



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Alyne Souza Felix Fonseca

Transplante de células de medula óssea (BMCs) de camundongos em modelo experimental para o desenvolvimento de aterosclerose: aspectos estruturais, ultraestruturais e moleculares da aorta

Rio de Janeiro

2015

Alyne Souza Felix Fonseca

Transplante de células de medula óssea (BMCs) de camundongos em modelo experimental para o desenvolvimento de aterosclerose: aspectos estruturais, ultraestruturais e moleculares da aorta

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho
Coorientadora: Prof.^a Dra. Alessandra Alves Thole

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F676 Fonseca, Alyne Souza Felix.

Transplante de células de medula óssea (BMCs) de camundongos em modelo experimental para o desenvolvimento de aterosclerose: aspectos estruturais, ultraestruturais e moleculares da aorta / Alyne Souza Felix Fonseca. – 2015.
79 f.

Orientador: Jorge José de Carvalho.

Coorientador: Alessandra Alves Thole.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Aterosclerose - Teses. 2. Transplante de medula óssea - Teses. 3. Células da medula óssea - Teses. 4. Camundongo como animal de laboratório - Teses. I. Carvalho, Jorge José de. II. Thole, Alessandra Alves. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.13-004.6

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Alyne Souza Felix Fonseca

Transplante de células de medula óssea (BMCs) de camundongos em modelo experimental para o desenvolvimento de aterosclerose: aspectos estruturais, ultraestruturais e moleculares da aorta

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2015.

Coorientadora:

Prof.^a Dra. Alessandra Alves Thole
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Cristiane Matsuura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Érika Afonso Costa Cortez Marques
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Suzana Côrte-Real Faria
Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz

Prof. Dr. Loraine Campanati
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a Deus, aos meus pais Oslúzio e Nazaré, à minha irmã Lyria, e meu amor Fernando, aos avós queridos pelo amor incondicional, pelo carinho e presença em todos os momentos da minha vida e pelo apoio crucial nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Compartilho o mérito deste trabalho com todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que o objetivo final fosse alcançado.

A Deus, por guiar o meu caminho, minha vida e governar-me com seu amor e sabedoria;

À minha família querida, por ser fonte de amor, união e alegria em minha vida; agradeço cada momento de paciência, esforço e dedicação pelos momentos difíceis enfrentados durante estes 4 anos de muito estudo e empenho.

In Memoriam do cunhado Marcelo Araújo Silva, com saudades, por nos deixar tão cedo, mas que sua luta fez ensinamentos;

Ao Prof. Dr. Jorge José de Carvalho, que conduziu o trabalho com muita sabedoria, sendo um dos responsáveis direto pelo meu crescimento profissional;

Ao sempre presente Fernando Timbó, pelo incentivo, carinho e dedicação de vida, onde em todos os momentos, acreditou na certeza de um futuro brilhante para mim. Obrigado por todos os momentos de apoio.

À Minha afilhada querida, Carolina Jones, pela dádiva de tê-la em minha vida;

À bióloga e amiga Ana Lúcia Rosa Nascimento, pelo companheirismo, dedicação, disponibilidade e apoio em todos os momentos da construção deste trabalho;

A querida amiga Maria Cristina;

Aos técnicos: Josefa da Silva, Fábio, Roberto do departamento de Histologia e Embriologia, pela simpatia e pelo auxílio constate durante a realização deste trabalho;

Aos que contribuíram diretamente neste trabalho: Vinícius Rocha, Genilza Oliveira, Camila, Nemesis Monteiro.

Aos colegas de trabalho do departamento de Histologia e Embriologia, Vinicius Rocha, Verônica Matos, Angélica Beatriz, Dalva Lira, Jemima, Milton, Rodrigo Ferreira, Nemesis Monteiro, Poliana pelo convívio agradável e animado, e pela grande ajuda e apoio;

Aos colegas de outros departamentos pela ajuda neste trabalho: Jéssica Teixeira, Bruno Félix, Patrícia, Alan Cesar, Jorge Medeiros;

Às amigas de todos os momentos: Ana Bastos, Paula Fontoura, Suellen Bernardo, Nathália Ardente, Laís Bessa, Gabriela Neves, Raquel de Paula, Janaína Georgi, pelo carinho, dedicação e paciência;

Aos novos amigos, que participarão de uma longa jornada: Aline Zani, Ana Beatriz, Luana Franco, Luiza Braga, Yale Lobo, Natalia Yabrudi, Otavio Chagas, Raphael Tavares, dentre todas as outras que tiveram principalmente paciência e estiveram comigo em todos os momentos.

A amiga Luiza Braga, pela paciência de todos os dias.

A todos do Departamento de Histologia e Embriologia, por me receberem com carinho e por proporcionarem um ambiente agradável e sempre descontraído;

A todos os novos professores e amigos que me ajudaram a ter momentos para que eu pudesse desenvolver esta caminhada.

A todos os professores da graduação, pelos ensinamentos que enriqueceram minha formação, dentre estes: Profa. Alessandra Thole, Profa. Laís de Carvalho, Profa. Ana Carolina Stumbo;

A todos que, diretamente ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Toda minha vida eu me perguntei no que me tornaria quando eu crescesse. Então, há aproximadamente sete anos, eu percebi que eu nunca iria crescer - aquele crescimento é sempre um processo contínuo.

M. Scott Peck

RESUMO

FONSECA, Alyne Souza Felix. **Transplante de células de medula óssea (BMCs) de camundongos em modelo experimental para aterosclerose: aspectos estruturais, ultraestruturais e moleculares da aorta.** 2015. 79 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

As células tronco são caracterizadas pela sua capacidade de se diferenciar em várias linhagens de células e exibir um potente efeito parácrino. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da terapia com células da medula óssea (BMCs) na glicose sanguínea, no metabolismo lipídico e remodelamento da parede da aorta em um modelo experimental para aterosclerose. Camundongos C57BL/6 foram alimentados com uma dieta controle (grupo CO) ou uma dieta aterogênica (grupo AT - 60% gordura). Após 16 semanas, o grupo AT foi dividido em quatro subgrupos: grupo AT 14 dias e o grupo AT 21 dias receberam uma injeção de PBS na veia caudal e mortos 14 e 21 dias após respectivamente; grupo AT-BMC 14 dias e AT-BMC 21 dias que receberam uma injeção com BMCs na veia caudal e mortos 14 e 21 dias após, respectivamente. O grupo CO foi sacrificado juntamente com outros grupos. O transplante BMCs reduziu os níveis de glicose, triglicerídeos e colesterol total no sangue. Não houve diferença significativa em relação à massa corporal entre os grupos transplantados e não transplantados, sendo todos diferentes do grupo CO. Não houve diferença significativa na curva glicêmica entre os grupos AT 14 dias, AT-BMC 14 dias e AT 21 dias e estes diferentes do grupo CO e do grupo AT-BMC 21 dias. O Qa ($1/\text{mm}^2$) foi quantitativamente reduzido no grupo AT 14 dias e AT 21 dias quando comparado ao grupo CO. Este Qa se mostrou elevado no grupo AT-BMC 21 dias quando comparado a todos os grupos. O aumento da espessura da parede da aorta foi observado em todos os grupos aterogênicos, entretanto o aumento da espessura foi significativamente menor no grupo AT-BMC 21 dias em relação ao grupo AT 14 dias e AT 21 dias. A percentagem de fibras elásticas se apresentou significativamente maior no grupo AT 21 dias quando comparado ao CO e AT-BMC 21 dias. Não houve diferença significativa entre o grupo CO e AT-BMC 21 dias. Vacúolos na túnica média, delaminação e o adelgaçamento das lamelas elásticas foram observados nos grupos AT-14 dias e AT-21 dias. O menor número destes foi visualizado no grupo AT-BMC 14 dias e AT-BMC 21 dias. A imunomarcagem para alfa actina de músculo liso (α -SMA) e fator de crescimento vascular e endotelial (VEGF) mostrou menor marcação em grupos transplantados com BMCs. A marcação para antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) mostrou-se mais expressiva no grupo AT-BMC 21 dias grupo. Marcação para CD105, CD133 e CD68 foi observada nos grupos AT 14 dias e AT 21 dias. Estas marcações não foram observadas nos grupos AT-BMC 14 dias e AT-BMC 21 dias. Nas eletromicrografias observamos o remodelamento benéfico no grupo AT-BMC14 dias e AT-BMC 21 dias, com a organização estrutural similar ao grupo CO. Vesículas de pinocitose, projeção da célula muscular lisa e a delaminação da lamina elástica interna são observados nos grupos AT 14 dias e AT 21 dias. Célula endotelial preservada, com lamina elástica interna de contorno regular e contínua é observada no grupo CO e nos grupos AT-BMC 14 dias e AT-BMC 21 dias. Como conclusão, os nossos resultados reforçam o conceito de que, em um modelo aterosclerótico utilizando camundongos e dieta aterogênica, a injeção de BMCs melhora os níveis de glicose, metabolismo lipídico e ocasiona um remodelamento benéfico na parede da aorta.

Palavras chaves: BMCs. Aorta. Aterosclerose

ABSTRACT

FONSECA, Alyne Souza Felix. **Bone marrow cell transplantation (BMCs) in atherosclerosis experimental model mice: structural, ultrastructural and molecular aortic.** 2015. 79 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

Stem cells are characterized by their ability to differentiate into multiple cell lineages and display the paracrine effect. The aim of this work was to evaluate the effect of therapy with bone marrow cells (BMCs) on blood glucose, lipid metabolism and aortic wall remodeling in mice through the administration of a high fat diet and subsequent BMCs transplantation. C57BL/6 mice were fed a control diet (CO group) or an atherogenic diet (AT group). After 16 weeks, the AT group was divided into four groups: an AT 14 days group and AT 21 days group, that were given an injection of vehicle and sacrificed at 14 and 21 days after, respectively; AT-BMC 14 days group and AT-BMC 21 days group that was given an injection of BMCs and sacrificed at 14 and 21 days after. The CO group was sacrificed along with other groups. The BMCs transplant had reduced blood glucose, triglycerides and total cholesterol. There was no significant difference in relation to body mass between the transplanted groups and non-transplanted groups, with all are different to CO group. There was no significant difference in the glycemic curve between AT 14 days group, AT-BMC 14 days group and AT 21 days group and these are different to CO and the AT-BMC 21 days group. The Qa ($1 / \text{mm}^2$) was quantitatively reduced in the AT 14 days group and AT 21 days group when compared to the CO group. This Qa proved high in AT-BMC 21 days BMC compared to all groups. The increased thickness of the aortic wall was observed in all atherogenic groups, but was significantly smaller in group AT-BMC 21 days compared to AT 14 days group and AT 21 days group. The percentage of elastic fibers was significantly higher in the AT 21 days group when compared to the CO and AT-BMC 21 days. There was no significant difference between the CO and AT-BMC 21 days. Vacuoles in the media tunica, delamination and the thinning of the elastic lamellae were observed in AT 14 days group and AT 21 days group. The smallest number of these presentation were displayed on the AT-BMC 14 days group and and AT-BMC 21 days. The immunostaining for α -SMA and VEGF showed lower in AT-BMC 14 days group and AT-BMC 21 days group. The markup for PCNA appears to be greater in the AT-BMC 21 days group. Marking to CD105, CD133 and CD68 were observed in AT 14 days group and AT 21 days group. These markings were not observed in AT-BMC 14 days group and AT-BMC 21 days group. In electron micrographs observed the beneficial remodeling in AT-BMC 14 day group and AT-BMC 21 days, with the structural organization was similar to the CO group. Vesicles of pinocytosis, projection of smooth muscle cell and delamination of the internal elastic lamina are seen in groups AT 14 days group and AT 21 days group. Endothelial cell preserved, regular and continuous contour in internal elastic lamellae is observed in the CO group, AT-BMC 14 days group and AT-BMC 21 days group. In conclusion, our results support the concept that an atherosclerotic model using mice and atherogenic diet, the injection of BMCs improve glucose, lipid metabolism and causes a beneficial remodeling of the aortic wall.

Keywords: BMCs. Aorta. Atherosclerosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Esquema de uma artéria corada.....	16
Figura 2 -	Fotomicrografia corada pela técnica de Azul de toluidina. Corte transversal que mostra parte de uma artéria elástica.....	18
Figura 3 -	Localização de lesão aterosclerótica na artéria aorta (arco aortico).....	19
Figura 4 -	Esquema da exposição vascular à fatores de risco e suas consequências.....	21
Figura 5 -	Desenvolvimento da placa aterosclerótica até a formação da obstrução.....	23
Figura 6 -	Esquema da absorção do colesterol da dieta, o transporte reverso do colesterol de tecidos periféricos até sua eliminação pelo intestino.....	25
Figura 7 -	Esquema da oxidação do LDL de acordo com a hipótese oxidativa da aterosclerose.	27
Figura 8 -	Apresentação esquemática do envolvimento de células progenitoras na regeneração de vasos e na e progressão da aterosclerose.....	29
Figura 9 -	Esquema que ilustra as diferentes populações de células progenitoras na parede do vaso.....	31
Figura 10 -	Esquema mostrando a medula óssea como fonte de células progenitoras vasculares.....	33
Figura 11	Tabela com percentuais específicos das dietas proporcionadas aos animais do experimento.....	37
Figura 12 -	Animal ao início e final das 16 semanas de experimentação.....	39
Figura 13 -	Esquema mostrando o desenho experimental completo.....	40
Figura 14 -	Esquema da coleta das células da medula óssea, isolamento e contagem para o transplante na veia caudal.....	42
Tabela 1	Massa corporal e bioquímica sanguínea.....	47
Gráfico 1	Gráfico demonstrando a área relacionada a curva glicêmica dos animais ao final do experimento.....	48
Gráfico 2	Análise quantitativa do número de núcleos de células por área analisada ($Qa\ 1/mm^2$).....	49
Gráfico3	Análise quantitativa da espessura da parede da aorta medida em micrômetros.....	50
Gráfico 4	Análise quantitativa da percentagem de fibras elástica da parede da aorta....	51
Figura 15 -	Fotomicrografias coradas com hematoxilina e eosina.....	52

Figura 16 - Fotomicrografias coradas pela técnica de resorcina fucsina de Weigert precedida de oxidação com oxona, mostrando as fibras do sistema elástico.....	53
Figura 17 - Fotomicrografias da aorta torácica marcadas para anti VEGF.....	54
Figura 18 - Fotomicrografias da aorta torácica marcada para α -SMA.....	55
Figura 19 - Fotomicrografias da aorta torácica marcadas para anti PCNA.....	56
Figura 20 - Fotomicrografias da aorta torácica marcadas para anti CD105 e CD133 nos grupos sacrificados na experimentação de 14 dias.....	57
Figura 21 - Fotomicrografias da aorta torácica marcadas para anti CD68 nos grupos sacrificados na experimentação de 21 dias.....	58
Figura 22 - Eletromicrografias de aorta contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo.....	60
Figura 23 - Eletromicrografias de aorta contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ApoE	Apolipoproteína E
α -SMA	Alfa actina de músculo liso
BMCs	Células derivadas de medula óssea
CE	Colesterol esterificado
CML	Célula muscular lisa
CPE	Células progenitoras endoteliais
ECs	Células endoteliais
FC	Colesterol livre
G-CSF	fator estimulador de colônia de granulócitos
HDL	lipoproteína de alta densidade
Grupo AT	Grupo de camundongos alimentados com dieta modificada aterogênica por 16 semanas consecutivas
Grupo AT 14 dias	Grupo de camundongos alimentados com dieta modificada aterogênica por 16 semanas consecutivas, que ao final do 16 ^a semana recebeu 150 μ L de PBS na veia da cauda e sacrificados 14 dias após.
Grupo AT 21 dias	Grupo de camundongos alimentados com dieta modificada aterogênica por 16 semanas consecutivas, que ao final do 16 ^a semana recebeu 150 μ L de PBS na veia da cauda e sacrificados 21 dias após.
Grupo AT-BMC 14 dias	Grupo de camundongos alimentados com dieta modificada aterogênica por 16 semanas consecutivas, que ao final do 16 ^a semana recebeu 150 μ L de PBS com BMCs na veia da cauda e sacrificados 14 dias após.
Grupo AT-BMC 21 dias	Grupo de camundongos alimentados com dieta modificada aterogênica por 16 semanas consecutivas, que ao final do 16 ^a semana recebeu 150 μ L de PBS com BMCs na veia da cauda e sacrificados 21 dias após.
Grupo CO	Grupo controle alimentado com dieta padrão AIN-93
HE	hematoxilina e eosina
MC	Massa corporal

LDL	lipoproteína de baixa densidade
M-CSF	fator estimulador de macrófagos
MSC	Células-tronco mesenquimais
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
Qa	Número de núcleos por área analisada
ROS	Espécie reativa de oxigênio
TG	Tricicerídeos
SP	População lateral
SVP	Células pericitos-like
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
TM	Túnica média
VEGF	Fator de crescimento vascular e endotelial
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1	Artéria aorta e disfunção endotelial	16
1.2	A doença aterosclerótica	22
1.3	Células de medula óssea e o transplante celular	28
2	OBJETIVOS	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	Animais e dieta	36
3.2	Isolamento de células de medula óssea (BMCs) e transplante de BMC	40
3.3	Massa corporal e ingestão alimentar	41
3.4	Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)	43
3.5	Análise sanguínea	43
3.6	Histoquímica e Imuno-histoquímica	44
3.7	Morfometria	44
3.8	Microscopia eletrônica de transmissão	45
3.9	Análise estatística	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Massa corporal e bioquímica sanguínea	47
4.2	Remodelamento da parede da aorta	49
4.3	Avaliação imunohistoquímica	54
4.4	Microscopia eletrônica de transmissão	59
5	DISCUSSÃO	62
	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70
	APÊNDICE A - Resumo do artigo publicado no International Journal of Clinical Experimental and Pathology	76
	APÊNDICE B - Patente devidamente registrada como Caixa imobilizadora para animais de laboratório.....	77
	APÊNDICE C – Resumo do artigo submetido para Biochemistry and Cell Biology.....	78
	ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética.....	79

INTRODUÇÃO

A aterosclerose é uma doença vascular multifatorial iniciada por disfunção endotelial, que se desenvolve de forma progressiva e é caracterizada [1] por aumento do conteúdo lípido extracelular, bem como células necróticas na camada subendotelial. A placa aterosclerótica depois de formada pode em seguida, fissurar, formar erosões ou mesmo romper, conduzindo a trombose da superfície da placa [1,2]. Evidências sugerem que a disfunção endotelial/lesão é desencadeada por vários fatores, como aumento da pressão arterial, obesidade e aumento do estresse de cisalhamento em vasos sanguíneos [3,4]. A dificuldade de detecção de placas de ateroma em seres humanos através de métodos não invasivos complica ainda mais a nossa compreensão do desenvolvimento dessa doença [5].

Uma dieta desequilibrada associada a um estilo de vida sedentário favorece o desenvolvimento de dislipidemia, obesidade, inflamação e lesão vascular [6,7]. O consumo elevado de ácidos graxos saturados contribui para a progressão de aterosclerose e hipercolesterolemia [8,9]. Assim, vários modelos animais têm sido desenvolvidos para compreender melhor o desenvolvimento da placa, sendo um destes modelos o de camundongos alimentado com uma dieta rica em gorduras com adição de ácido cólico e colesterol [10,11]. Uma dieta aterogênica consistindo em 15% de gordura, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cólico é capaz de provocar a formação de placas ateroscleróticas em aortas de camundongos após 15 semanas [12]. O ácido cólico é um ácido biliar que facilita a absorção de gordura e colesterol. Quando adicionado à ração para camundongos, reduz a concentração plasmática da apolipoproteína E (Apo E) e afetam o transporte reverso de colesterol, o qual é um mecanismo importante que transporta o colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, onde ele é excretado através do ducto biliar [13, 14]. Sem este mecanismo, os lípidos acumulam-se no plasma, o que pode levar ao desenvolvimento de aterosclerose.

