apresentaram níveis altos de fragmentação do DNA nas células mononucleares da medula óssea.
Portanto, tanto as células da medula óssea, que já são protegidas por um ambiente com baixa tensão de oxigênio, quanto às células presentes na circulação sanguínea têm baixa fragmentação de DNA. Provavelmente o sistema antioxidante e o sistema de reparo destes animais é bastante eficiente e, por isso os animais C57 não apresentam senescência.

Notamos também em nossos resultados que os camundongos ApoE-KO apresentaram senescência na aorta que tinha alta quantidade de lipídios evidenciados pelo corante *oil red*. Corroborando os dados que já discutimos anteriormente, o ensaio do cometa desses animais revelou alta taxa de fragmentação no DNA até mesmo nas células da medula óssea, ou seja, a produção de radicais livres na aterosclerose é tão intensa que além de afetar os locais de placa aterosclerótica produzindo senescência, afeta também as células da medula óssea.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÃO

Muitos estudos utilizam a terapia com células tronco com intuito de tratar ou prevenir doenças cardiovasculares, entretanto poucos estudam os mecanismos que envolvem a ativação das células tronco na medula óssea. Nosso estudo foi o primeiro a mostrar o comportamento das células tronco em seu nicho, a medula óssea, frente à aterosclerose. Observamos um aumento do número de células tronco hematopoéticas e mesenquimais nos animais ateroscleróticos de 2 e 18 meses de idade, provavelmente devido a maior taxa de divisão simérica dessas células que são recrutadas para os locais de placa. Já nos animais controle observamos um aumento progressivo do número de células tronco hematopoéticas e diminuição do número de células tronco mesenquimais com o avanço da idade. Nosso estudo também mostrou como as células tronco de um animal saudável são afetadas pelo processo de senescência. Os animais ateroscleróticos apresentaram níveis altos de fragmentação de DNA que aumentaram com a senescência, entretanto os animais saudáveis não apresentaram níveis de fragmentação considerados nocivos ao DNA desses animais. Possivelmente, o aumento da fragmentação de DNA no grupo aterosclerótico pode ocorrer devido à elevação da produção de espécies reativas de oxigênio na placa aterosclerótica, que reagem com o DNA desses animais causando fragmentação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aging Under the Microscope – A Biological Quest. **National Institute on Aging**. National Institute of Health. 2006.

ANDREASSI, M.G. Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. **Mutation Research.** Vol.543, p.67-86, 2003.

BARJA, G. Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction. **Ageing Research Reviews**. Vol.1, p.397-411, 2002.

BARROS, Paulo Menezes Holanda. **Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato-do-mato pequeno**. 2007. Doutorado em Medicina Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BERRA, C.M.; MENCK, C.F.M.; Estresse Oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**. Vol.29, p.1340-1344, 2006.

BARRY, F.P.; MURPHY, J.M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.** Vol. 36, p.568-584, 2004.

BAXTER, M.A.; WYNN, R.F.; JOWITT, S.N.; WRAIT, L.J.; FAIRBAIRN, L.J.; BELLANTUONO, I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. **Stem Cells**. Vol.22, p. 675-682, 2004.

GONZALES, D.C., PEREIRA, D.G., PAVANELLI, D.D., SILVA, E.V.E., ALMEIDA, F.M., SIVIERO, F., GUIMARAES, L.M., OTALORA, L.F.P., SUSIN, M.F., FILHO, R.S., MARCO, R.D. **Bioquimica do Envelhecimento**. Instituto de Quimica. Universidade de São Paulo. 2001.

BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Folia Histochemica et Cytobiologica**. Vol.44, p. 215-230, 2006.

BONAB, M.M.; ALIMOGHDDAM, K.; TALEBIAN, F.; GHAFFARI, S.H.; GHAVAMZADEH, A.; NIKBIN, B. **Aging of Mesenchymal stem cell in vitro**. Bone Marrow Cell Biology. Vol.7, p.1-7, 2006.

BOTTO, N.; RIZZA, A.; COLOMBO, M.G.; MAZZONE, A.M.; MANFREDI, S.; MASETTI, S.; CLERICO, A.; BIAGINI, A.; ANDREASSI, M.G. Evidence for DNA damage in patients with coronary artery disease. **Mutation Research**. Vol. 493, p.23-30, 2001.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**.Vol.9, p.641-650, 1991.

CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, G.; MIDDLETON, J. Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation, Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. **Stem Cells**. Vol.25, p. 2739-2749, 2007.

IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Sociedade Brasileira de Cardiologia.** Vol.88, Suplemento I, Abril, 2007.

DWORAKOWSKI, R.; ALOM-RUIZ, S.P.; SHAH, A.M. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype. **Pharmacological Reports**. Vol. 60, p. 21-28, 2006.

EFFROS, R.B.; GLOBERSON, A. Hematopoietic cells and replicative senescence. **Experimental Gerontology**. Vol.37, p.191-196, 2002.

FEHRER, C.; LEPPERDINGER, G. Mesenchymal stem cell aging. **Experimental Gerontology**. Vol.40, p.926-930, 2005.

FEHRER, C.; LASCHOBER, G.; LEPPERDINGER, G. Aging of Murine Mesenchymal Stem Cells. **New York Academy of Sciences**. Vol. 1067, p. 235–242, 2006.

FILHO, Geraldo Brasileiro. **Patologia Bogliolo**. (7ª Ed.) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

FRIEDENSTEIN, A.J.; SHAPIRO, P.; PETRAKOVA, K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embriology and Experimental Morphology**. Vol.16, p.381-390, 1966.

FISCHBACH, G.D.; FISCHBACH, R.L. Stem cells: science, policy, and ethics. **The Journal of Clinical Investigation**. Vol.114, p.1364-1370, 2004.

FOLKMANN, J.K.; LOFT, S.; MOLLER, P. Oxidatively damaged DNA in aging dyslipidemic ApoE-KO and wild-type mice. **Mutagenesis**. Vol.22, p.105-110, 2007.

FRAGA, C.G.; SHIGENAGA, M.K.; PARK, J.W.; DEGAN, P.; AMES, B.N. Oxidative damage to DNA during aging: 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. **Proc. Nadl. Acad. Sci.** Vol. 87, p. 4533-4537, 1990.

GIANNINI, S.D. História Natural da Aterosclerose. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**. Vol.10, p.677-685, 2000.

GONZALES, D.C.; PEREIRA, D.G.; PAVANELLI, D.D.; DA SILVA, E.V.E.; ALMEIDA, F.M.; SIVIERO, F.; GUIMARÃES, L.M.; OTALORA, L.F.P.; SUSIN, M.F.; FILHO, R.S.; MARCO, R. **Bioquímica do envelhecimento**. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2001.

GORBUNOVA, V.; SELUANOV, A.; MAO, Z.; HINE, C. Changes in DNA repair during aging. **Nucleic Acid Research**, Vol.35, p.7466-7474, 2007.

GUO, Z.M.; YANG, H.; HAMILTON, M.L.; REMMEN, H.; RICHARDSON, A. Effects of age and food restriction on oxidative DNA damage and antioxidant enzyme activities in the mouse aorta. **Mechanisms of Ageing and Development.** Vol.112, p. 1771–1786, 2001.

HAAN, G.; ZANT, G.V. Dynamic Changes in Mouse Hematopoietic Stem Cell Numbers During Aging. **Blood**. Vol.93, p. 3294-3301, 1999.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**. Vol. 25, p.585-621, 1961.
Introduction to Flow Cytometry A Learning Guide. BD Biosciences

Inside the Cell. **National Institute of Health**. NIH Publication.

JAWIEN, J.; NASTALEK, P.; KORBUT, R. Mouse Models of Experimental Atherosclerosis. **Journal of Physiology and Pharmacology**. Vol.55, p.503-517, 2004.

KENYON, J.; GERSON, S.L. The role of DNA damage repair in aging of adult stem cells. **Nucleic Acid Research**. Vol.35, p. 7557–7565, 2007.

KIRKWOOD, T.B.L; AUSTAD, S.N. Why do we age? **Nature**, Vol. 408, p.233-238, 2000.

KOPP, H.G.; AVECILLA, S.T.; HOOPER, A.T.; RAFII, S. The Bone Marrow Vascular Niche: Home of HSC Differentiation and Mobilization. **Physiology**. Vol.20, p.349-356, 2005.

KUNITOMO, M. Oxidative Stress and Atherosclerosis. **The Pharmaceutical Society of Japan**. Vol.127, p.1997-2014, 2007.

LI, A.C.; GLASS, C.K.; The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. **Nature**. Vol.8, p.1235-1242, 2002.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**. Vol. 420, p. 868-874, 2002.

LIU, J.; FINKEL, T. Stem cell aging: what bleach can teach. **Nature Medicine**. Vol.12, p.383-384, 2006.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P.; ZIPURSKY, L.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**. 5ªEd. W.H.Freeman, 2004.

LUSIS, A.J. Atherosclerosis. **Nature**. Vol.407, p.233-241, 2000.

MAHMOUDI, M.; MERCER, J.; BENNETT, M. DNA damage and repair in atherosclerosis. **Cardiovascular Research**. Vol.71, p.259-268, 2006.

MARTINET, W.; KNAAPEN, M.W.M.; MEYER, G.R.Y.; HERMAN, A.G.; KOCKX, M.M. Elevated Levels of Oxidative DNA Damage and DNA Repair Enzymes in Human Atherosclerotic Plaques. **Circulation**. Vol.106, p. 927-932, 2002.

MEIR, K.S.; LEITERSDORF, E. Atherosclerosis in the Apolipoprotein E–Deficient Mouse: A Decade of Progress. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.** Vol. 24, p.1006-1014, 2004.

MEIRELLES, Lindolfo da Silva. **Biologia das células tronco mesenquimais pós-natais**. 2007. Tese de Doutorado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

METS, T.; VERDONK, G. In vitro aging of human boné marrow derived stromal cells. **Mechanisms of ageing and development**. Vol. 16, p.81-89, 1981.

MINAMINO, T.; KOMURO, I. Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. **Circulation Research**. Vol.100, p.15-26, 2007.

MURAGLIA, A.; CANCCEDA, R.; QUARTO, R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. **Journal of Cell Science**. Vol. 113, p. 1161-1166, 2000.

NAKASHIMA, Y.; PLUMP, A.S.; RAINES, E.W.; BRESLOW, J.L.; ROSS, R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. Vol.14, p.133-140, 1994.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, **Understanding Stem Cells**, 2005.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, **Regenerative Medicine**, NIH, 2006.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH**, Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions**, 2001.

NETTO, M.R.C.; DESSEN, E.M.B. Células-tronco: o que são e o que serão? **Sociedade Brasileira de Genética**. p.12-15, 2005.

OGA, Seize. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo. Ed. Atheneu, 1996.

ONUKI, Janice. **Lesões em DNA promovidas por ácido 5-aminolevulínico: uma proposta de bases moleculares para os hepatomas associados as porfirinopatias**. Tese de Doutorado de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

OREFFO, R.O.; BENNETT, A.; CARR, A.J.; TRIFFITT, J.T. Patients with primary osteoarthritis show no change with ageing in the number of osteogenic precursors. **Scandinavian Journal of Rheumatology**. Vol. 27, p.415-424, 1998.

OSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research**. Vol.123, p.291-298, 1984.

PAOLETTI, R.; GOTTO, A.M.; HAJJAR, D.P. Inflammation in Atherosclerosis and Implications for Therapy. **Circulation**. Vol.109, p.III-20-III26, 2004.

PICCOLI, C.; RIA, R.; SCRIMA, R.; CELA, O.; DAPRILE, A.; BOFFOLI, D.; FALZETTI, F.; TABILIO, A.; CAPITANIO, N. Characterization of Mitochondrial and Extra-mitochondrial Oxygen Consuming Reactions in Human Hematopoietic Stem Cell. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 280, p. 26467–26476, 2005

PLUMP, A.S.; SMITH, J.D.; HAYEK, T.; AALTO-SETALA, K.; WALSH, A.; VERSTUYFT, J.G.; RUBIN, E.M.; BRESLOW, J.L. Severe Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice Created by Homologous Recombination in ES Cells. **Cell.** Vol.71, p.343-353, 1992.

QIAN, H.; YANG, Y.; LI, J.; HUANG, J.; DOU, K.; YANG, G. The role of vascular stem cells in atherogenesis and post-angioplasty restenosis. **Ageing Research Reviews**. Vol. 6, p. 109–127, 2007.

RANDO, T.A. Stem cells, ageing and the quest for immortality. **Nature**. Vol. 441, p. 1080-1086, 2006.

RATAJCZAK, M.Z.; ZUBA-SURMA, E.K.; MACHALINSKI, B.; KUCIA, M. Bone-marrow-derived stem cells – our key to longevity?. **Journal of Applied Genetics**. Vol.48, p.307-319, 2007.