As células da medula óssea (BMCs) são a principal fonte para terapias de transplante de células tronco, e estudos mostraram que elas são capazes de gerar uma atividade de remodelamento na aterosclerose [15]. Na medula óssea, existe uma população de células heterogêneas, incluindo as células do sangue, da linhagem de células-tronco hematopoiéticas, as células tronco mesenquimais e células progenitoras endoteliais [16-19]. Estudos sugerem que o homing vascular de células progenitoras endoteliais (EPCs) contribui para a recuperação endotelial, limitando assim a formação da neointima após injúria arterial. Em

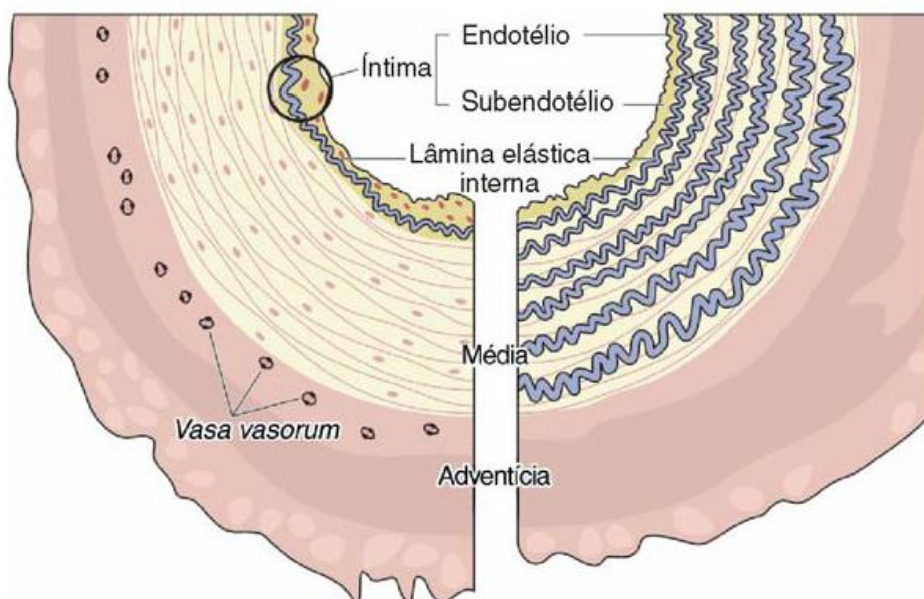
pacientes com doença coronariana, o número e a função de EPCs foram relacionados com a melhora da função endotelial ou mesmo sua regeneração, entretanto, foram inversamente correlacionadas com o risco cardiovascular [20]. Pensa-se que as células progenitoras endoteliais podem reparar e renovar as paredes arteriais em condições fisiológicas específicas. Por exemplo, as células progenitoras capazes de estabilizar a placa aterosclerótica em condições patológicas [21]. Ademais, estudos demonstraram que a infusão de células de medula óssea apresenta efeito neuroprotetor após um evento de isquemia cerebral permanente [22]. Por outro lado, outros estudos mostraram que as células progenitoras endoteliais contribuem para a formação de lesões ateroscleróticas [23]. Assim, se o transplante de BMCs iria progredir ainda mais a lesão ou seriam benéfico para aquele organismo, ainda é controverso [15,24]. EPCs, um tipo de células progenitoras do sangue periférico, tem emergido como um biomarcador de risco cardiovascular em humanos adultos [25]. Tendo em vista a preocupação em relação à morbidade e mortalidade devido à aterosclerose associada à obesidade, é importante investigar os potenciais benefícios ou riscos associados com a terapia celular.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Artéria aorta e disfunção endotelial

O sistema circulatório abrange o sistema vascular sanguíneo e o sistema vascular linfático. O sistema vascular sanguíneo é composto das seguintes estruturas: coração, artérias, capilares e veias. Os vasos sanguíneos são normalmente compostos das seguintes camadas ou túnicas: túnica íntima, túnica média e túnica adventícia [26]. Na Figura 1 podemos observar a estruturação de uma artéria elástica, com as suas 3 camadas características, a túnica íntima, túnica média e túnica adventícia.

Figura 1: Esquema de uma artéria corada.



Legenda: Técnica de hematoxilina e eosina (à esquerda) e pelo método de Weighert (à direita) para visualização das fibras elásticas

Fonte: Junqueira, Luiz; Carneiro, José. Histologia Básica: Texto e Atlas. 10. ed. 2004. 488p [26].

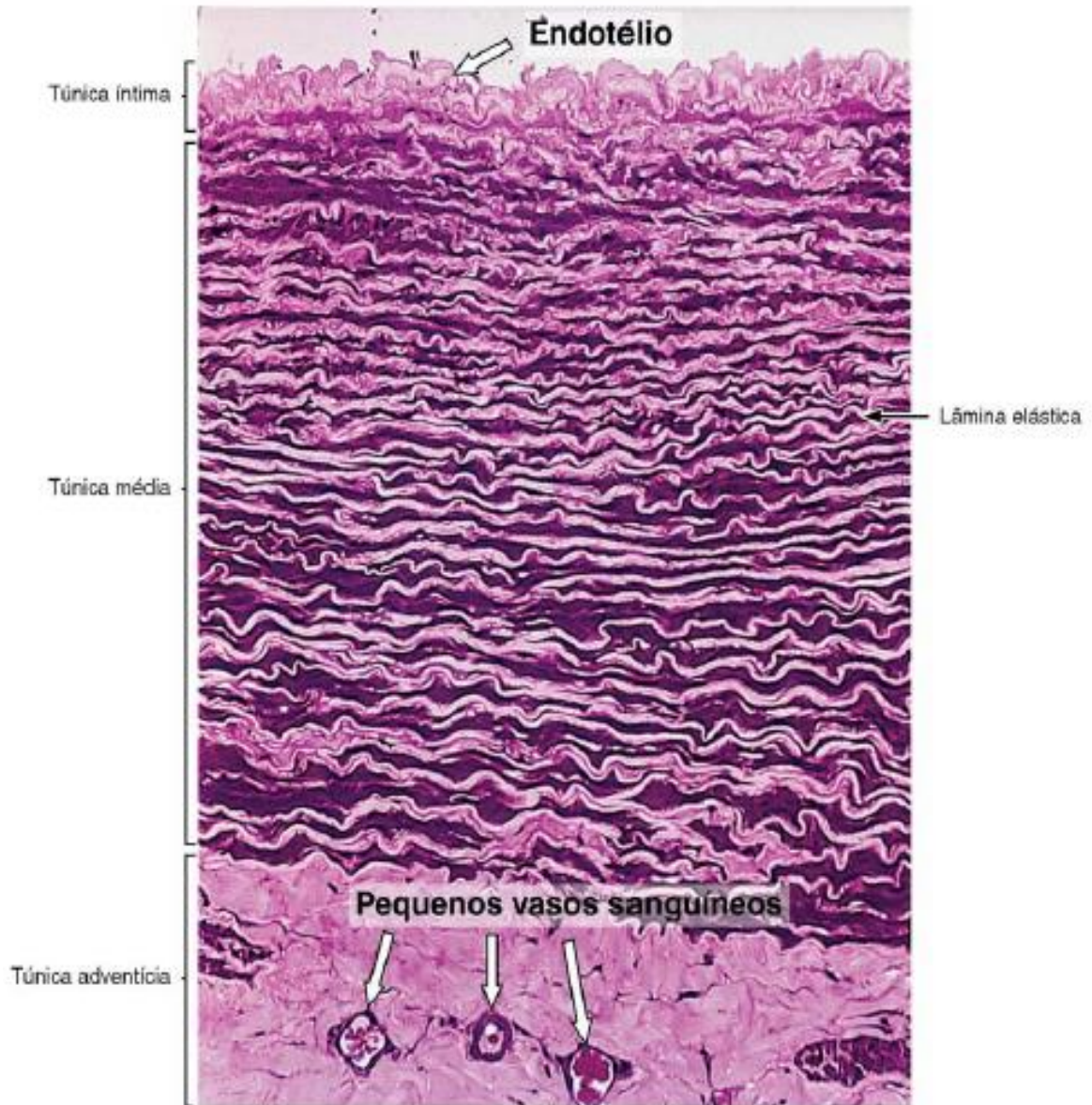
Nas artérias de grande calibre, a túnica íntima é a camada mais próxima do lúmen do vaso e apresenta uma única camada de células endoteliais apoiada sobre uma camada de tecido conjuntivo frouxo, o qual podem conter ocasionalmente células musculares lisas, como na patologia da aterosclerose. Esta camada se separa da túnica média por uma lâmina elástica interna. Esta lâmina é composta de fibras do sistema elástico (fibras oxitalânicas, elaunínicas e elásticas). Ademais, possui fenestrações por onde ocorre a difusão de substâncias para nutrir células mais profundas do vaso. A delaminação das lâminas elásticas, assim como seu adelgaçamento, é esperada em casos como hipertensão arterial e obesidade.

A túnica média é composta principalmente de lamelas elásticas e camadas concêntricas de células musculares lisas organizadas helicoidalmente. Além destas estruturas, também se observa fibras de colágeno tipo 3, proteoglicanos e glicoproteínas.

A túnica adventícia é composta em sua maioria de fibras de colágeno e fibras elásticas, tornando-se gradualmente contínua com o tecido conjuntivo do órgão onde este se continua.

A aorta é considerada uma artéria elástica onde é formada de camadas de músculo liso intercaladas de lâminas elásticas [27]. Esta descrição pode ser observada abaixo na figura 2.

Figura 2: Fotomicrografia de vaso corada pela técnica de Azul de toluidina

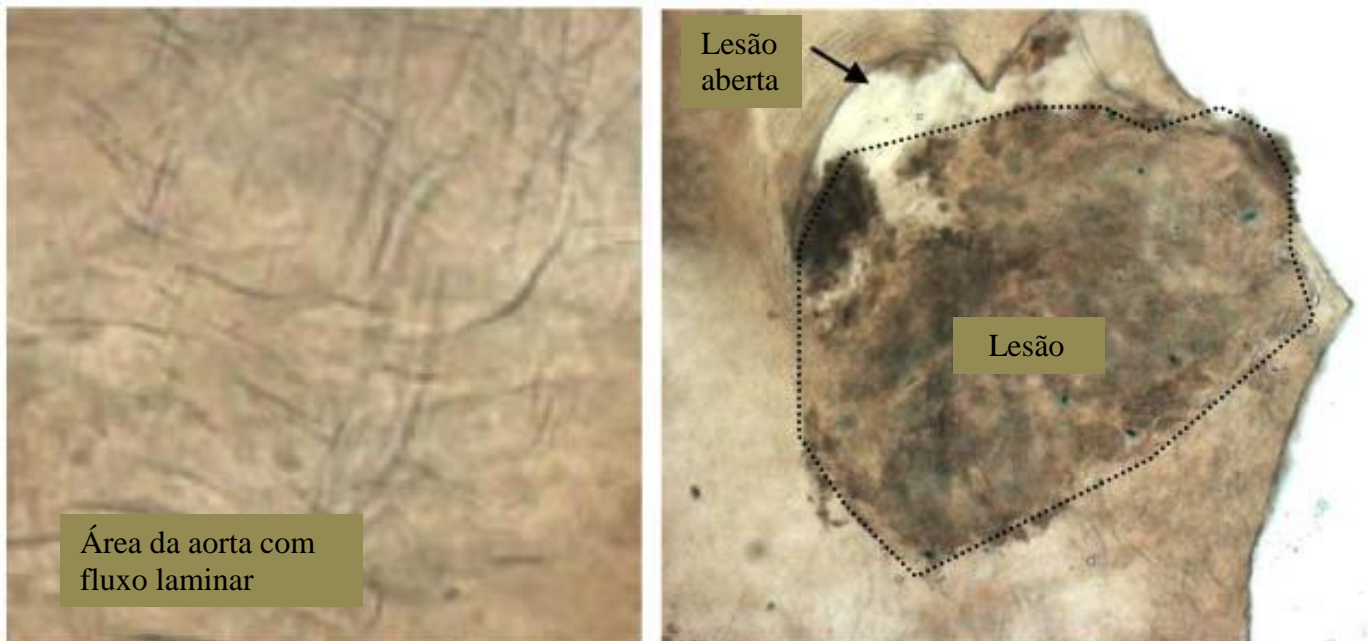


Legenda: Corte transversal que mostra parte de uma artéria elástica.

Fonte: Junqueira, Luiz; Carneiro, José. Histologia Básica: Texto e Atlas. 10. ed. 2004. 488p [26].

O fluxo de sangue no vaso gera atrito paralelo, ou seja, a tensão de cisalhamento sobre as células endoteliais e o estresse de tensão tanto nestas células como em células musculares lisas. O fluxo laminar e fluxo perturbado são as duas formas principais de tensão de cisalhamento. Observa-se claramente que a aterosclerose geralmente ocorre em pontos ou curvas de ramificação com o fluxo perturbado na geometria da artéria [28].

Figura 3: Localização de lesão aterosclerótica no arco da aorta.



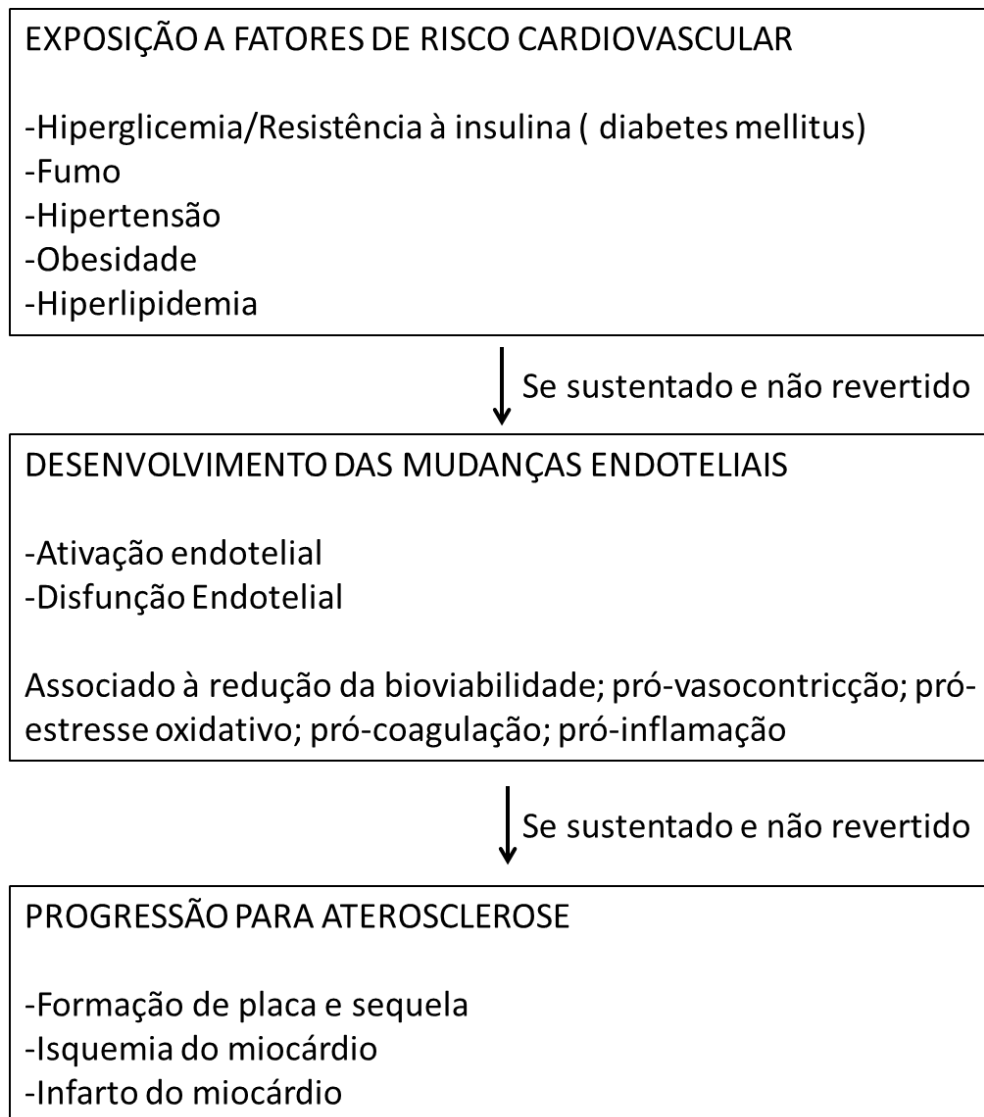
Legenda: A primeira figura mostra a área com fluxo laminar e a área de ramificação com alterações do fluxo sanguíneo (painel da direita) a partir das aortas de rato.

Fonte: modificado por **bai et al. 2010** [28].

O endotélio é um epitélio pavimentos simples composto por células endoteliais, que proporciona uma barreira entre a parede vascular e o fluxo sanguíneo. Possui funções importantes, não só como órgão autócrino/parácrino, na qual regula a contração da parede vascular e a migração de células do sangue para o interior do vaso, mas também age como um mediador hormonal e celular para células circulantes [29,30]. O endotélio controla o tônus da musculatura vascular pela produção de mediadores, que podem produzir vasodilatação ou vasoconstrição. Os principais mediadores do relaxamento são o óxido nítrico, o fator hiperpolarizante derivado de endotélio e prostaciclina [31].

As células endoteliais servem como uma barreira entre a parede do vaso e o sangue circulante, onde desempenham um papel essencial na regulação da homeostase vascular. Estas células têm uma função na manutenção do tônus vascular, na modulação da permeabilidade e participando de respostas biológicas, tais como inflamação. A disfunção endotelial é o acontecimento chave no desenvolvimento da aterosclerose e antecede patologias vasculares clinicamente em muitos casos [32]. A disfunção endotelial caracterizada pela redução da biodisponibilidade do óxido nítrico é hoje reconhecida como um precursor inicial e ainda reversível da aterosclerose. A patogênese da disfunção é multifatorial, no entanto, o estresse oxidativo parece ser o mecanismo celular na consequente perda de atividades vasoativas, inflamatórias e hemostáticas no sistema vascular do organismo. O papel da disfunção endotelial como um elo fisiopatológico entre as mudanças precoces das células endoteliais associadas a fatores de risco cardiovascular estão envolvidas na patogênese da aterosclerose. Fatores de exposição vascular, de risco e suas consequências até o final desenvolvimento da aterosclerose são citados na figura 4.

Figura 4: Esquema da exposição vascular a fatores de risco e suas consequências



Fonte: modificado de **mudau et al. 2012**: [1].

Quando o dano endotelial compromete a função normal e um desequilíbrio dinâmico intracelular, provavelmente desencadeia um fenótipo aterosclerótico.

Nas doenças cardiovasculares, ocorrem diversas alterações na morfologia dos vasos sanguíneos [33]. Dentre estas mudanças, podemos destacar em especial o espessamento das túnicas íntima e média das artérias de grande calibre, seja por proliferação celular, hipertrofia ou apoptose de células musculares lisas, além de acúmulo de componentes de matriz extracelular no espaço subendotelial [34, 35]. Observa-se também a projeção de células musculares lisas da túnica média no espaço subendotelial através da lâmina elástica interna [36].

1.2 A doença aterosclerótica

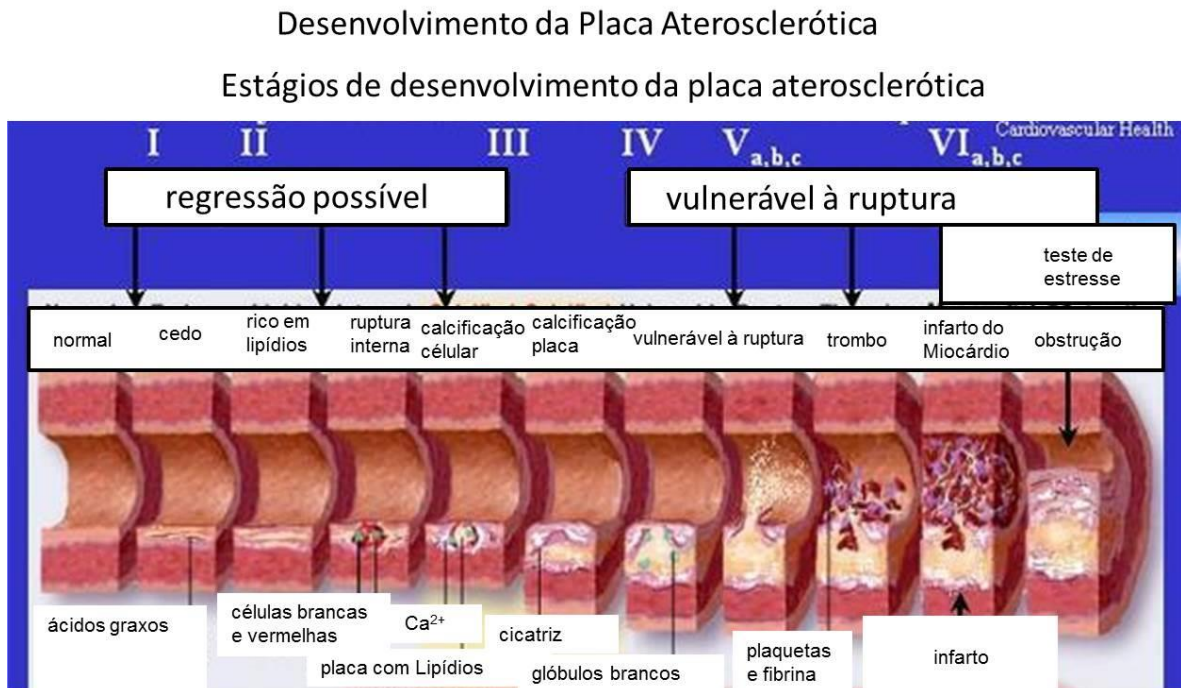
A aterosclerose é uma doença universal entre países mais desenvolvidos. As taxas de mortalidade para doenças cardíacas isquêmicas nos EUA ficam entre as mais altas do mundo. A prevalência e a intensidade da aterosclerose estão diretamente relacionadas com os fatores de risco, identificados em vários estudos prospectivos em populações bem definidas, mais notavelmente pelo Framingham Heart Study e o Atherosclerosis Risk in communities Study [37-39]. Quando citados fatores de risco para a aterosclerose, são descritos os modificáveis e não modificáveis. Nos não modificáveis estão inseridos o aumento da idade, gênero masculino, antecedentes familiares e anormalidades genéticas. Nos modificáveis estão inseridos a hiperlipidemia, hipertensão, tabagismo, diabetes e proteína c-reativa [37].

A aterosclerose é uma doença crônica inflamatória que afeta os vasos sanguíneos com a formação de placas de ateroma. Estas placas consistem, principalmente, de um núcleo lipídico e uma capa fibrosa que se desenvolve no interior da camada íntima. Esta placa diminui o diâmetro do lúmen e pode obstruí-lo completamente [28]. A aterosclerose é uma doença vascular multifatorial progressiva iniciada por disfunção endotelial, recrutamento de tipos celulares circulantes, com um desenvolvimento temporal caracterizado pelo aumento do teor de lipídio extracelular, bem como de células necróticas na camada subendotelial [1].

A placa aterosclerótica pode sofrer fissura, erosão ou ruptura, levando a trombose da superfície da placa [1,2]. A descrição do desenvolvimento de uma placa aterosclerótica desde

o seu início de depósito de lipídios até a ruptura da placa e suas consequências como um infarto do miocárdio pode ser observado na figura 5.

Figura 5: Desenvolvimento da placa aterosclerótica até a formação da obstrução.



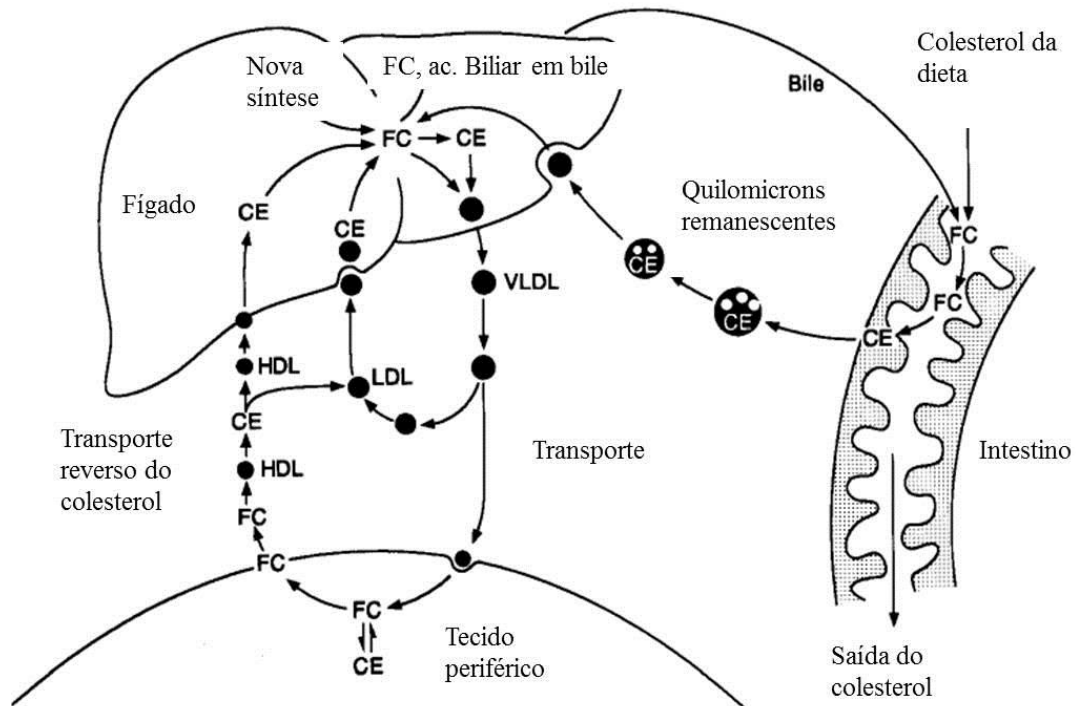
Fonte: modificado de Milton, E; Alves, Jr MD. Cardiovascular Health.

Infelizmente, a caracterização dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes a esta doença é dificultado por causa da complexidade e cronicidade da mesma. A disfunção endotelial / injúria é desencadeada por vários fatores, como aumento da pressão arterial, obesidade e tensão de cisalhamento nos vasos sanguíneos [3, 4]. Todas estas condições podem contribuir para o aparecimento de desenvolvimento de placa, uma vez que facilitam a ativação e agregação das plaquetas pela liberação do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e a adesão de células de sangue. A dificuldade na detecção de placas de

ateroma em seres humanos através de um método não invasivo complica ainda mais a compreensão do exato mecanismo de desenvolvimento da doença [5].

Uma dieta desequilibrada associada a uma vida sedentária favorece o desenvolvimento de dislipidemia, obesidade, inflamação e lesão vascular [6, 7]. Além disso, o consumo elevado de ácidos graxos saturados na dieta contribui para o desenvolvimento de hipercolesterolemia e aterosclerose [8, 9]. Uma dieta rica em colesterol possui um quadro específico sobre a parede arterial. O transporte reverso de colesterol é a via pela qual o colesterol de tecidos periféricos pode ser devolvido ao fígado a fim de ser eliminado. Dentre estes tecidos periféricos, a parede da aorta possui este mecanismo para eliminação de colesterol [40].

Figura 6: Esquema da absorção do colesterol da dieta, o transporte reverso do colesterol de tecidos periféricos até sua eliminação pelo intestino.



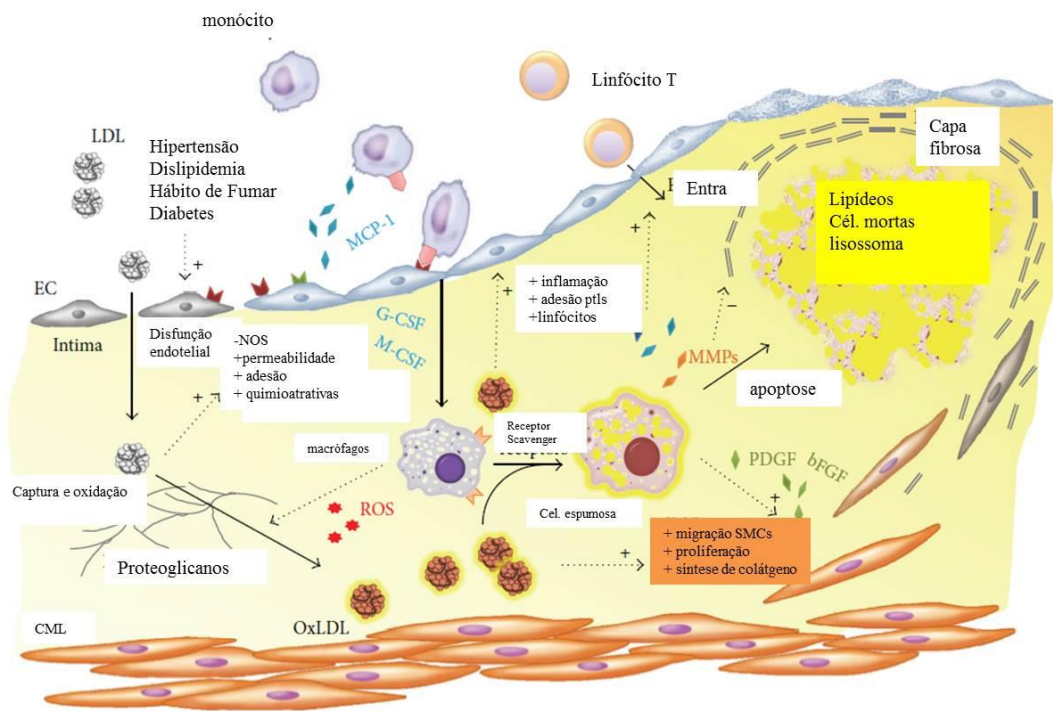
Legenda: Colesterol livre (FC); colesterol esterificado (CE); lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL); lipoproteína de baixa densidade (LDL); lipoproteína de alta densidade (HDL). Setas indicam a direção do transporte

Fonte: modificado de **fielding et al. 1995** [40].

Os processos irritativos do endotélio (diabetes, dislipidemia, fumo e hipertensão) iniciam uma cascata de modificações que ocorrem em áreas de ramificações e bifurcações dos vasos sanguíneos, onde se possui a presença de fluxo sanguíneo laminar turbilhado e estresse de cisalhamento [41, 42]. Neste contexto, o endotélio expressa moléculas de adesão e substâncias quimiotáticas que aumentam a permeabilidade às macromoléculas e modificam a composição da matriz extracelular do espaço subendotelial. Assim, ocorre à entrada de LDL, que ficam retidas através da apolipoproteína B100 à proteoglicanos da matriz extracelular, sendo este reconhecido como o ponto inicial da aterogênese [43]. Esses LDL presos à matriz são oxidados e, com isso, perdem a capacidade de se ligar aos receptores de LDL para seguir o curso de um transporte reverso. Com este enclausuramento de LDL, ocorre a estimulação de monócitos circulantes e diferenciação em macrófagos (células CD68 +), granulócitos, fatores estimuladores de colônia e quimiotáticos. Estes macrófagos são capazes de promover a oxidação do LDL através da mieloperoxidase e espécies reativas de oxigênio. Quando o LDL está completamente oxidado, receptores presentes nos macrófagos chamados receptores Scavenger, reconhecem e recrutam esses LDL, formando as chamadas células espumosas [42, 44]. Macrófagos produzem fatores pró-inflamatórios como interleucinas e fator de necrose tumoral.

Outro efeito no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas são células de músculo liso (SMCs), que são recrutadas a partir da túnica média para o espaço subendotelial, onde elas proliferam em resposta a mediadores, tais como o PDGF. A α -actina de músculo liso é um importante marcador para a visualização desta proliferação e organização destas células. As células musculares lisas, que estão na túnica íntima, produzem componentes da matriz extracelular como colágeno e elastina e estes compoem a capa fibrosa, que irá aumentar com o desenvolver da aterosclerose. Esta placa é composta de células espumosas, lipídios, células necróticas e envoltos por esta capa fibrosa [42, 45].

Figura 7: Esquema da oxidação do LDL de acordo com a hipótese oxidativa da aterosclerose.



Legenda: Célula endotelial (EC); célula muscular lisa (CML); LDL oxidado (OxLDL); espécie reativa de oxigênio (ROS); fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF); fator estimulador de macrófagos (M-CSF); proteína quimiotática de monócitos (MCP-1); metaloproteinases (MMPs); fator estimulador derivado de plaqueta (PDGF); fator de crescimento de fibroblasto (bFGF);

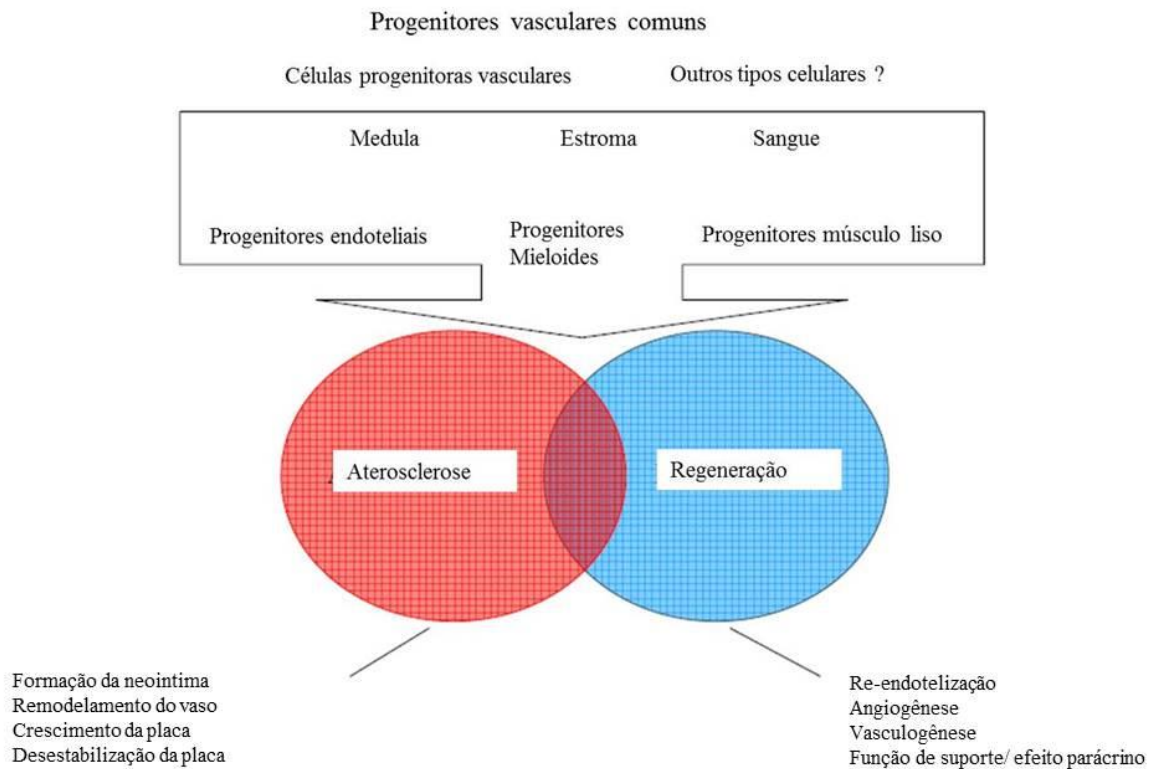
Fonte: modificado de **Maiolino et al. 2013** [42].

Os modelos experimentais em animais foram desenvolvidos a fim de compreender melhor o desenvolvimento da placa aterosclerótica, e dentre eles, há um modelo de camundongos com dieta rica em gordura, ácido cólico e colesterol que se apresenta como um excelente perfil para estudo [10, 11]. Uma dieta aterogênica consiste em 15% de gordura, 1.25% de colesterol e 0.5% de ácido cólico para a formação da placa de ateroma na aorta em modelo com camundongos alimentados por 15 semanas [12]. O ácido cólico é um ácido biliar que facilita a absorção de gordura e colesterol. Quando adicionado à ração de camundongos, faz reduzir a concentração plasmática da Apo E, que afeta o transporte reverso de colesterol, o qual é um mecanismo importante para o transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, onde ele é excretado através do ducto biliar [13, 14]. Sem este mecanismo, os lipídeos acumulam no plasma e podem levar ao desenvolvimento da aterosclerose.

1.3 Células de medula óssea e o transplante celular

As células da medula óssea (BMCs) são a principal fonte utilizada para terapia celular e estudos têm demonstrado a sua capacidade de remodelamento na aterosclerose [15].

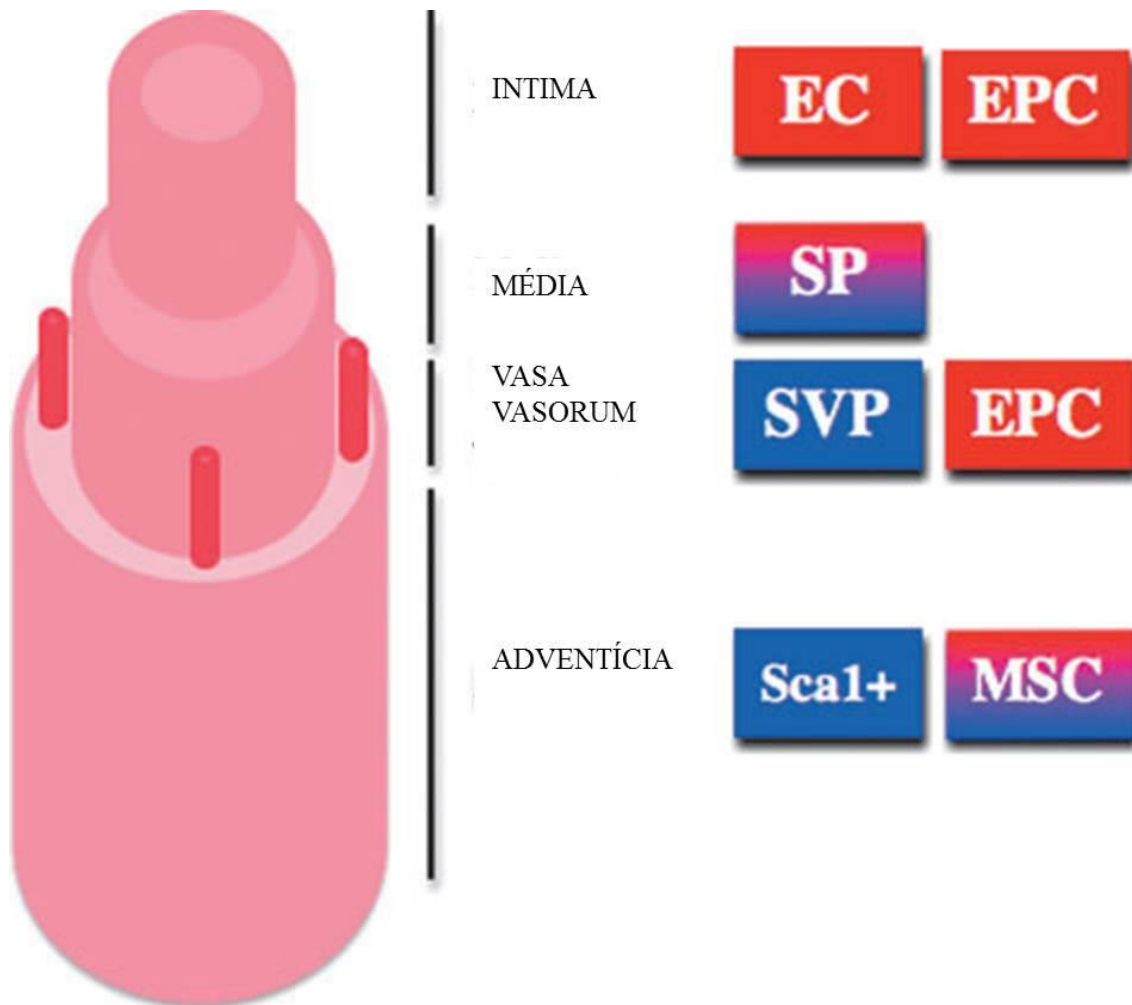
Figura 8: Apresentação esquemática do envolvimento de células progenitoras na regeneração de vasos e na progressão da aterosclerose.



Fonte: modificado de **Dotsenko et al. 2010** [16].

Na medula óssea temos uma população heterogênea de células. Como exemplo podemos citar células da linhagem sanguínea, as células tronco hematopoiéticas, as células tronco mesenquimais e os progenitores endoteliais. [16, 17, 18, 19]. Evidências sugeriram que o homing vascular de EPCs contribui para a recuperação endotelial, limitando assim a formação de neo-íntima após a lesão arterial. Em pacientes com doença arterial coronariana, o número e a função de EPCs têm sido associados com uma melhora da função endotelial ou regeneração, mas foram inversamente correlacionados com o risco cardiovascular [20].

Figura 9: Esquema que ilustra as diferentes populações de células progenitoras na parede do vaso



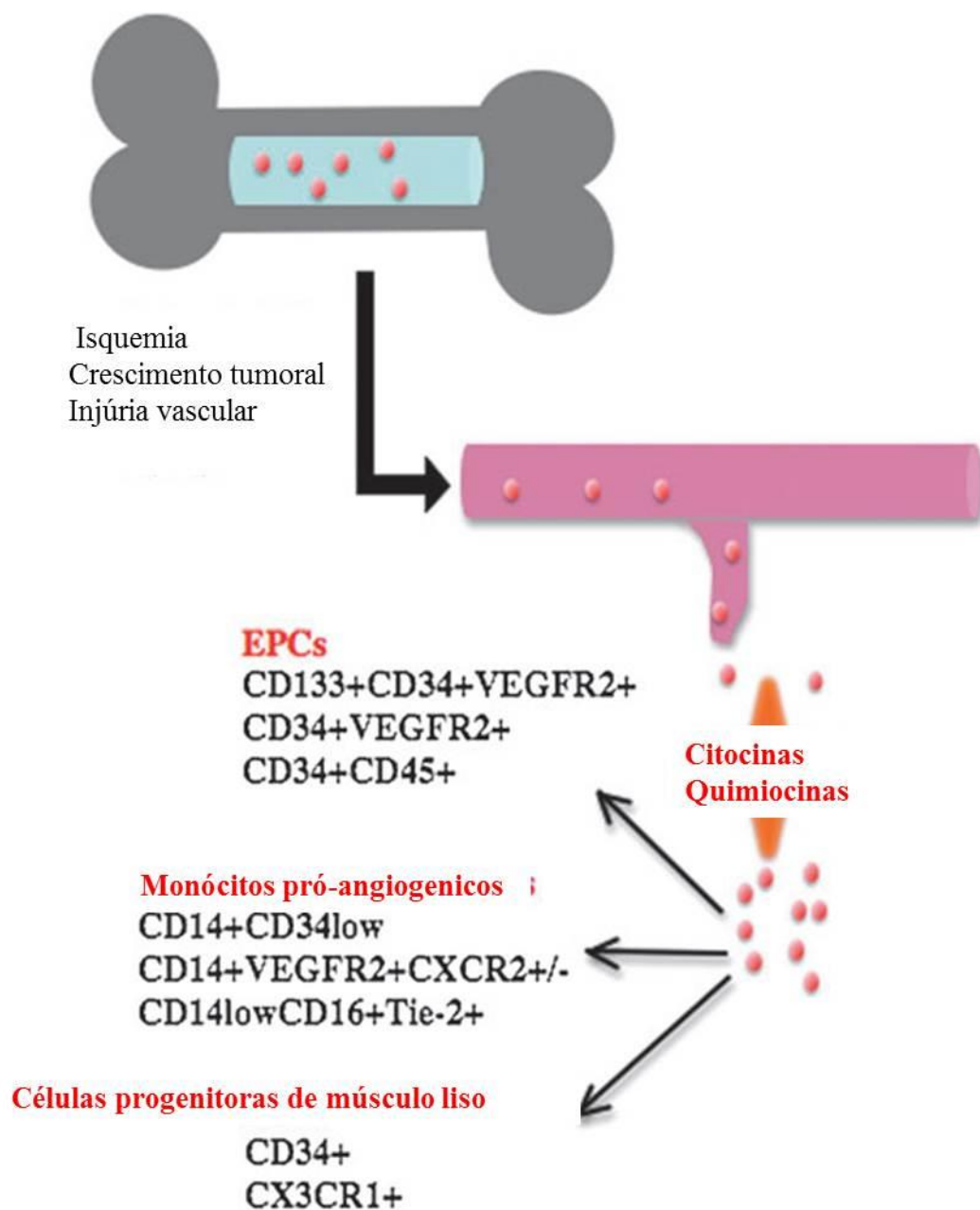
Legenda: Populações foram isoladas a partir de cada uma das camadas da parede do vaso: a camada íntima inclui células endoteliais (ECs), capazes de expansão clonal; uma população lateral (SP) de células ABGC2 foi isolada a partir da túnica média; na região dos Vasa Vasorum foram encontrados células pericitos-like (SVP) e células progenitoras endoteliais (EPC); e na adventícia, Sca1+ e células-tronco mesenquimais (MSC) foram encontradas. Código de cor indica a plasticidade das populações em direção ECs (de cor em vermelho) ou linhagens murais (de cor azul).

Fonte: modificado de **campagnolo et al. 2011** [15].

Pensa-se que as células progenitoras endoteliais podem reparar e renovar as artérias em condições fisiológicas específicas. Por exemplo, as células progenitoras estabilizam a placa aterosclerótica em condições patológicas [21] e estudos demonstraram que a infusão de células de medula óssea é neuroprotetora após isquemia cerebral permanente [22]. Por outro lado, outros estudos mostraram que as células progenitoras endoteliais contribuíram para a formação de lesões ateroscleróticas [23]. Sendo assim, se as BMCs seriam benéficas ou se aumentariam a injúria aterosclerótica, ainda é controverso [15, 24].

Uma evidência crescente indica que as forças mecânicas, citocinas e outros fatores influenciam a diferenciação de células tronco em células musculares lisas e células endoteliais. No entanto, o mecanismo exato pelo qual estas células reduzem o desenvolvimento da doença, bem como em que estágio que iria acontecer, é pouco compreendido.

Figura 10: Esquema mostrando a medula óssea como fonte de células progenitoras vasculares.



Legenda: Estímulos patológicos, tais como a isquemia, tumor ou lesão vascular realizam a mobilização de células progenitoras da medula óssea e a atração do fluxo de sangue através de agentes quimioatrativos. Uma vez no local, células derivadas de medula óssea sofrem diferenciação de acordo com o microambiente local. Abreviatura: EPCS (células progenitoras endoteliais)

Fonte: modificado de **campagnolo et al. 2011** [15].

O baixo número de EPCs em circulação surgiu como um biomarcador de risco cardiovascular em humanos adultos [25]. Uma vez que há uma preocupação crescente em relação à morbidade e mortalidade devido à aterosclerose associada à obesidade, é importante investigar os benefícios ou riscos devido à terapia de células potenciais. Portanto, este trabalho visa avaliar o efeito da terapia com BMC no metabolismo lipídico e remodelamento da parede da aorta em camundongos C57BL/6 por meio da administração de uma dieta rica em gordura e posterior transplante BMCs.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar os parâmetros morfológicos (estrutural e ultraestrutural) em diferentes estágios pós-transplante de células de medula óssea (BMCs) na fisiologia da artéria aorta em modelo experimental de aterosclerose induzida por dieta hiperlipídica com associação de ácido cólico em camundongos C57BL/6.

2.2 Objetivos específicos

- Induzir sobrepeso e resistência à insulina em camundongos C57BL/6 por administração de dieta hiperlipídica;

-Avaliar os efeitos do tratamento com transplante de células derivadas de medula óssea sobre:

- a) a massa corporal dos animais;
- b) os níveis sanguíneos de glicose, triglicerídeos e colesterol total;
- c) a espessura da parede da aorta;
- d) a apresentação e quantificação de fibras do sistema elástico;
- e) o número de células presentes na túnica média;
- f) análise estrutural da parede da aorta.
- g) marcadores específicos para avaliação da parede arterial (VEGF, α -SMA, PCNA ; CD105, CD133, CD68);
- e) a ultraestrutura da parede da aorta;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais e dieta

O estudo foi realizado de acordo com o *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* 2011 in press by the National Academies press, Washington, DC. Todos os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética local (CEUA/010/2011).

Camundongos machos C57BL/6 ($n = 50$, $32 \text{ g} \pm 1,5$) foram obtidos a partir do Instituto de Pesquisa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) e alojados no centro de cuidados animais no Laboratório de Histologia e Embriologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Brasil. O biotério possuiu o ambiente controlado com ciclo de claro/escuro (12h/12h). Os camundongos foram alocados em gaiolas individuais e distribuídos aleatoriamente em dois grupos: o grupo controle (grupo CO - $n = 10$ animais) foi alimentado com uma dieta padrão (AIN 93 - 22g proteína/kg), assim como o conteúdo vitamínico e mineral em ambas as dietas eram idênticas, e de acordo com as recomendações do “American Institute of Nutrition” para roedores na fase de manutenção (AIN 93M [48]) durante 16 semanas; o grupo dieta aterogênica (grupo AT - $n = 40$) foi alimentado com uma dieta aterogênica modificada que consistia de 60 % de gordura (óleo de soja 10% com 50% de banha de porco), ácido cólico (0,5%) e de colesterol (1,25%) durante 16 semanas [11, 49]. As dietas foram produzidas por pragsoluções Biociências (São Paulo, Brasil) e detalhes dos componentes estão descritos na Tabela abaixo.

Figura 11: Tabela com percentuais específicos das dietas proporcionadas aos animais do experimento

Conteúdo (g/Kg)	GRUPO	
	CO	AT
Caseina ($\geq 85\%$ de proteína)	140.0	190.0
Amido de milho	620.7	250.7
Sacarose	100.0	100.0
Óleo de soja	40.0	40.0
Banha de porco	-	320.0
Fibra	50.0	50.0
mix* de vitamina	10,0	10,0
mix* de minerais	35,0	35,0
L-Cystina	1,8	1,8
Cholina	2,5	2,5
Antioxidante	0,008	0,008
Ácido cólico	-	0,500g
Colesterol	-	1,250g
Total gramas	1.000,0	1.001,758
Ener gia(Kcal/Kg)	3573	5415,25
Carboidrato(%)	76	26
Proteina (%)	14	14
Lipidios (%)	10	60

Legenda: * Misturas de Vitaminas e Minerais segundo a AIN-93M
 Fonte: AIN-93M [48].

Abaixo temos a disposição inicial dos grupos:

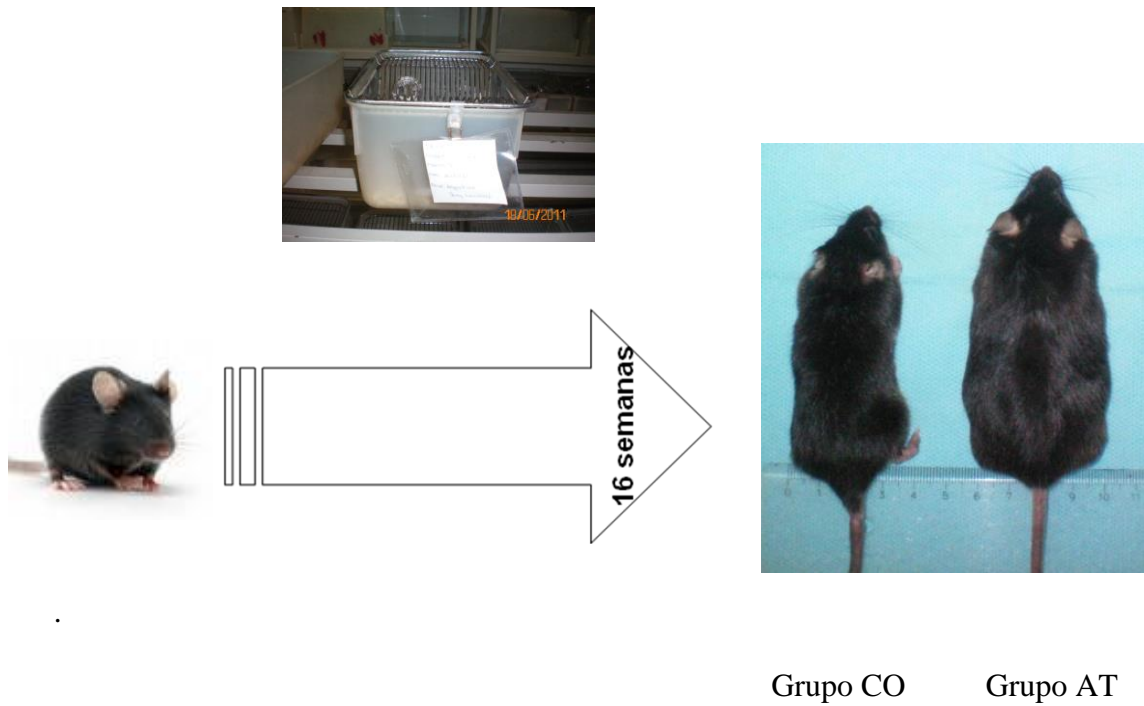
- **CO (grupo controle):** camundongos (n= 10) C57BL/6 alimentados com dieta AIN-93M durante 16 semanas. Foram mortos para análise aos 14 e 21 dias.
- **Grupo AT (grupo aterogênico):** camundongos (n= 40) C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas.

Os animais alimentados com dieta modificada aterogênica (grupo AT) durante 16 semanas foram subdivididos aleatoriamente para compor os seguintes grupos com o objetivo de manter a amostra homogênea:

- **AT 14 dias:** camundongos (n=10) C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 µL de PBS na veia caudal e mortos 14 dias após.
- **AT-BMC 14 dias:** camundongos (n=10) C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 µL de PBS contendo BMC na veia caudal e mortos 14 dias após.
- **AT 21 dias:** camundongos (n=10) C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 µL de PBS na veia caudal e mortos 21 dias após.
- **AT-BMC 21 dias:** camundongos (n=10) C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 µL de PBS contendo BMC na veia caudal e mortos 21 dias após o transplante.

Todos os grupos continuaram recebendo suas respectivas dietas após o transplante de acordo com seus grupos. O grupo controle foi morto no mesmo dia que os grupos 14 dias e 21 dias foram sacrificados.

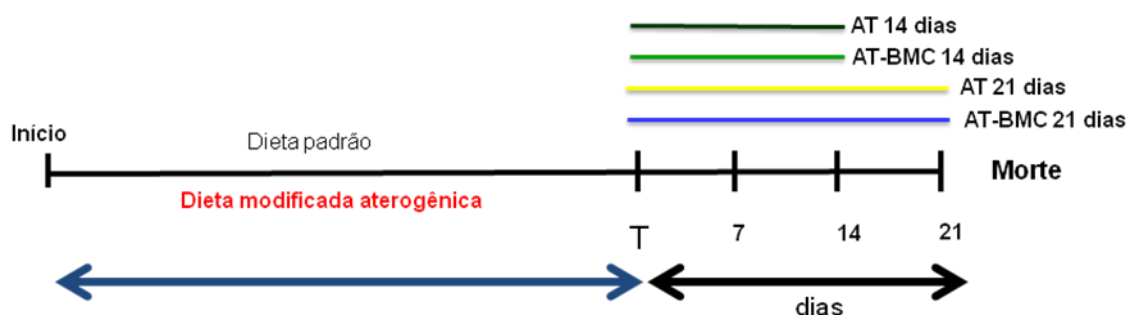
Figura 12: Animal ao início e final das 16 semanas de experimentação.



Legenda: fotos ao início e final das 16 semanas de dieta. Os animais foram alocados em gaiolas individuais.
Abreviaturas: Grupo CO (grupo alimentado com dieta padrão durante 16 semanas; Grupo AT (camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas).

O grupo controle foi morto no mesmo momento que os grupos subdivididos. A ingestão hídrica foi oferecida *ad libitum* durante todo o experimento.

Figura 13: Esquema mostrando o desenho experimental completo.



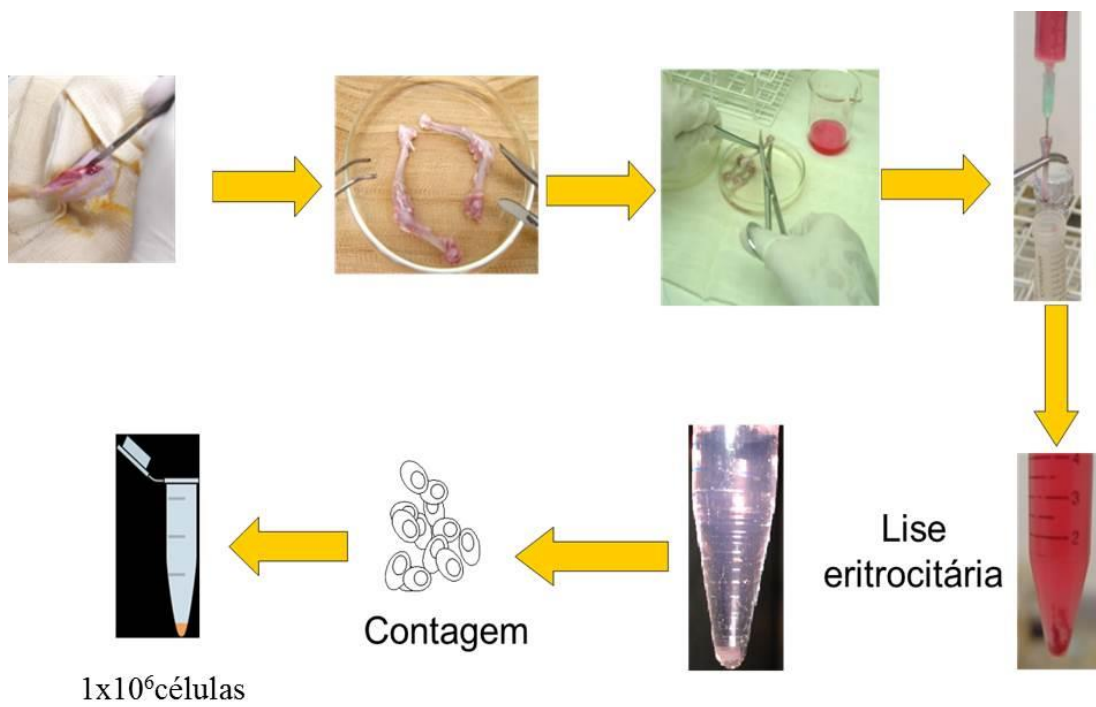
Legenda: Abreviaturas: AT 14 dias – camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT-BMC 14 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT 21 dias – camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS na veia caudal e sacrificados 21 dias após; AT-BMC 21 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 21 dias após o transplante.

3.2 Isolamento de células de medula óssea (BMCs) e transplante de BMC

As BMCs foram obtidas a partir de camundongos machos C57BL/6 (n = 10, 28-30 g, INCA - Rio de Janeiro). Os camundongos foram anestesiados com pentobarbital (150 mg/kg), e as BMCs foram isoladas a partir dos fêmures e tíbias [22, 50]. As cavidades medulares dos ossos foram expostas e lavadas com DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma Aldrich - St. Louis, MO, EUA), pH 7.2 [50]. O BMCs foram ressuspensas em tampão de

lise de glóbulos vermelhos (NaHCO_3 10 mM, NH_4Cl 150 mM, 0,4% de EDTA, pH 7,4) durante 10 minutos a 37 ° C. Em seguida, as células foram lavadas e contadas numa câmara de Neubauer e ajustado para 10^6 células por ensaio para o transplante (seringa BD Ultra-Fine II 0,5 ml) na veia da cauda [50].

Figura 14: Esquema da coleta das células da medula óssea, isolamento e contagem para o transplante na veia caudal.



Fonte: modificado de **carvalho et al. 2010** [50].

3.3 Massa corporal (MC) e ingestão alimentar

A massa corporal (MC) foi aferida em balança digital semanalmente, a partir do início do experimento e durante todo o seu curso. As médias dos grupos em cada semana foram calculadas e traçadas. O controle da ingestão alimentar foi realizado diariamente, sendo a dieta fresca fornecida diariamente e todo restante do dia anterior pesado e descartado, pois devido ao alto teor de gordura da dieta modificada aterogênica, estava mais susceptível à rancificação.

3.4 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

Com o objetivo de avaliar a tolerância à glicose, o TOTG foi realizado ao início e final de cada fase do experimento. Ao início, este teste comprovou que os animais dos grupos compunham uma amostra homogênea para a iniciação das distintas fases e, posteriormente ao final do experimento (dia da morte). O sangue foi coletado através de uma incisão pequena na ponta da cauda, e a concentração de glicose plasmática foi medida através de glicosímetro (Accu-Chek Active; Roche Applied Science, Brasil). Inicialmente foi realizada a glicemia de jejum, e após a administração de solução de 25% de glicose (2g/kg camundongo) por gavagem, a glicemia foi novamente aferida nos tempos de 15, 30, 60, 120 minutos. No dia da aferição, os camundongos permaneceram em jejum de seis horas. A resposta foi expressa pela diferença estatística da glicemia de jejum bem como a área sob a curva (AUC) (Graph Pad Prism versão 5.03, San Diego, CA, EUA). O resultado foi exposto na área da curva glicêmica.

3.5 Análise sanguínea

Ao início do estudo, os níveis de glicose no sangue foram avaliados em todos os animais, mantendo esta amostra homogênea e homocedástica. Os mesmos níveis de glicose foram examinados no dia da morte. Os camundongos foram mantidos a um jejum durante 6 horas e, em seguida, anestesiados com pentobarbital (150 mg/kg). A parede torácica foi aberta através de uma incisão mediana; em seguida, o sangue foi colhido por punção cardíaca através da aurícula direita, centrifugados a 1500 rpm durante 15 minutos e armazenadas a -80°C. Do

soro, foi avaliada a glicose sanguínea, triglicerídeo (TG), colesterol total (CT) por um ensaio colorimétrico enzimático (Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil).

3.6 Histoquímica e Imuno-histoquímica

A aorta torácica (terço médio) e o arco aórtico adjacente foram isolados do tecido circundante. Estes materiais foram imersos em 4% de formaldeído (tampão fosfato 0,1 M pH 7,2, durante 48 h) para microscopia de luz e seccionados de acordo com o método de corte vertical. As amostras foram processadas de acordo com os procedimentos histológicos de rotina, embebidas em Paraplast plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), e cortado em espessura de 5 mm. Os cortes foram corados hematoxilina e eosina (HE) e resorcina fucsina de Weigert (com pré-oxidação com peroximonossulfato de potássio [oxona]) para visualização da parede da aorta, fibras do sistema elástico e quantificação das fibras elásticas [51, 52].

As seguintes proteínas foram identificadas através de procedimentos de imuno-histoquímica: fator de crescimento vascular e endotelial (VEGF, 1: 100, Santa Cruz Biotechnology), alfa-actina do músculo liso (α -SMA, 1: 100, Santa Cruz Biotechnology), antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA, 1: 100, Abcam), CD68 (CD68, 1:100, Abcam), CD105 (CD105, 1:100, Abcam) , CD133 (CD133, 1:100, Abcam). A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato em banho maria à 60°C. A inibição da peroxidase endógena foi feita com peróxido de hidrogênio à 10%. A reação foi amplificada com um sistema de complexo biotina-estreptavidina (K0679, Kit LSAB, Universal DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), e a imunorreatividade foi determinada após incubação com 3,3'-diaminobenzidina tetracloro (K3466, DakoCytomation Universal, Glostrup, Dinamarca). As secções foram coradas com hematoxilina para identificar os núcleos das células, e, em seguida, as lâminas foram montadas e analisadas. Os controles negativos foram obtidos através da não utilização do anticorpo primário no corte escolhido.

3.7 Morfometria

Cinco imagens digitais não consecutivas da aorta foram adquiridas (formato TIFF, cor de 36 bits) com uma câmera evolução LC e um microscópio de luz Olympus BX51. A túnica média (TM) foi definida como a região delimitada entre a lâmina elástica interna e externa, observadas nos cortes corados pelas técnicas de HE e resorcina fucsina de Weighert. Para estimar a espessura da túnica íntima e média (espessura TM), quatro medições por imagem

foram obtidas a 0 °, 90 °, 180 ° e 270 ° (Image pro plus 5.0) [31]. Uma área foi delimitada utilizando a ferramenta da AOI irregular e a área ocupada pelo branco foi quantificada utilizando uma ferramenta de imagem histograma e expressa como percentagem (Image J). Esta avaliação foi realizada apenas em grupos pós-transplante 21 dias para a observação da espessura final. A quantificação do número de núcleos de células foi realizada a partir de uma área de ensaio de 36 pontos e 11,2 cm² (Qa 1/mm²).

3.8 Microscopia eletrônica de transmissão

Fragmentos de aorta foram imediatamente fixados em glutaraldeído a 2,5% (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Alemanha) em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) e 0,25% de ácido tânico (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), e embebidas em Epon (Incorporar-812, EMS, Hatfield, PA, EUA). Cortes ultrafinos (60-70 nm) foram obtidos em zonas selecionadas usando ultramicrotomo (Leica ULTRA-CUT; Leica Aktiengesellschaft, Wien, Áustria), contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, e examinadas com microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 906 (MET) (Carl Zeiss EM 906, Oberkochen, Alemanha) a 80 kV.

3.9 Análise estatística

Os dados são apresentados como média e erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram analisadas por one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo (Graph Pad Prism ® versão 7.0, San Diego, EUA).

4 RESULTADOS

4.1. Massa Corporal e Bioquímica sanguínea

A dieta aterogênica foi bem sucedida na promoção de mudanças relacionadas a peso e modificações metabólicas em camundongos C57BL/6.

A massa corporal do grupo controle e no grupo AT ao final das 16 semanas foi de $28,43 \pm 2,65$ e $38,3 \pm 2,5$ g ($p = 0,0027$) respectivamente. No dia da morte dos animais, o grupo CO apresentou $29,6 \pm 1,0$ g de massa corporal. A massa corporal foi de $37,34 \pm 1,6$ g no grupo de AT 14 dias. A massa corporal foi de $34,4 \pm 31,1$ g no grupo AT-BMC 14 dias. A massa corporal foi de $38,3 \pm 2,5$ g no grupo de AT 21 dias. A massa corporal foi de $36,6 \pm 1,2$ g no grupo AT-BMC 21 dias (Tabela 1).

No dia da morte, os níveis de glicose no sangue foram de $105,4 \pm 9,1$ mg/dL no grupo CO. No grupo AT 14 dias foi de $200,6 \pm 6,9$ mg/dL. No grupo AT-BMC 14 dias foi de $112 \pm 7,1$ mg/dL. No grupo AT 21 dias foi $200,6 \pm 7,9$ mg/dL. No grupo de AT-BMC 21 dias foi de $167 \pm 8,2$ mg / dL (Tabela 1).

O nível de TG foi de $61,1 \pm 1,3$ mg/dL no grupo CO. No grupo AT 14 dias foi de $103,8 \pm 9,9$ mg/dL. No grupo AT-BMC 14 dias foi de $53,16 \pm 2,8$ mg/dL. No grupo AT 21 dias foi de $86,0 \pm 8,2$ mg/dL. No grupo AT-BMC 21 dias foi de $50,0 \pm 6,8$ mg/dL (Tabela 1).

O nível de CT foi de $63,6 \pm 10,6$ mg/dL no grupo CO. No grupo AT 14 dias foi de $130,4 \pm 12,4$ mg/dL. No grupo AT-BMC 14 dias foi de $90,2 \pm 11,0$ mg/dL. No grupo AT 21 dias foi $124,6 \pm 13,1$ mg/dL. No grupo AT-BMC 21 dias foi de $59,6 \pm 8,3$ mg / dL (Tabela 1).

Tabela 1: Massa corporal e bioquímica sanguínea. Dados são mostrados como média \pm erro padrão da média.

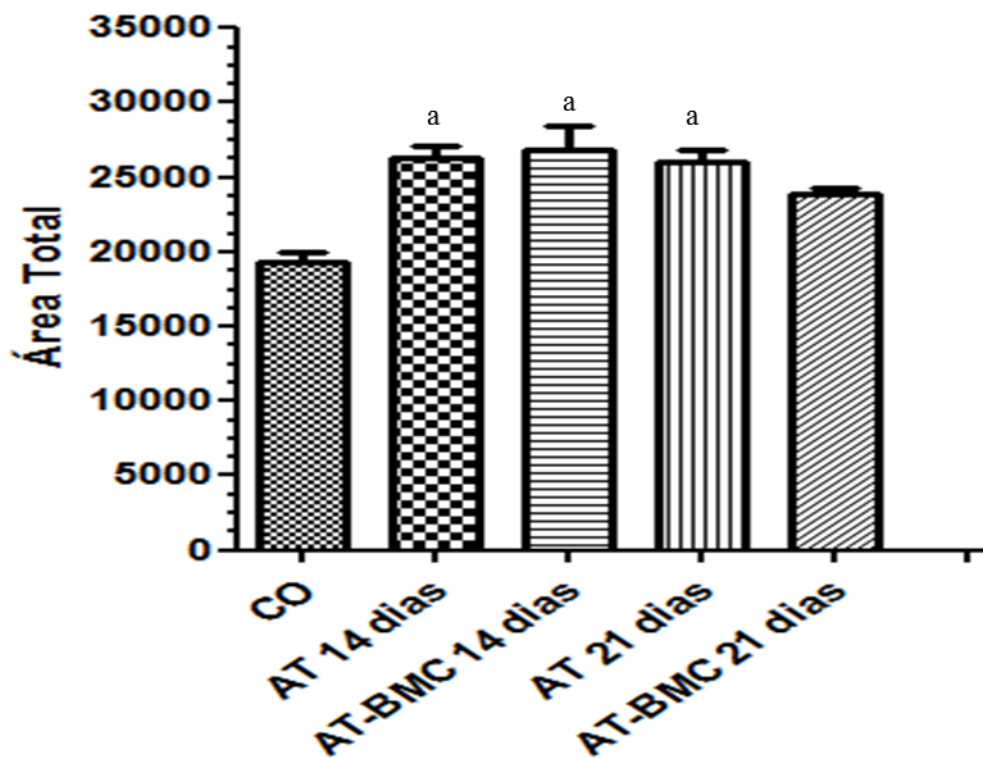
Grupos Experimentais

Parâmetros	CO	AT 14 dias	AT-BMC 14 dias	AT 21 dias	AT-BMC 21 dias
Massa corporal, g	29.6 \pm 1.0	37,34 \pm 1.6 ^a	34,4 \pm 31.1 ^a	38.3 \pm 2.5 ^a	36.6 \pm 1.2 ^a
Glicose sanguínea, mg/dL	105.4 \pm 9.1	200,6 \pm 6.9 ^a	112 \pm 7.1 ^b	200.6 \pm 7.9 ^{a, c}	167 \pm 8.2 ^a
Triglicerídeos, mg/dL	61.1 \pm 1.3	103,8 \pm 9.9 ^a	53,16 \pm 2.8 ^b	86.0 \pm 8.2 ^{a, c}	50.0 \pm 6.8 ^{b, d}
Colesterol total, mg/dL.	63.6 \pm 10.6	130.4 \pm 12.4 ^a	90.2 \pm 11.0	124.6 \pm 13.1 ^a	59.6 \pm 8.3 ^{b, d}

Legenda: Símbolos representam diferença significativa ($P < 0.05$) com: [a] vs. grupo CO; [b] vs. grupo AT 14 dias; [c] vs. grupo AT-BMC 14 dias; [d] vs. grupo AT 21 dias. Abreviaturas: CO- grupo que recebeu dieta padrão e morto na data de experimentação; AT 14 dias – camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT-BMC 14 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT 21 dias - camundongos (n=10) C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS na veia caudal e sacrificados 21 dias após; AT-BMC 21 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 21 dias após o transplante.

Não houve diferença significativa quanto à curva glicêmica nos grupos AT 14 dias, AT-BMC 14 dias e AT 21 dias e todos estes aumentados em relação ao grupo CO. O único grupo que não apresenta diferença significativa com o grupo CO é o grupo AT-BMC 21 dias ($p=0.0131$). (Gráfico 1)

Gráfico 1: Gráfico demonstrando a área relacionada à curva glicêmica dos animais ao final do experimento

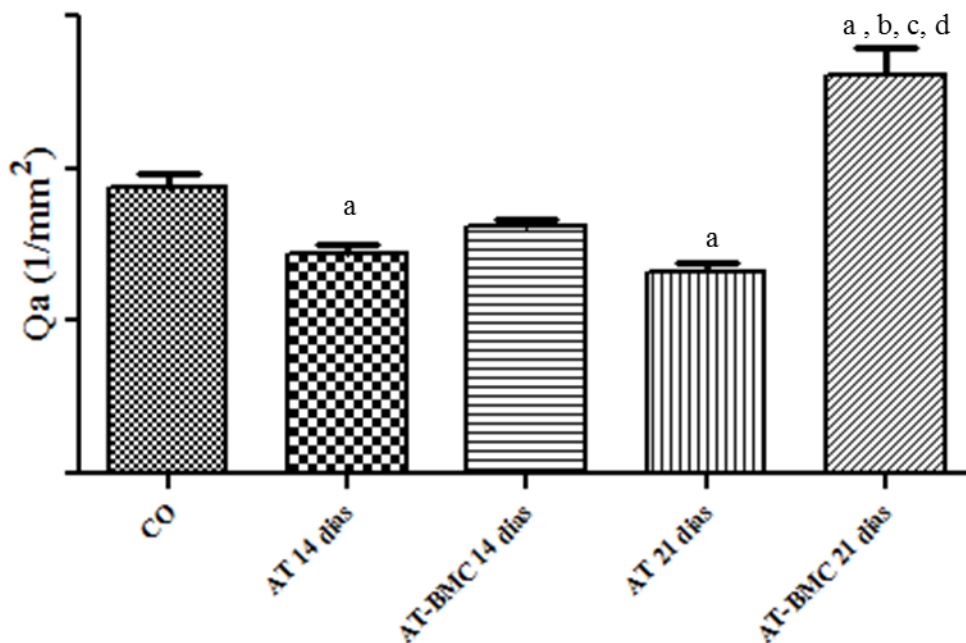


Legenda: Símbolos representam diferença significativa ($p<0.05$) com: [a] vs. grupo CO. Abreviaturas: CO- grupo que recebeu dieta padrão e morto na data de experimentação; AT 14 dias – camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 μ L de PBS na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT-BMC 14 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 μ L de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT 21 dias - camundongos ($n=10$) C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 μ L de PBS na veia caudal e sacrificados 21 dias após; AT-BMC 21 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 μ L de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 21 dias após o transplante.

4.2 Remodelamento da parede da aorta

O Qa observado no grupo CO foi de 3.751,56 1/mm². No grupo AT 14 dias foi de 2.885,96 1/mm². No AT-BMC 14 dias foi 3238,7 1/mm². No grupo AT 21 dias foi 2.636,12 1/mm². No grupo AT-BMC 21 dias foi 5232,4 1/mm² (Gráfico 2).

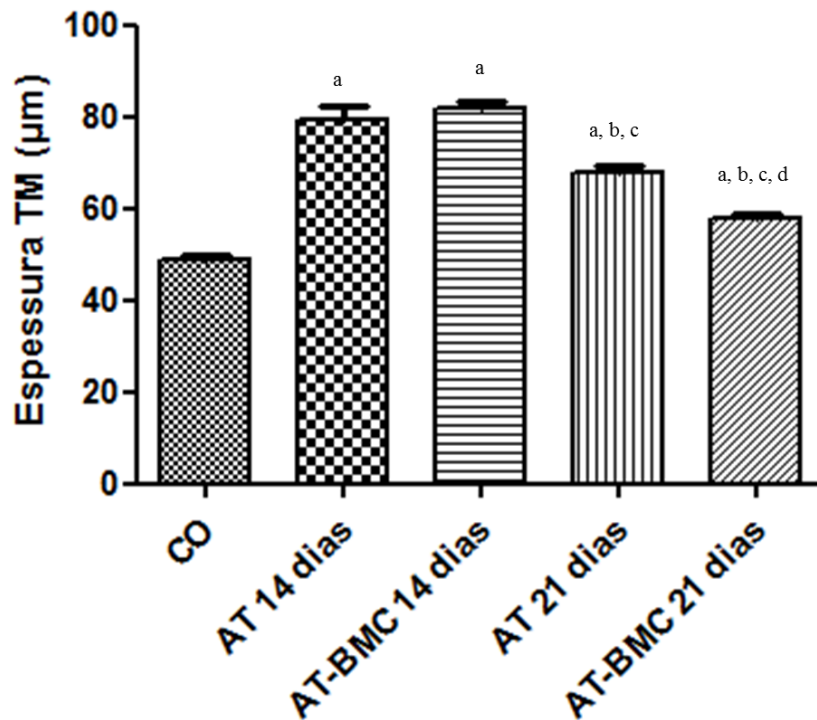
Gráfico 2: Análise quantitativa do número de núcleos de células por área analisada (Qa 1/mm²)



Legenda: Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Símbolos representam diferença estatística ($p < 0,05$) com: [a] vs. CO grupo; [b] vs. grupo AT 14 dias; [c] vs. grupo AT-BMC 14 dias; [d] vs. Grupo AT 21 dias. Abreviaturas: CO- grupo que recebeu dieta padrão e morto na data de experimentação; AT 14 dias – camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT-BMC 14 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT 21 dias - camundongos (n=10) C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS na veia caudal e sacrificados 21 dias após; AT-BMC 21 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 21 dias após o transplante.

A espessura média TM foi $48,99 \pm 2,1$ μm no grupo CO. No grupo AT 14 dias foi de $79,19 \pm 5,9$ μm . No grupo AT-BMC 14 dias foi de $82,04 \pm 2,8$ μm . No grupo AT 21 dias foi $67,92 \pm 3,1$ μm . No grupo AT-BMC 21 dias foi $57,75 \pm 2,2$ μm .

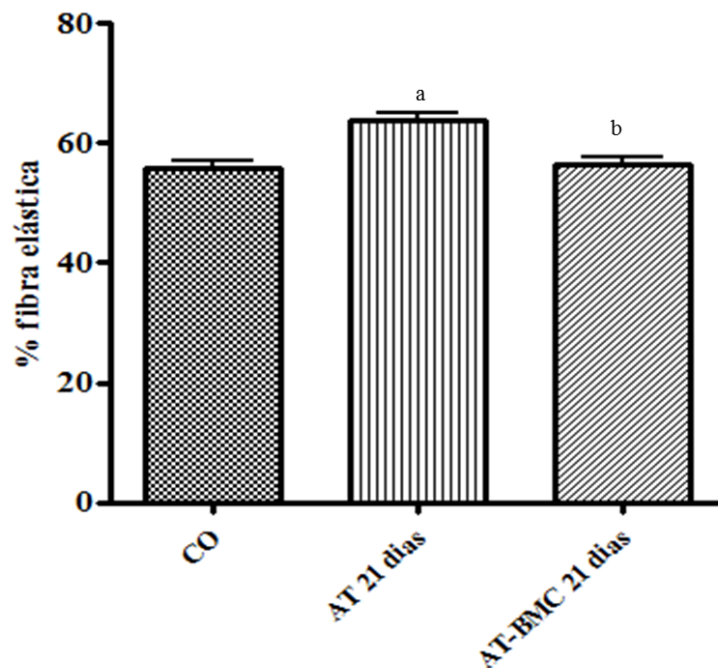
Gráfico 3: Análise quantitativa da espessura da parede da aorta medida em micrometros.



Legenda: Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Símbolos representam diferença estatística ($p < 0,05$) com: [a] vs. grupo CO; [b] vs. grupo AT 14 dias; [c] vs. grupo AT-BMC 14 dias; [d] vs. Grupo AT 21 dias. Abreviaturas: TM – espessura da túnica íntima-média; CO- grupo que recebeu dieta padrão e morto na data de experimentação; AT 14 dias – camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 μL de PBS na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT-BMC 14 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 μL de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT 21 dias - camundongos (n=10) C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 μL de PBS na veia caudal e sacrificados 21 dias após; AT-BMC 21 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 μL de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 21 dias após o transplante.

A média da percentagem de fibras elásticas foi de 55,75% no grupo CO. No grupo AT 21 dias foi 63,86%. No grupo AT-BMC 21 dias foi 56,36% (Gráfico 4). Não houve diferença no número de lamelas elásticas entre todos os grupos de estudo em qualquer momento durante o estudo.

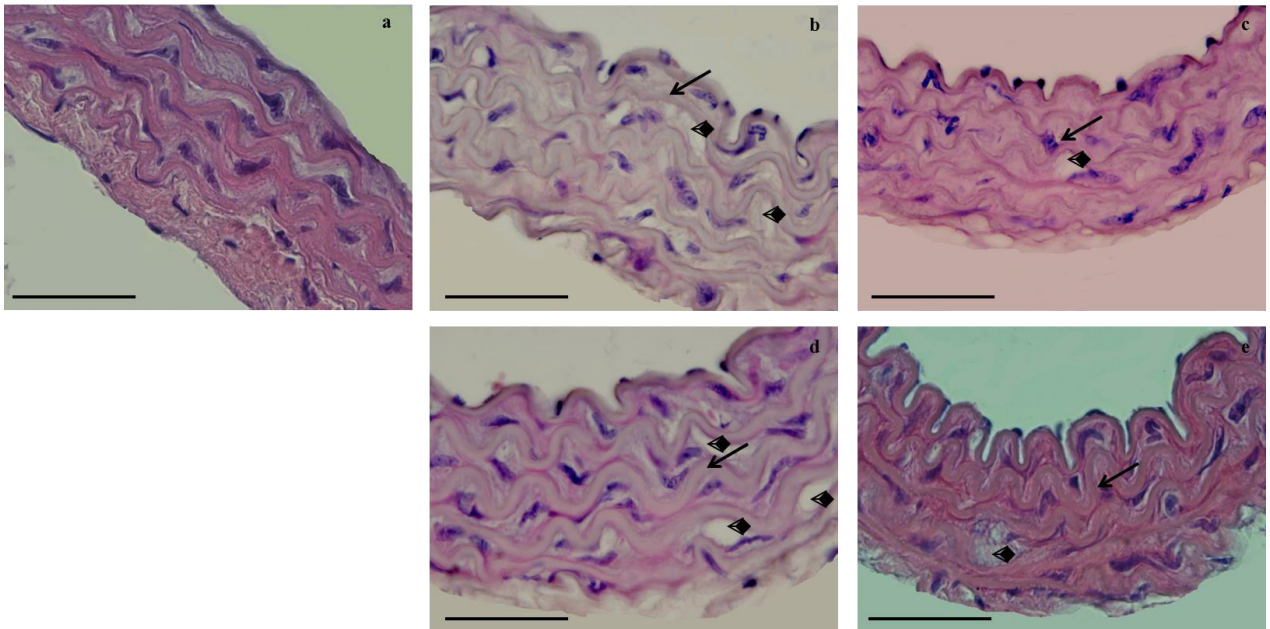
Gráfico 4: Análise quantitativa da percentagem de fibras elástica da parede da aorta



Legenda: Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Símbolos representam diferença estatística ($p < 0,05$) com: [a] vs. grupo CO; [b] vs. grupo AT 21 dias; [c] vs. grupo AT-BMC 21 dias. Abreviaturas: CO- grupo que recebeu dieta padrão e morto na data de experimentação; AT 14 dias – camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT-BMC 14 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT 21 dias - camundongos (n=10) C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS na veia caudal e sacrificados 21 dias após; AT-BMC 21 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 21 dias após o transplante.

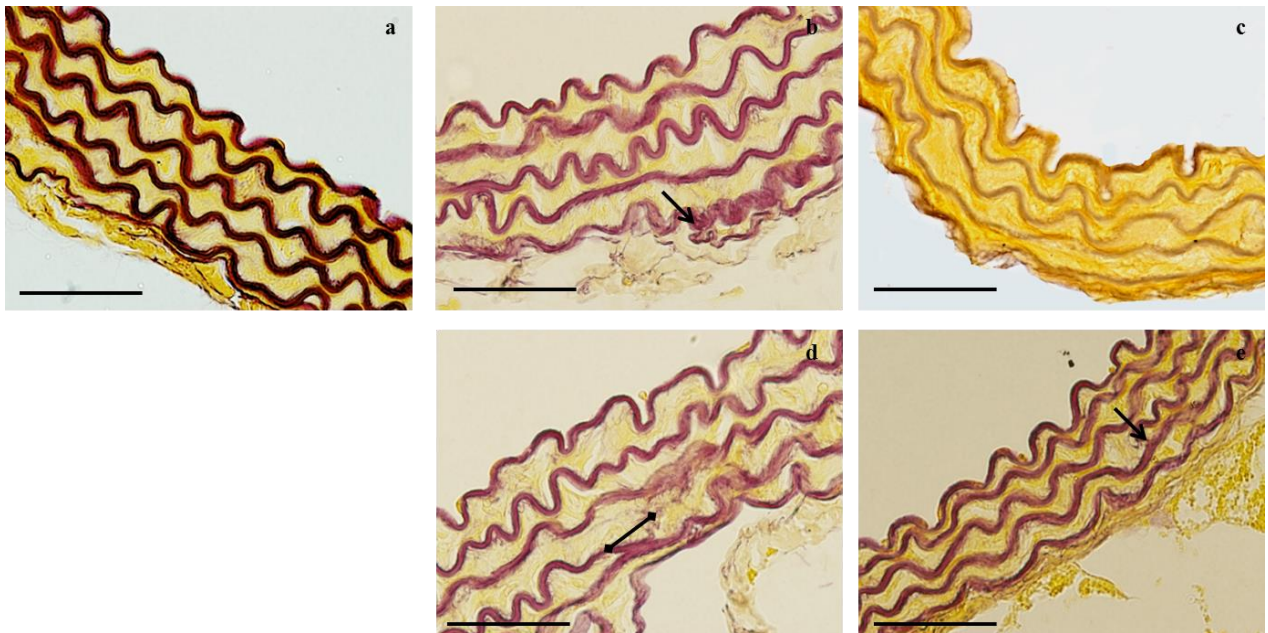
A análise da microscopia ótica das aortas demonstra o adelgaçamento das lamelas elásticas nos grupos AT 14 dias e AT 21 dias. Vacúolos são observados nos grupos AT 14 dias, AT 21 dias, AT-BMC 14 dias, AT-BMC 21 dias. Estes vacúolos parecem qualitativamente menores nos grupos transplantados. Projeções da lamina elástica interna são observados nos grupos AT 14 dias, AT 21 dias e AT-BMC 21 dias. Delaminações são visualizadas nos grupos AT 14 dias e AT 21 dias. Observa-se também qualitativamente o aumento da espessura da parede da aorta nos grupos AT 14 dias e AT 21 dias. Projeções de fibras elásticas são observadas no grupo AT 21 dias. (Figuras 15 e 16).

Figura 15: Fotomicrografias coradas com hematoxilina e eosina.



Legenda: Setas indicam o adelgaçamento das lamelas elásticas. Cabeças de setas indicam a presença de vacúolos na túnica média. [a] grupo CO; [b] grupo AT 14 dias; [c] grupo AT-BMC 14 dias; [d] grupo AT 21 dias; [e] grupo AT-BMC 21 dias. Barra = 50 μ m. Abreviaturas: CO- grupo que recebeu dieta padrão e morto na data de experimentação; AT 14 dias – camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT-BMC 14 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT 21 dias - camundongos (n=10) C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS na veia caudal e sacrificados 21 dias após; AT-BMC 21 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 21 dias após o transplante.

Figura 16: Fotomicrografias coradas pela técnica de resorcina fucsina de Weigert precedida de oxidação com oxona, mostrando as fibras do sistema elástico.

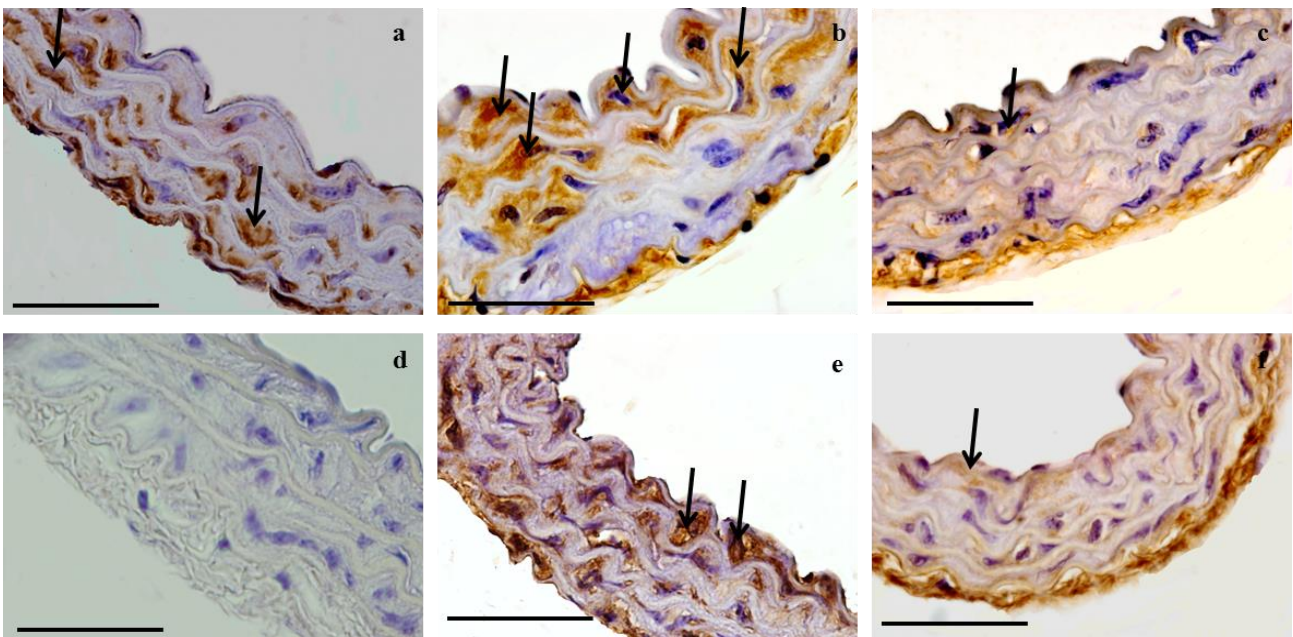


Legenda: Setas indicam a delaminação de lâminas elásticas. Setas em losango indicam a projeção destas fibras. Grupo: CO (a); grupo AT 14 dias (b); grupo AT-BMC 14 dias (c); grupo AT 21 dias (d); grupo AT-BMC 21 dias (e). Abreviaturas: CO- grupo que recebeu dieta padrão e morto na data de experimentação; AT 14 dias – camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 µL de PBS na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT-BMC 14 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 µL de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT 21 dias - camundongos (n=10) C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 µL de PBS na veia caudal e sacrificados 21 dias após; AT-BMC 21 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 µL de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 21 dias após o transplante. barra = 50 µm.

4.3 Avaliação imunohistoquímica:

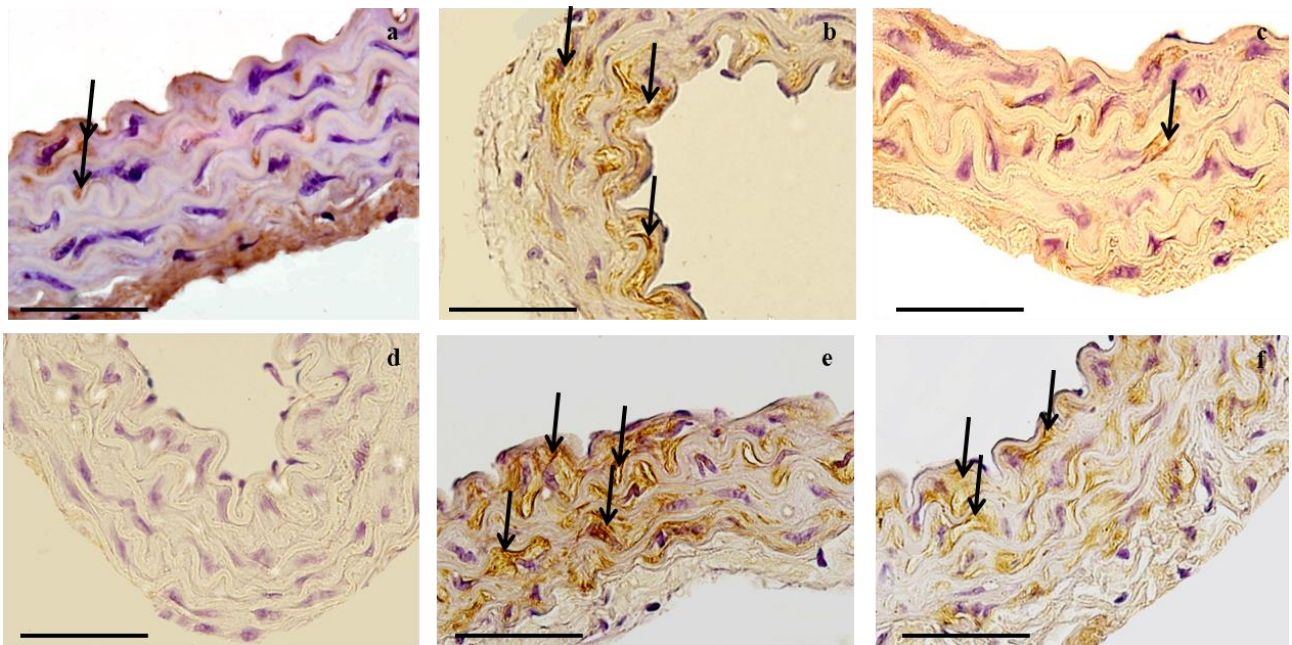
A imunohistoquímica contra VEGF e contra α -SMA revelou-se visivelmente presente nas tûnicas íntimas e médias das aortas. Os grupos AT-BMC 14 dias e AT-BMC 21 dias mostraram semelhança qualitativa na marcação. Quando comparadas as marcações destes dois grupos com os grupos AT 14 dias e AT 21 dias, observou-se menor marcação nos grupos transplantados. (Figuras 17 e 18).

Figura 17: Fotomicrografias da aorta torácica marcadas contra VEGF.



Legenda: O controle negativo de reação imunohistoquímica é mostrado em (d). Grupos: CO (a); AT 14 dias grupo (b); AT-BMC grupo 14 dias (c); AT 21 dias (e); AT-BMC 21 dias (f). Todas as imagens estão na mesma escala (bar = 50 μ m). As setas indicam as marcações. Abreviaturas: CO- grupo que recebeu dieta padrão e morto na data de experimentação; AT 14 dias – camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 μ L de PBS na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT-BMC 14 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 μ L de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT 21 dias - camundongos (n=10) C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 μ L de PBS na veia caudal e sacrificados 21 dias após; AT-BMC 21 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 μ L de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 21 dias após o transplante. barra = 50 μ m.

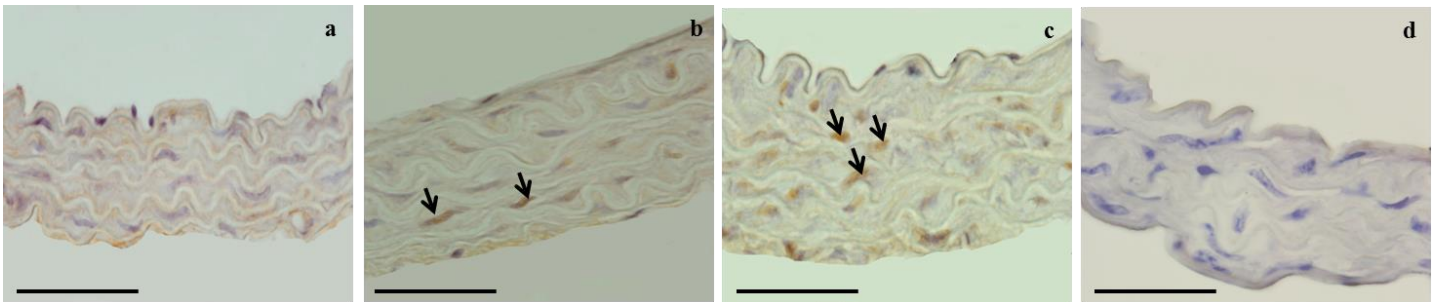
Figura 18: Fotomicrografias da aorta torácica marcada contra α -SMA.



Legenda: O controle negativo de reacção imunohistoquímica é mostrado em (d). Grupos: CO (a); AT 14 dias (b); AT-BMC 14 dias (c); AT 21 dias (e); AT-BMC 21 dias (f). As setas indicam as marcações. Abreviaturas: CO- grupo que recebeu dieta padrão e morto na data de experimentação; AT 14 dias – camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT-BMC 14 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT 21 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS na veia caudal e sacrificados 21 dias após; AT-BMC 21 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16^a semana, receberam 150 μ L de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 21 dias após o transplante. barra = 50 μ m.

A marcação anti PCNA mostrou-se qualitativamente aumentada nos núcleos do grupo AT-BMC 21 dias quando comparado aos grupos CO e AT 21 dias (Figura 19).

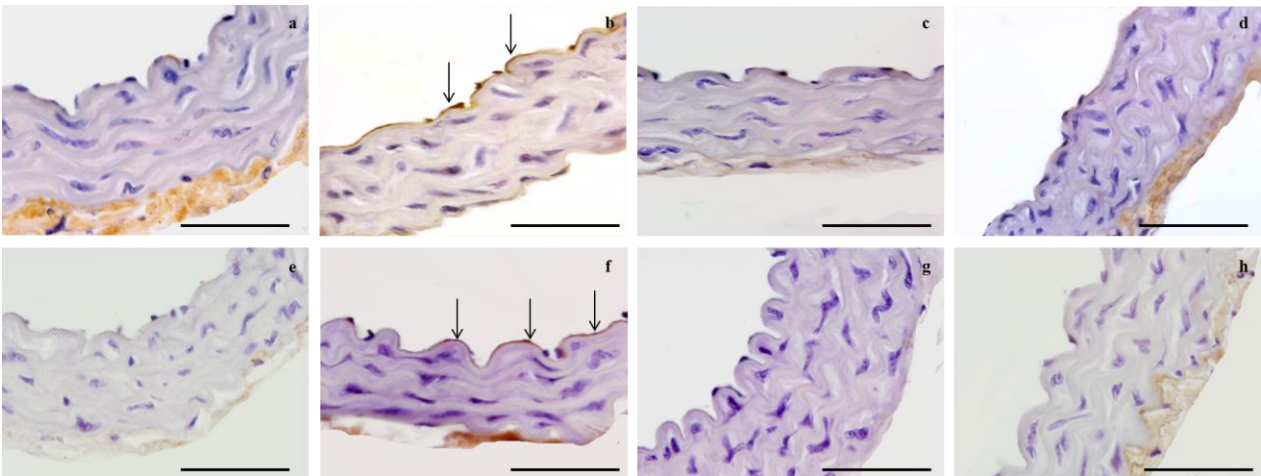
Figura 19: Fotomicrografias da aorta torácica marcadas contra PCNA.



Legenda: O controle negativo de reação imuno-histoquímica é mostrado em (d). Grupos: CO (a); AT 21 dias grupo (b); AT-BMC 21 dias (c). As setas indicam as marcações. Abreviaturas: CO- grupo que recebeu dieta padrão e morto na data de experimentação. AT 21 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 μ L de PBS na veia caudal e sacrificados 21 dias após; AT-BMC 21 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 μ L de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 21 dias após o transplante. barra = 50 μ m.

A imunohistoquímica contra CD105 mostra marcação na célula endotelial do grupo AT 14 dias. Esta marcação não é observada no grupo AT-BMC 14 dias. A marcação de CD133 foi observada no grupo AT 14 dias. Não houve marcação de CD133 para o grupo AT-BMC 14 dias (Figura 20).

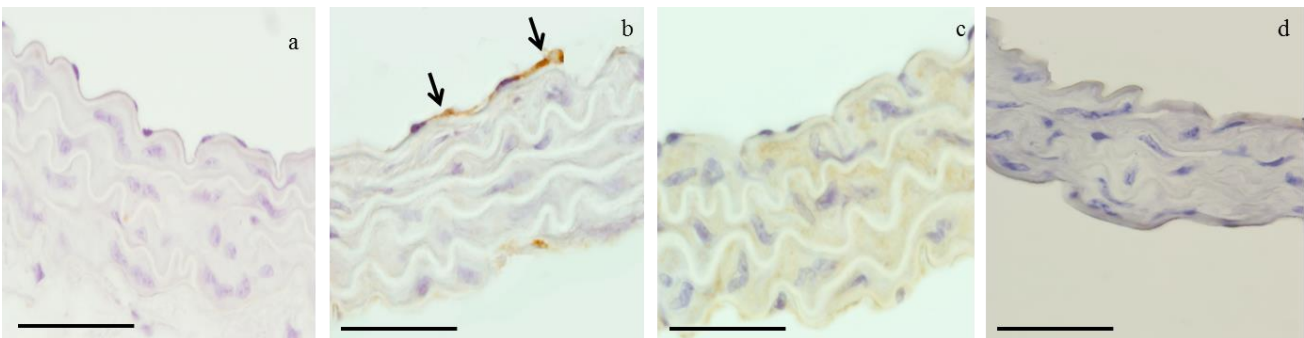
Figura 20: Fotomicrografias da aorta torácica marcadas contra CD105 (a,b,c) e CD133 (e,f,g) nos grupos sacrificados na experimentação de 14 dias.



Legenda: O controlo negativo de reação imuno-histoquímica é mostrado em (d, h). Grupos: CO (a, e); AT 14 dias grupo (b, f); AT-BMC14 dias (c, g). As setas indicam as marcações. Abreviaturas: CO- grupo que recebeu dieta padrão e morto na data de experimentação; AT 14 dias – camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 µL de PBS na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT-BMC 14 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 µL de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 14 dias após. barra = 50 µm.

Observa-se marcação para CD68 no grupo AT 21 dias. Esta marcação não é observada nos grupos CO e AT-BMC 21 dias (Figura 21).

Figura 21: Fotomicrografias da aorta torácica marcadas para anti CD68 nos grupos sacrificados na experimentação de 21 dias.

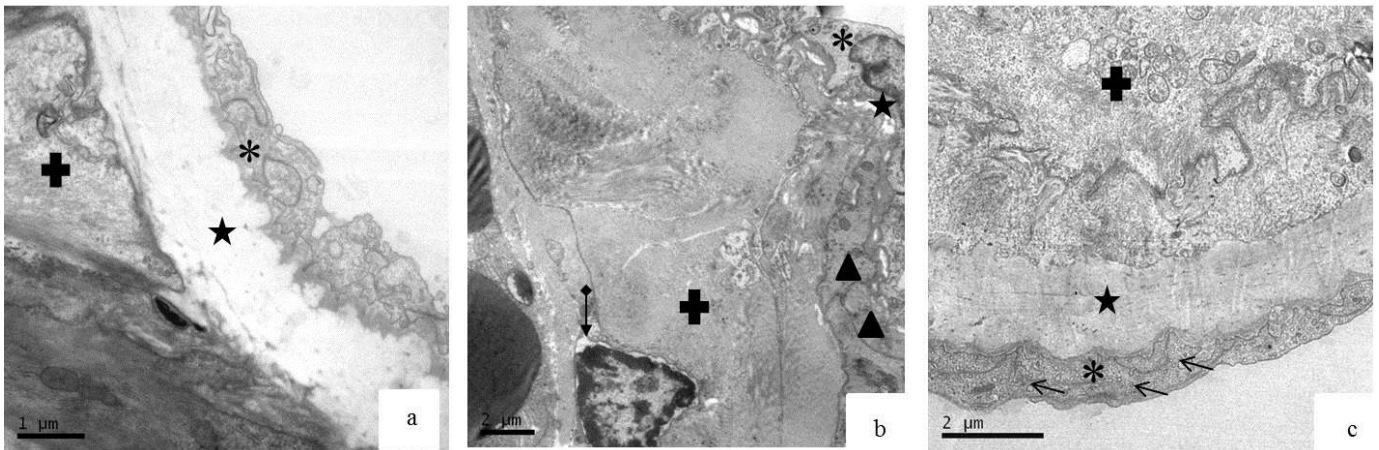


Legenda: O controle negativo de reação imuno-histoquímica é mostrado em (d). Grupos: CO (a); AT 21 dias (b); AT-BMC 21 dias (c). As setas indicam as marcações. Abreviaturas: CO- grupo que recebeu dieta padrão e morto na data de experimentação. AT 21 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 µL de PBS na veia caudal e sacrificados 21 dias após; AT-BMC 21 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 µL de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 21 dias após o transplante. barra = 50 µm.

4.4 Microscopia eletrônica de transmissão

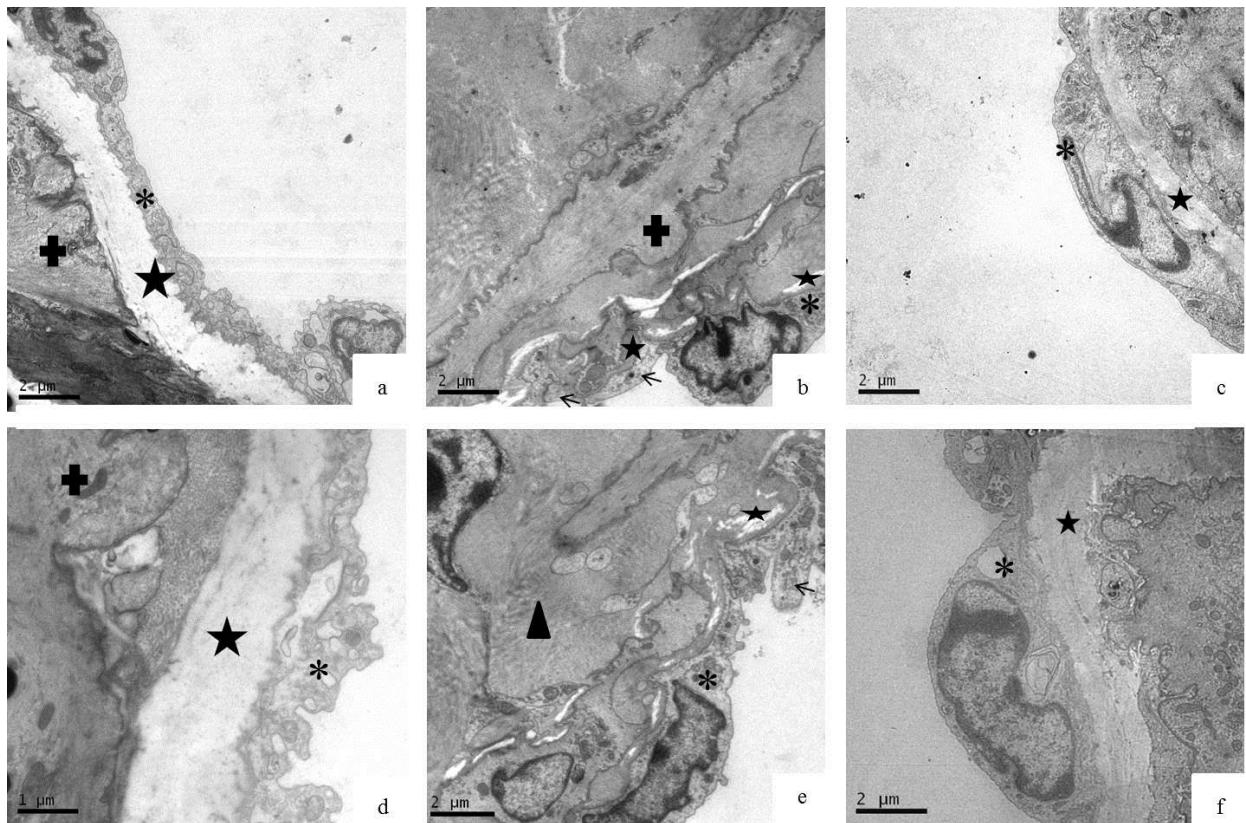
Eletromicrografias demonstram no grupo CO um endotélio íntegro de contorno regular abaixo do qual se observa a lâmina elástica interna contínua e de contornos regulares. Logo inferior a esta se observa parte do citoplasma de célula muscular lisa. No grupo AT 14 dias observa-se endotélio fino, célula endotelial com núcleo, citoplasma perinuclear proeminente e projeções citoplasmáticas. Além disso, lamina elástica interna de contorno irregular, interrompida, célula muscular lisa projetada, com vacúolos citoplasmáticos e proeminente cisterna perinuclear. No grupo AT-BMC 14 dias observa-se célula endotelial de contorno regular e apresentando numerosas vesículas de pinocitose. Além disso, a lâmina elástica interna apresenta-se contínua e de contorno regular. No grupo AT 21 dias, observa-se as mesmas modificações apresentadas no grupo AT 14 dias juntamente com projeção da célula muscular lisa em direção ao lúmen vascular. No grupo AT-BMC 21 dias, observa-se a célula endotelial com seu contorno regular preservado juntamente com a lâmina elástica interna contínua e de seu contorno regular (Figura 22 e 23).

Figura 22: Eletromicrografias de aorta contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo



Legenda: (*) célula endotelial; (★) lâmina elástica interna; (+) citoplasma de célula muscular lisa; (↔) vesículas de pinocitose; (▲) projeção da célula muscular lisa. (→) espaço perinuclear. Grupos: CO (a); AT 14 dias (b); AT-BMC 14 dias (c). Abreviaturas: CO- grupo que recebeu dieta padrão e morto na data de experimentação; AT 14 dias – camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 µL de PBS na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT-BMC 14 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 µL de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 14 dias após.

Figura 23: Eletromicrografias de aortas contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo



Legenda: (*) célula endotelial; (★) lamina elástica interna; (▲) projeção citoplasmática da célula endotelial; (■) citoplasma da célula muscular lisa; (▲) projeção de célula muscular lisa. Grupos: CO (a, d); AT 14 dias (b); AT-BMC 14 dias (c); AT 21 dias (e); AT-BMC 21 dias (f). Abreviaturas: CO- grupo que recebeu dieta padrão e morto na data de experimentação; AT 14 dias – camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 μL de PBS na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT-BMC 14 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 μL de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 14 dias após; AT 21 dias - camundongos (n=10) C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 μL de PBS na veia caudal e sacrificados 21 dias após; AT-BMC 21 dias - camundongos C57BL/6 alimentados com dieta modificada aterogênica durante 16 semanas. Ao final da 16ª semana, receberam 150 μL de PBS contendo BMC na veia caudal e sacrificados 21 dias após o transplante.

5 DISCUSSÃO

Os dados relativos ao efeito da BMCs na fisiopatologia de diversas doenças, incluindo a aterosclerose, ainda são inconclusivos. Nós demonstramos os efeitos benéficos do transplante de BMCs sobre o metabolismo lipídico e o remodelamento da parede da aorta em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta aterogênica. Mostra-se importante explicar que a maior parte dos efeitos provocados por transplante de células de medula óssea não diz respeito em si à diferenciação destas células em células de tecidos semelhantes, mas sim no efeito parácrino que estas células são capazes de gerar no organismo transplantado. A terapia com células progenitoras endoteliais é uma opção terapêutica emergente para promover a angiogênese ou reparo endotelial. Embora a liberação de fatores parácrinos angiogênicos seja conhecida por contribuir para o seu efeito terapêutico, pouco se sabe a respeito da liberação de fatores pró-inflamatórios e expressão de moléculas de adesão pró-inflamatórias [53].

O transplante de BMCs reduziu com sucesso a glicemia, triglicerídeos, colesterol total e a espessura da parede da aorta em animais previamente alimentados com a dieta aterogênica. A glicose sanguínea revelou uma redução em seus níveis séricos em animais submetidos ao transplante das BMCs em comparação com grupos que não receberam essas células. Esta redução foi de 43% no grupo AT-BMC 14 dias em comparação com o grupo AT 14 dias e, 16% no grupo AT-BMC 21 dias quando comparado ao grupo AT 21 dias. A redução da glicose é mais eficaz nas primeiras semanas após a injeção de células (observado a partir do grupo AT-BMC14 dias) e não apresenta diferença significativa relativamente ao grupo CO. Isso não é observado no grupo AT-BMC 21 dias quando comparado ao grupo CO. Os níveis de glicose no grupo AT-BMC 14 dias foi semelhante em comparação com o grupo CO, embora o grupo AT-BMC 21 dias não apresentou tal semelhança. A explicação para esse resultado é que, durante todo o experimento, os animais continuaram recebendo dieta aterogênica e o efeito quimiotático das células transplantadas não seriam suficientes por um longo período após a injeção a ponto de modificar mecanismos que estariam relacionados aos níveis de glicose sanguínea. Dados recentes mostraram que o diabetes aumenta o número de células musculares lisas derivadas de células de medula óssea e a diferenciação de células mononucleares em células musculares lisas, o que pode contribuir para a formação acelerada da placa aterosclerótica em camundongos apoE (-/-) [54]. Outra explicação para esta observação é que mesmo após o transplante com células de medula óssea, o estímulo para o desenvolvimento de placas ateroscleróticas foi mantido, talvez devido ao diabetes, porque os

níveis de glicose mantiveram-se elevados no nosso estudo. Além disso, a hiperglicemia promove a mielopoiese e prejudica a resolução de aterosclerose [55]. Estes dados corroboram com os resultados que, mesmo com uma redução da glicemia nos grupos AT-BMC 14 dias e AT-BMC 21 dias, o aumento da área da curva glicêmica de todos os grupos que receberam a dieta aterogênica, com exceção do grupo AT-BMC 21 dias, são considerados resistentes à insulina. Uma explicação para isso seria que o tempo de 14 dias após o transplante juntamente com a manutenção da dieta, os efeitos benéficos do transplante de BMCs em relação à glicemia, não seriam ainda suficientes por este período e necessitaria de maior tempo para que ocorresse.

A avaliação inicial dos triglicerídeos e colesterol total foi necessária para demonstrar a homogeneidade e homocedasticidade da amostra, ao início do experimento e após as 16 semanas, para a divisão dos grupos que receberam dieta aterogênica. O TC aumentou em 104% no grupo AT 14 dias e 96% no grupo AT 21 dias quando comparado com CO. A TG aumentou 69% no grupo AT 14 dias e 40% no grupo AT 21 dias quando comparado ao grupo CO. Não foi observada diferença significativa nestes dois parâmetros nos grupos que receberam o transplante de BMCs (AT-BMC 14 dias e AT-BMC 21 dias) em relação ao grupo CO. A melhora desses parâmetros se deve, provavelmente, a conservação da função endotelial da aorta ocasionada pelo transplante com BMCs. Como este endotélio estaria mais conservado, o transporte reverso de colesterol estaria preservado e moléculas de LDL oxidadas dificilmente seriam retidas na parede da aorta, retornando ao vaso, por este transporte e se direcionando para o fígado e liberados. Esta seria a explicação para os níveis reduzidos de colesterol total e, conseqüentemente, por mecanismos interligados, a redução de triglicerídeos [56]. Os recentes avanços na compreensão de como as células de medula óssea respondem à lesão endotelial agora sugerem que as populações múltiplas destas células, incluindo tanto as células progenitoras endoteliais e um novo grupo de células chamadas células iniciais de crescimento (outgrowth cells), promovem a reparação e regeneração endotelial por meio de diferentes mecanismos, porém, estes seriam complementares. Além disso, certos subconjuntos de células derivadas de medula óssea também parecem ter potentes propriedades de proteção tecidual independente da angiogênese [57]. A chave para a redução desses níveis seria a maior integridade do endotélio, como já observado em estudos anteriores, onde as células da medula óssea seriam capazes de promover a reparação e regeneração endotelial [56]. Este seria extremamente importante já que o transporte reverso do colesterol e a remoção de LDL oxidada da parede do vaso requerem integridade da parede endotelial.

O camundongo C57BL/6 é uma linhagem útil para o estudo de doenças crônicas como obesidade, hipertensão arterial, resistência à insulina e dislipidemia quando ácidos graxos saturados são adicionados à dieta [58,59]. Quando uma dieta rica em gordura é ainda enriquecida com ácido cólico e colesterol, torna-se um modelo útil de aterosclerose [11]. O ácido cólico é um ácido biliar que, em conjunto com a ApoE, está envolvida no transporte reverso de colesterol. Este transporte remove o colesterol dos tecidos periféricos para o fígado. A ApoE é produzida principalmente no fígado, mas também pode ser sintetizada por outras células tais como macrófagos. Nosso objetivo foi avaliar o papel da BMCs na prevenção, ao invés de tratamento de uma lesão aterosclerótica já estabelecida. A dieta aterogênica altera com sucesso o metabolismo lipídico, como já foi demonstrado por outros pesquisadores usando dietas ricas em gordura [58, 59, 60]. É ainda controversa, no entanto, se a terapia de células progenitoras iria melhorar estas alterações metabólicas bem como inibir a progressão da aterosclerose [15]. O presente estudo sugere que a BMCs pode influenciar positivamente o metabolismo lipídico após o transplante. A redução do colesterol total pode ser associada com um aumento da produção de ApoE e, portanto, o aumento do transporte reverso do colesterol. Além disso, a redução do colesterol total pode ter ajudado a normalizar níveis séricos de triglicédeos.

Uma redução significativa do Qa no grupo AT 14 dias e AT 21 dias foi mostrada quando comparado ao grupo CO. Contrariamente a estes grupos, o grupo AT-BMC 14 dias mostrou a mesmo número de células, igualmente ao grupo CO. O grupo AT-BMC 21 dias mostrou o Qa excessivamente elevado (+ 39%). Estes núcleos celulares aumentaram quanto mais tempo decorrido o transplante de células. Evidências demonstraram que a desregulação da apoptose, a morte celular programada, de células endoteliais estaria envolvido na fisiopatologia da aterosclerose [61]. Isto explica a diminuição do Qa nos grupos que receberam a dieta aterogênica. Foi observado o aumento do Qa no grupo AT-BMC 21 dias em relação a todos os grupos e confirmado este aumento pela técnica de imunohistoquímica para PCNA. O PCNA é uma proteína auxiliar da DNA-polimerase e está envolvido no controle da replicação de DNA na célula eucarionte, aumentando a capacidade de processamento da polimerase durante o alongamento da fita. Demonstrou-se marcação para PCNA em monócitos de sangue periférico que se diferenciaram e estavam presentes na lesão aterosclerótica [62]. A imunohistoquímica para PCNA sugere que a proliferação de células da parede arterial no grupo AT-BMC 21 dias foi, provavelmente, devido a um efeito parácrino das células derivadas da medula óssea após serem transplantadas e não devido à

presença de células inflamatórias, tais como macrófagos. Estes resultados devem ser mais elucidados em estudos futuros.

A dieta aterogênica induziu um remodelamento adverso na parede da aorta. As aortas torácicas do grupo AT 21 dias foram apresentaram-se mais espessas (35%), juntamente com um maior teor de fibra elástica (14%) em comparação com o grupo CO. A túnica média do grupo AT-BMC 21 dias foi 12% mais fina, e a porcentagem de fibras elásticas da camada média diminuiu 13% em comparação com o grupo AT 21 dias. O remodelamento da parede aórtica ocorre devido a estímulos fisiológicos ou patológicos, tais como hipertensão e aterosclerose [31, 63]. Neste estudo, como esperado, verificou-se o aumento da espessura da parede da aorta e de fibras do sistema elástico no grupo de 21 dias em devido a estímulo aterosclerótico no interior da parede da aorta. O fato de que o remodelamento adverso não ocorre na aorta do grupo transplantado sugeriu que não haveria um estímulo nocivo maior que um benéfico, uma vez que os níveis reduzidos na circulação de colesterol total e triglicéridos foram observados. Isto foi elucidado pelo resultado de redução da espessura da parede da aorta no grupo AT-BMC 21 dias. Estes dados corroboram com achados de trabalhos deste grupo já publicados [56].

A α -SMA é um importante marcador de desenvolvimento da placa fibrosa na aterosclerose. Fibrócitos derivados da medula óssea podem adquirir características de músculo liso, incluindo expressão de α -SMA [64]. Evidências crescentes indicam que as forças mecânicas, citocinas e outros fatores influenciam a diferenciação de células tronco em células de músculo liso e células endoteliais [47]. No entanto, o mecanismo exato pelo qual estas células melhoram a doença, bem como a fase em que este benefício iria ocorrer é ainda mal compreendido. Marcação positiva para α -SMA foi obtida em trabalhos anteriores que relataram o seu papel na formação de placas fibrosas na aterosclerose. Recentemente, a transição da célula endotelial em células mesenquimais, um tipo recentemente reconhecido como transdiferenciação, revelou que as células endoteliais perdem os seus marcadores específicos e adquirem um fenótipo mesenquimal ou miofibroblástica, tais como o fenótipo α -SMA, na fibrose patológica em doenças multissistêmicas [64].

Nosso trabalho mostrou uma redução qualitativa na marcação de α -SMA no grupo AT-BMC 14 dias e AT-BMC 21 dias em relação aos grupos AT 14 dias e AT 21 dias, possivelmente devido à menor exposição da parede da aorta ao colesterol e os triglicérides. Uma vez que esta exposição é essencial para o desenvolvimento de aterosclerose, o transplante de BMCs iria atrasar (ou mesmo impedir) o desenvolvimento de placas ateroscleróticas, resultando na redução de fibrose e transdiferenciação de células endoteliais.

Uma redução na lesão endotelial pode conduzir a uma melhor organização morfológica nos grupos transplantados com BMCs. Existem alguns relatos que apoiam a hipótese de que células musculares lisas e células progenitoras endoteliais podem agir com ambiguidade na patogênese da aterosclerose [15]. As células de músculo liso, que formam a neoíntima, seriam derivadas de células progenitoras dentro da parede do vaso e da circulação sanguínea [65]. A injeção de células progenitoras de células musculares lisas poderia possuir um efeito benéfico por reduzir a progressão de placas ateroscleróticas em camundongos [66]. A disfunção endotelial estimula a proliferação e migração de células musculares lisas e aumenta a síntese de componentes da matriz extracelular, o que explica a característica de espessamento da túnica íntima e média e, assim, da parede da aorta. Estas células musculares lisas podem ser recrutadas a partir de precursores que circulam ou podem derivar da camada média adjacente [67]. Estes dados suportam os nossos resultados, que mostraram o aumento na imunomarcagem para α -SMA e o aumento da espessura da parede da aorta no grupo AT 21 dias. O transplante de BMCs reduziu a imunomarcagem para α -SMA nos grupos AT-BMC 14 dias e AT-BMC 21 dias, bem como a espessura da parede da aorta no grupo AT-BMC 21 dias.

O VEGF é um membro das superfamílias dos fatores de crescimento, e possui dois principais receptores nos vasos sanguíneos: VEGFR-1 e VEGFR-2. Em condições fisiológicas, o VEGF induz a formação de novos vasos em diversos processos, tal como na cicatrização de tecidos. Estudos anteriores têm demonstrado que o VEGF aumenta a hipertensão pulmonar [68] e que o VEGF está presente em lesões ateroscleróticas na lesão de artéria coronária [69]. A técnica de cardiomioplastia celular tem se mostrado eficaz em pacientes com infarto transmural [70] após aspiração de células mononucleares de medula óssea a partir da crista ilíaca de 10 pacientes quando injetados na zona do infarto. Esta abordagem resultou em benefício significativo para os doentes, em termos de uma redução de defeito de perfusão [71]. Como nos estudos citados, era esperado o aumento da expressão de VEGF no grupo de AT 14 dias e AT 21 dias. Quanto à qualitativa redução da marcação do VEGF no grupo AT-BMC 14 dias e AT-BMC 21 dias, sugere-se que as aortas desses animais foram menos danificadas e, portanto, necessitam de menos VEGF.

O CD105 (Endoglina, receptor de TGF- β III) é uma glicoproteína transmembrana homodimérica que desempenha um papel regulador na sinalização de TGF- β . O CD105 está presente em todas as células endoteliais. O seu papel funcional no contexto da aterosclerose ainda está sendo pesquisado aqui. A expressão de CD105 foi demonstrada em vasos ateroscleróticos predominantemente em células endoteliais e células musculares lisas em vários tipos de vasos sanguíneos em ratos e seres humanos, o que sugere a sua participação na

aterogênese. Sua expressão demonstrou-se também relacionado com a expressão de eNOS no endotélio, reparo da parede do vaso, neoangiogênese da placa, a produção de colagênio e de estabilização das lesões ateroscleróticas. Além disso, níveis aumentados de endoglina solúvel foram associados à hipercolesterolemia, aterosclerose, infarto agudo do miocárdio e, principalmente, relacionados com a inibição da sinalização de TGF- β na parede do vaso [72, 73]. Nossos resultados demonstram marcação no endotélio do grupo AT-14 dias e a ausência desta no grupo CO e AT-BMC 14 dias. Esta marcação era esperada neste grupo, uma vez que na doença aterosclerótica se observa esta marcação, já que a endoglina participa do processo aterogênico. No grupo transplantado, não houve marcação. Uma explicação para este achado seria a preservação do endotélio criada pelo transplante com células de medula óssea, o que reduziria as modificações ocorridas sobre as células endoteliais.

O CD133 (ou prominina-1) foi a primeira de uma nova classe de proteínas de membrana a ser identificada em humanos e camundongos, e originalmente classificada como um marcador de hematopoiese primitiva e de células-tronco neurais. Estudos confirmaram a utilidade de CD133 como um marcador de células tronco hematopoiéticas para transplantes alogênicos realizados em humanos. Além disso, CD133 representa um marcador de células tumorais em que inicia um número de tumores neoplásicos de humanos, e, portanto, pode ser possível desenvolver terapias futuras como um marcador contra células cancerígenas [74]. Seguindo transmigração destas células precursoras hematopoiéticas, um subconjunto destas células progenitoras pode amadurecer em mastócitos no espaço subendotelial e desempenham um papel na propagação do processo inflamatório na aterosclerose [75]. Nossos estudos demonstram marcação de CD133 sobre a região endotelial da artéria aorta em grupos AT-14 dias. A ausência da marcação foi observada no grupo CO e no grupo AT-BMC 14 dias. Nossos dados corroboram com os resultados achados em estudos anteriores e a explicação para esta ausência se assimila a mesma relacionada à ausência da marcação do CD105, relacionado à redução dos estímulos nocivos sobre a parede endotelial, reduzindo assim a disfunção do endotélio e evitando toda uma cascata de remodelamento negativo sobre este vaso, evitando assim o progresso da doença aterosclerótica.

O CD68 é uma glicoproteína humana onde seu homólogo em camundongos recebe o nome de macrosialina. Ambas as proteínas são preferencialmente expressas por macrófagos e partilham a mesma estrutura bipartida tendo um domínio do tipo mucina e um domínio comum à família da lamp [76]. O CD68 é expresso em monócitos e, como consequência, macrófagos tissulares, sendo por esta razão um fiel marcador da doença aterosclerótica. Tratamentos para aterosclerose definem seus benefícios, através, dentre outros, da redução do

número de células derivadas de monócitos CD68 + na placa aterosclerótica [75]. Nossos estudos demonstraram marcação CD68+ no grupo AT 21 dias sobre células endoteliais, assim como uma característica da migração de monócitos para uma possível região interna da parede arterial. Estes achados corroboram com achados diversos CD68 + na doença aterosclerótica [77]. Esta marcação não foi observada no grupo transplantado, possivelmente pela redução dos efeitos da doença aterosclerótica programada pelo transplante de células de medula óssea.

A microscopia eletrônica foi capaz de mostrar as modificações de um remodelamento adverso ocorrido na aorta quando é utilizada uma dieta rica em gordura. Estes dados eram esperados, já que estudos anteriores demonstraram esse remodelamento do vaso ocorrido por administração de uma dieta desbalanceada e rica em gordura [78, 79]. Nos grupos transplantados observou-se que o transplante de células derivadas de medula óssea foi capaz de gerar um remodelamento benéfico sobre a parede arterial. Este remodelamento benéfico gerou uma organização natural da arquitetura do vaso e, este seria o fator principal para a melhora dos níveis glicêmicos e lipídicos encontrados nestes animais, uma vez que a disfunção endotelial não estaria em sua totalidade ocorrendo, conseqüentemente o transporte reverso de colesterol estaria preservado, evitando assim, todas as modificações geradas por um processo aterosclerótico em andamento.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a terapia com BMCs melhora a glicose do sangue, o metabolismo lipídico e o remodelamento adverdo da aorta em camundongos C57BL/6 alimentados com uma dieta aterogênica. Embora os dados sobre os efeitos benéficos da BMCs sobre a aterosclerose sejam controversos, os nossos resultados contribuem para o conhecimento atual sobre a terapia celular.

Sugestões:

O transplante de células de medula óssea sugere um efeito parácrino principal sobre o remodelamento benéfico na parede arterial e este sim, seria a chave para as modificações fisiológicas, como à redução dos níveis de glicose, colesterol total e triglicerídeos. Os dados sugerem que todas as modificações benéficas sobre a parede da aorta estariam relacionadas, principalmente, a redução inicial da disfunção endotelial e, assim, conseqüentemente, a redução das taxas sanguíneas dos níveis glicêmicos e lipídicos. Trabalhos futuros devem ser realizados com o objetivo de aprimorar melhor estas vias de modificações benéficas.

REFERÊNCIAS

- [1] Mudau M, Genis A, Lochner A and Strijdom H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc J Af* 2012; 23: 222-231.
- [2] Lahoz C and Mostaza JM. Atherosclerosis as a systemic disease. *Rev Esp Cardiol* 2007; 60: 184-195.
- [3] Beltowski J. Leptin and the regulation of endothelial function in physiological and pathological conditions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012; 39: 168-178.
- [4] Meng, W, Yu F, Chen H, Zhang J, Zhang E, Guo Y and Shi Y. Relationship between concentration difference of different density lipoproteins and shear stress in atherosclerosis. *Comput Math Methods Med* 2012; 135256
- [5] Haidari M, Ali M, Gangehei L, Chen M, Zhang W and Cybulsky MI. Increased oxidative stress in atherosclerosis-predisposed regions of the mouse aorta. *Life Sci* 2010; 87:100-110.
- [6] Pasanisi F, Contaldo, F, de Simone G and Mancini, M. Benefits of sustained moderate weight loss in obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2001; 11: 401-406.
- [7] Lesi C, Giaquinto E, Valeriani L and Zoni L. [Diet prescription in obese patients]. *Monaldi Arch Chest Dis* 2005; 64: 42-44.
- [8] Seo T, Qi K, Chang C, Liu Y, Worgall TS, Ramakrishnan R and Deckelbaum RJ. Saturated fat-rich diet enhances selective uptake of LDL cholesteryl esters in the arterial wall. *J Clin Invest* 2005; 115: 2214-2222.
- [9] Getz GS and Reardon CA. Diet and murine atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 242-249
- [10] Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D and Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 1987; 68: 231-240.
- [11] Schreyer SA, Wilson DL and Leboeuf RC. C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998; 136: 17-24.
- [12] Qiao JH, Xie PZ, Fishbein MC, Kreuzer J, Drake TA, Demer LL and Lusis AJ. Pathology of atheromatous lesions in inbred and genetically engineered mice. Genetic determination of arterial calcification. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1480-1497.
- [13] Glomset JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res* 1968; 9: 155-167.
- [14] Stein O, Dabach Y, Hollander G, Ben-Naim M, Halperin G and Stein Y. Effect of atherogenic diet on reverse cholesterol transport in vivo in atherosclerosis susceptible (C57BL/6) and resistant (C3H) mice. *Atherosclerosis* 2001; 156: 307-313.

- [15] Campagnolo P, Wong MM and Xu Q. Progenitor cells in arteriosclerosis: good or bad guys? *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 1013-1027.
- [16] Dotsenko O. Stem/Progenitor cells, atherosclerosis and cardiovascular regeneration. *Open Cardiovasc Med J* 2010; 4: 97-104.
- [17] Janeczek Portalska K, Leferink A, Groen N, Fernandes H, Moroni L, Van blitterswijk C and De Boer J. Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells. *PLoS One* 2012; 7: e46842.
- [18] Thole AA, Rodrigues-Cunha AC, Carvalho SN, Garcia-Souza EP, Cortez E, Stumbo AC, Carvalho L and Moura AS. Progenitor cells and TNF-alpha involvement during morphological changes in pancreatic islets of obese mice. *Tissue Cell* 2012; 44(4): 238-248.
- [19] Carvalho S, Da Cunha Lira D, Costa Cortez EA, De Andrade DC, Thole AA, Stumbo AC and De Carvalho L. Bone marrow cell transplantation is associated with fibrogenic cells apoptosis during hepatic regeneration in cholestatic rats. *Biochem Cell Biol* 2013; 91: 88-94.
- [20] Hristov M, Zerneck A, Schober A and Weber C. Adult progenitor cells in vascular remodeling during atherosclerosis. *Biol Chem* 2008; 389(7): 837-844.
- [21] Xu Q. Stem cells and transplant arteriosclerosis. *Circ Res* 2008; 102: 1011-1024.
- [22] Jiang C, Wang J, Yu L, Ou C, Liu X, Zhao X and Wang J. Comparison of the therapeutic effects of bone marrow mononuclear cells and microglia for permanent cerebral ischemia. *Behav Brain Res* 2013; 250: 222-229.
- [23] Fadini GP, Agostini C, Sartore S and Avogaro A. Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2007; 194: 46-54.
- [24] Jevon M, Dorling A and Hornick PI. Progenitor cells and vascular disease. *Cell Prolif* 2008; 41 Suppl 1: 146-164.
- [25] Glowinska-Olszewska B, Moniuszko M, Hryniewicz A, Jeznach M, Rusak M, Dabrowska M, Luczynski W, Bodzenta-Lukaszyk A and Bossowski A. Relationship between circulating endothelial progenitor cells and endothelial dysfunction in children with type 1 diabetes: a novel paradigm of early atherosclerosis in high-risk young patients. *Eur J Endocrinol* 2013; 168:153-161.
- [26] Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica texto-atlas*. 10^a edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 2004. fls 211 e 215.
- [27] Kierszenbaum A. *Histologia e Biologia Celular: uma introdução a patologia*. Tradução da 2^a edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2008. Parte III cap. 2 355-374.
- [28] Bai X, Wang X, Xu Q. Endothelial damage and stem cell repair in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol*. 2010 May-Jun;52(5-6):224-9.

- [29] Simionescu M, Antohe F. Functional ultrastructure of the vascular endothelium: changes in various pathologies. *Handb Exp Pharmacol*. 2006(176 Pt 1):41-69.
- [30] Peng N, Meng N, Wang S, Zhao F, Zhao J, Su L, et al. An activator of mTOR inhibits oxLDL-induced autophagy and apoptosis in vascular endothelial cells and restricts atherosclerosis in apolipoprotein E(-)/(-) mice. *Sci Rep*. 2014;4:5519.
- [31] Moraes-Teixeira Jde A, Felix A, Fernandes-Santos C, Moura AS, Mandarim-de-Lacerda CA, de Carvalho JJ. Exercise training enhances elastin, fibrillin and nitric oxide in the aorta wall of spontaneously hypertensive rats. *Exp Mol Pathol*. 2010 Dec;89(3):351-7.
- [32] Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Feb 1;23(2):168-75.
- [33] Touati S, Montezano AC, Meziri F, Riva C, Touyz RM, Laurant P. Exercise training protects against atherosclerotic risk factors through vascular NADPH oxidase, ERK1/2 and SAPK/JNK down-regulation in obese rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2014 Nov 15.
- [34] Nosaka T, Tanaka H, Watanabe I, Sato M, Matsuda M. Influence of regular exercise on age-related changes in arterial elasticity: mechanistic insights from wall compositions in rat aorta. *Can J Appl Physiol*. 2003 Apr;28(2):204-12.
- [35] Touati S, Montezano AC, Meziri F, Riva C, Touyz RM, Laurant P. Exercise training protects against atherosclerotic risk factors through vascular NADPH oxidase, ERK1/2 and SAPK/JNK down-regulation in obese rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2014 Nov 15.
- [36] Matsuda M, Nosaka T, Sato M, Ohshima N. Effects of physical exercise on the elasticity and elastic components of the rat aorta. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1993;66(2):122-6.
- [37] Chambless LE, Folsom AR, Sharrett AR, Sorlie P, Couper D, Szklo M, et al. Coronary heart disease risk prediction in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *J Clin Epidemiol*. 2003 Sep;56(9):880-90.
- [38] Ridker PM, Cook N. Should age and time be eliminated from cardiovascular risk prediction models? Rationale for the creation of a new national risk detection program. *Circulation*. 2005 Feb 8;111(5):657-8.
- [39] Klein R, Myers CE, Cruickshanks KJ, Gangnon RE, Danforth LG, Sivakumaran TA, et al. Markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction and the 20-year cumulative incidence of early age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *JAMA Ophthalmol*. 2014 Apr 1;132(4):446-55.
- [40] Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*. 1995 Feb;36(2):211-28.
- [41] Gimbrone MA, Jr., Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2000 May;902:230-9; discussion 9-40.

- [42] Maiolino G, Rossitto G, Caielli P, Bisogni V, Rossi GP, Calo LA. The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis: the myths and the facts. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:714653.
- [43] Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hulten LM, Wiklund O, Innerarity TL, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature.* 2002 Jun 13;417(6890):750-4.
- [44] Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Oct;78(10):6499-503.
- [45] Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2010 Jan;10(1):36-46.
- [46] Pinheiro AR, Cunha AR, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effects of physical exercise on hypertension and cardiovascular adverse remodeling of diet-induced obese rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007 Jun;17(5):365-75.
- [47] Xu Q. The role of stem cells in atherosclerosis. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2005 Jun;98(6):672-6.
- [48] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993 Nov;123(11):1939-51.
- [49] Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr.* 2010 May;46(3):212-23.
- [50] Carvalho SN, Lira DC, Oliveira GP, Thole AA, Stumbo AC, Caetano CE, et al. Decreased collagen types I and IV, laminin, CK-19 and alpha-SMA expression after bone marrow cell transplantation in rats with liver fibrosis. *Histochem Cell Biol.* 2010 Nov;134(5):493-502.
- [51] Junqueira LC, Montes GS, Toledo OM, Bexiga SR, Gordilho MA, Brentani RR. Evidence for collagen molecular orientation in basement membranes. *Histochem J.* 1983 Aug;15(8):785-94.
- [52] Felix AS, Rocha VN, Nascimento AL, de Carvalho JJ. Carotid body remodelling in l-NAME-induced hypertension in the rat. *J Comp Pathol.* 2012 May;146(4):348-56.
- [53] Zhang Y, Ingram DA, Murphy MP, Saadatzadeh MR, Mead LE, Prater DN, et al. Release of proinflammatory mediators and expression of proinflammatory adhesion molecules by endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 May;296(5):H1675-82.

- [54] Fledderus JO, van Oostrom O, de Kleijn DP, den Ouden K, Penders AF, Gremmels H, et al. Increased amount of bone marrow-derived smooth muscle-like cells and accelerated atherosclerosis in diabetic apoE-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2013 Feb;226(2):341-7.
- [55] Nagareddy PR, Murphy AJ, Stirzaker RA, Hu Y, Yu S, Miller RG, et al. Hyperglycemia promotes myelopoiesis and impairs the resolution of atherosclerosis. *Cell Metab*. 2013 May 7;17(5):695-708.
- [56] Felix A, Monteiro N, Rocha VN, Oliveira G, Moraes AC, Andrade C, et al. Remodeling of the thoracic aorta after bone marrow cell transplantation. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(9):5527-37.
- [57] Yuen DA, Gilbert RE, Marsden PA. Bone marrow cell therapies for endothelial repair and their relevance to kidney disease. *Semin Nephrol*. 2012 Mar;32(2):215-23.
- [58] Gallou-Kabani C, Vige A, Gross MS, Rabes JP, Boileau C, Larue-Achagiotis C, et al. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)*. 2007 Aug;15(8):1996-2005.
- [59] Catta-Preta M, Martins MA, Cunha Brunini TM, Mendes-Ribeiro AC, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets. *Nutrition*. 2012 Feb;28(2):212-9.
- [60] Stein O, Stein Y. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis*. 1999 Jun;144(2):285-301.
- [61] Schmidt-Lucke C, Fichtlscherer S, Rossig L, Kamper U, Dimmeler S. Improvement of endothelial damage and regeneration indexes in patients with coronary artery disease after 4 weeks of statin therapy. *Atherosclerosis*. 2010 Jul;211(1):249-54.
- [62] Katsuda S, Coltrera MD, Ross R, Gown AM. Human atherosclerosis. IV. Immunocytochemical analysis of cell activation and proliferation in lesions of young adults. *Am J Pathol*. 1993 Jun;142(6):1787-93.
- [63] Larifla L, Deprez I, Pham I, Rideau D, Louzier V, Adam M, et al. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and neointimal hyperplasia in vivo by adenoviral-mediated atrial natriuretic peptide delivery. *J Gene Med*. 2012 Jul;14(7):459-67.
- [64] Piera-Velazquez S, Li Z, Jimenez SA. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Am J Pathol*. 2011 Sep;179(3):1074-80.
- [65] Hu Y, Mayr M, Metzler B, Erdel M, Davison F, Xu Q. Both donor and recipient origins of smooth muscle cells in vein graft atherosclerotic lesions. *Circ Res*. 2002 Oct 4;91(7):e13-20.
- [66] Zoll J, Fontaine V, Gourdy P, Barateau V, Vilar J, Leroyer A, et al. Role of human smooth muscle cell progenitors in atherosclerotic plaque development and composition. *Cardiovasc Res*. 2008 Feb 1;77(3):471-80.

- [67] Semenza GL. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *J Cell Biochem.* 2007 Nov 1;102(4):840-7.
- [68] Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, Hirth P, Mc Mahon G, Waltenberger J, et al. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J.* 2001 Feb;15(2):427-38.
- [69] Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Komatsu R, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation.* 1998 Nov 17;98(20):2108-16.
- [70] Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation.* 2002 Oct 8;106(15):1913-8.
- [71] Reed DM, Foldes G, Harding SE, Mitchell JA. Stem cell-derived endothelial cells for cardiovascular disease: a therapeutic perspective. *Br J Clin Pharmacol.* 2013 Apr;75(4):897-906.
- [72] Nachtigal P, Zemankova Vecerova L, Rathouska J, Strasky Z. The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2012 Sep;224(1):4-11.
- [73] Jamkhande PG, Chandak PG, Dhawale SC, Barde SR, Tidke PS, Sakhare RS. Therapeutic approaches to drug targets in atherosclerosis. *Saudi Pharm J.* 2014 Jul;22(3):179-90.
- [74] Mizrak D, Brittan M, Alison M. CD133: molecule of the moment. *J Pathol.* 2008 Jan;214(1):3-9.
- [75] Rastogi P, White MC, Rickard A, McHowat J. Potential mechanism for recruitment and migration of CD133 positive cells to areas of vascular inflammation. *Thromb Res.* 2008;123(2):258-66.
- [76] Holness CL, da Silva RP, Fawcett J, Gordon S, Simmons DL. Macrosialin, a mouse macrophage-restricted glycoprotein, is a member of the lamp/lgp family. *J Biol Chem.* 1993 May 5;268(13):9661-6.
- [77] Hewing B, Parathath S, Mai CK, Fiel MI, Guo L, Fisher EA. Rapid regression of atherosclerosis with MTP inhibitor treatment. *Atherosclerosis.* 2013 Mar;227(1):125-9.
- [78] Aubin MC, Lajoie C, Clement R, Gosselin H, Calderone A, Perrault LP. Female rats fed a high-fat diet were associated with vascular dysfunction and cardiac fibrosis in the absence of overt obesity and hyperlipidemia: therapeutic potential of resveratrol. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 Jun;325(3):961-8.
- [79] Yu P, Nguyen BT, Tao M, Jiang T, Ozaki CK. Diet-induced obesity drives negative mouse vein graft wall remodeling. *J Vasc Surg.* 2014 Jun;59(6):1670-6.

APÊNDICE A - Resumo do artigo publicado no International Journal of Clinical Experimental and Pathology

Int J Clin Exp Pathol. 2014; 7(9): 5527–5537.
Published online 2014 Aug 15.

PMCID: PMC4203165

Remodeling of the thoracic aorta after bone marrow cell transplantation

[Alyne Felix](#),¹ [Nemesis Monteiro](#),¹ [Vinicius Novaes Rocha](#),¹ [Genilza Oliveira](#),² [Alan Cesar Moraes](#),¹ [Cherley Andrade](#),¹ [Ana Lucia Nascimento](#),¹ [Lais de Carvalho](#),² [Alessandra Thole](#),² [Jorge Carvalho](#)¹

[Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) ►



Abstract

Go to:


Stem cells are characterized by their ability to differentiate into multiple cell lineages and display the paracrine effect. The aim of this work was to evaluate the effect of therapy with bone marrow cells (BMCs) on blood glucose, lipid metabolism and aortic wall remodeling in mice through the administration of a high fat diet and subsequent BMCs transplantation. C57BL/6 mice were fed a control diet (CO group) or an atherogenic diet (AT group). After 16 weeks, the AT group was divided into four groups: an AT 14 days group and AT 21 days group, that were given an injection of vehicle and sacrificed at 14 and 21 days after, respectively; AT-BMC 14 days group and AT-BMC 21 days group that was given an injection of BMCs and sacrificed at 14 and 21 days after. The CO group was sacrificed along with other groups. The BMCs transplant had reduced blood glucose, triglycerides and total cholesterol. The Qa ($1/\text{mm}^2$) was quantitatively reduced in AT 14 days group, AT 21 days group and was high in AT-BMC 21 days group. The AT 21 days group exhibited increased tunica media and elastic system fibers. The immunolabeling for α -SMA and VEGF showed less immunolabeling in transplanted groups with BMCs. The immunostaining for PCNA seems to be more expressive in the group AT-BMC 21 days group. To conclude, our results support the concept that in mice, the injection of BMCs improve glucose levels, lipid metabolism and remodeling of the aortic wall in animals using atherogenic diet.

Keywords: Bone marrow cells, aorta remodeling, atherogenic diet

APÊNDICE B - Patente devidamente registrada como Caixa imobilizadora para animais de laboratório

		INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INTELECTUAL Sistema de Gestão de Qualidade Divisão de Patentes	
		Depósito de Pedido de Patente	
1. Nome do Inventor ou Titular da Invenção (Indicar o nome completo do(s) inventor(es) nascido(a) no exterior de acordo com o(s) documento(s) depositado(s))			
1.1. Nome do Inventor Titular da Invenção: CANARA			
1.2. Qualidade: INVENTOR/COINVENTOR E PROPRIETÁRIO			
1.3. INSCRIÇÃO: 0015992709			
1.4. Endereço completo: RUA NARCISO AROSTIMBUZ, 150, APT. 109, DE 2			
1.5. CEP: 05712-040			
1.6. Telefone: 11 312551281			
1.7. E-mail: www.institucional@botball.com			
<input type="checkbox"/> PATENTE DE INVENÇÃO			
2. Natureza: <input checked="" type="checkbox"/> Invenção <input type="checkbox"/> Modelo de Utilidade <input type="checkbox"/> Correção de Erros			
3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54) CAIXA IMOBILIZADORA PARA ANIMAIS DE LABORATÓRIO			
<input type="checkbox"/> CORREÇÃO DE ERROS			
4. Pedido de Divisão do pedido Nº		Data de Depósito:	
4.1. Prioridade: <input type="checkbox"/> Invenção (30) <input type="checkbox"/> Modelo (30)		<input type="checkbox"/> Invenção (30)	
5. Aspectos técnicos (a) (30363)			

APÊNDICE C – Resumo do artigo submetido para Biochemistry and Cell Biology

Structural and ultrastructural evaluation of the aortic wall after transplantation of bone marrow-derived cells (BMCs) in a model for atherosclerosis [PDF \(3776 K\)](#) [PDF-Plus \(931 K\)](#)

Alyne Souza Felix, Nemesis Monteiro, Vinicius Novaes Rocha, Genilza Oliveira, Ana Lucia Rosa Nascimento, Laís Carvalho, Alessandra Alves Thole, Jorge José de Carvalho

Published on the web 04 May 2015.

Received January 18, 2015.

Biochemistry and Cell Biology, 10.1139/bcb-2015-0006

ABSTRACT

Stem cells are characterized by their ability to differentiate into multiple cell lineages and display the paracrine effect. The aim of this work was to evaluate the effect of therapy with BMCs on glucose, lipid metabolism and aortic wall remodeling in mice through the administration of a high fat diet and subsequent BMCs transplantation. C57BL/6 mice were fed a control diet (CO group) or an atherogenic diet (AT group). After 16 weeks, the AT group was divided: an AT 14 days group and AT 21 days group, that were given an injection of vehicle and sacrificed at 14 and 21 days after, respectively; AT-BMC 14 days group and AT-BMC 21 days group that was given an injection of BMCs and sacrificed at 14 and 21 days after. The BMCs transplant had reduced blood glucose, triglycerides and total cholesterol. There was no significant difference in relation to body mass between the transplanted groups and non-transplanted groups, with all are different to CO. There was no significant difference in the glycemic curve between AT 14 days, AT-BMC 14 days, AT 21 days and these are different to CO and the AT-BMC 21 days. The increased thickness of the aortic wall was observed in all atherogenic groups, but was significantly smaller in group AT-BMC 21 days compared to AT 14 days and AT 21 days. Vacuoles in the media tunic, delamination and the thinning of the elastic lamellae were observed in AT 14 days and AT 21 days. The smallest number of these apresentation were displayed on the AT-BMC 14 days and AT-BMC 21 days. Marking to CD105, CD133 and CD68 were observed in AT 14 days and AT 21 days. These markings were not observed in AT-BMC 14 days and AT-BMC 21 days. In electron micrographs observed the beneficial remodeling in AT-BMC 14 day and AT-BMC 21 days, with the structural organization was similar to the CO group. Vesicles of pinocytosis, projection of smooth muscle cell and delamination of the internal elastic lamina are seen in groups AT 14 days group and AT 21 days group. Endothelial cell preserved, regular and continuous contour in internal elastic lamellae is observed in the CO group, AT-BMC 14 days and AT-BMC 21 days. In conclusion, an atherosclerotic model using mice and atherogenic diet, the injection of BMCs improve glucose, lipid metabolism and causes a beneficial remodeling of the aortic wall.

ANEXO - Aprovação do Comitê de ética e pesquisa para cuidado e uso de animais experimentais, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.




UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES

COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/010/2011 sobre "Transplante de células de medula óssea de camundongo na aorta em modelo experimental para o desenvolvimento de aterosclerose: aspectos estruturais, ultraestruturais e moleculares", sob a responsabilidade de **Jorge José de Carvalho**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **31/03/2011**. Este certificado expira em **31/03/2015**.

Rio de Janeiro, 31 de Março de 2011.



Prof. Patricia Cristina Lisboa
CEA/IBRAG/UERJ



Prof. Israel Felzenszwalb
CEA/IBRAG/UERJ

Prof. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Sub-Chefe do Deptº de Ciências Fisiológicas
IBRAG/UERJ - Mat. 34765-8

Israel Felzenszwalb
Diretor
IBRAG - UERJ
Mat. 2887-8

/ass

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br