RODRIGUES, Nilsa Regina Damaceno. **Medidas de indicadores de estresse oxidativo e de remodelamento cardíaco em camundongos expostos à poluição atmosférica ambiental durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal**. 2007. Dissertação de Mestrado em Ciências. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007

RUBIN, R.; STRAYER, D.S.; ALLARD, M.F.; BEASLEY, D.P.; BENNETT, D.P.; BIBBO, M.; BOULDIN, T.W.; CURTIS, M. **Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine**. 4.ed., São Paulo, 2006.

SATA, M.; SAIURA, A.; KUNISATO, A.; TOJO, A.; OKADA, S.; TOKUHISA, T.; HIRAI, H.; MAKUUCHI, M.; HIRATA, Y.; NAGAI, R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. **Nature Medicine**. Vol. 8, p.403-409, 2002.

SATOH, M.; ISHIKAWA, Y.; TAKAHASHI, Y.; ITOH, T.; MINAMI, Y.; NAKAMURA, M. Association between oxidative DNA damage and telomere shortening in circulating endothelial progenitor cells obtained from metabolic syndrome patients with coronary artery disease. **Atherosclerosis**. Vol.9, p.1-7, 2007.

SHARPLESS, N.E.; DEPINHO, R.A. How stem cells age and why this makes us grow old. **Nature Reviews – Molecular Biology**. Vol.8, p.703-713, 2007.

SINGH, N.P. A Simple Method for Accurate Estimation of Apoptotic Cells. **Experimental Cell Research**. Vol.256, p. 328–337, 2000.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. Vol.175, p.184-191, 1988.

SORESCU, M.D.; WEISS, D.; LASSEGUE, B.; CLEMPUS, R.E.; SZOCS, K.; SORESCU, G.P.; VALPPU, L.; QUINN, M.T.; LAMBETH, J.D.; VEJA, J.D.; TAYLOR, W.L.; GRIENDLING, K.K. Superoxide Production and Expression of Nox Family Proteins in Human Atherosclerosis. **Circulation**.Vol.105, p.1429-1435, 2002.

STARY, H.C.; CHANDLER, A.B.; DINSMORE, R.E.; FUSTER, V.; GLAGOV, S.; INSULL, W.J.; ROSENFELD, M.E.; SCHWARTZ, C.J.; WAGNER, W.D.; WISSLER, R.W. Adefinition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. Vol.15, p.1512-1531, 1995.

STOCKER, R.; KEANEY, J.F. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. **American Physiological Society**. Vol.84, p.1381-1478, 2004.

SUDO, K.; EMA, H.; MORITA, Y.; NAKAUCHI, H. Age-associated Characteristics of Murine Hematopoietic Stem Cells. **Journal of Experimental Medicine**. Vol.192, p.1273-1280, 2000.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single Cell Gel / Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. Vol.35, p.206–221, 2000.

TILL, J.E.; MCCULLOCH, E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Radiation Research**. Vol.14, p.213-215, 1961.

TOUTOUZAS, P.C.; TOUSOULIS. D.; DAVIES, G.J. Nitric oxide synthesis in atherosclerosis. **European Heart Journal**. Vol.19, p.1504-1511, 1998.

TOKALOV, S.V.; GRUNER, S.; SCHINDLER, S.; IAGUNOV, A.S.; BAUMANN, M.; ABOLMAALI, N.D. A number of bone marrow Mesenchymal stem cells but neither phenotype nor differentiation capacities changes with age of rats. **Molecules and Cells**. Vol. 24, p. 255-260, 2007.

WAGNER, W.; HORN, P.; CASTOLDI, M.; DIEHLMANN, A.; BORK, S.; SAFFRICH, R.; BENES, V.; BLAKE, J.; PFISTER, J.; ECKSTEIN, V.; HO, A.D. Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. **PLoS ONE**. Vol.3, p.1-12, 2008.

WANG, Y.; SCHULTE, B.A.; ZHOU, D. Hematopoietic Stem Cell Senescence and Long-Term Bone Marrow Injury. **Cell Cycle**. Vol.5, p.35-38, 2006.

WEINERT, B.T.; TIMIRAS, P.S. Invited Review: Theories of aging. **Journal of Applied Physiology**. Vol. 95, p. 1706–1716, 2003.

ZAGO, A.M.; COVAS, D.M. **Células-Tronco – A Nova Fronteira da Medicina**. Atheneu, São Paulo, Brasil, 2006

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo