

**EFEITOS DO FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE
GRANULÓCITOS (G-CSF) SOBRE A HIPERTENSÃO
RENOVASCULAR EM CAMUNONGOS**

Breno Valentim Nogueira

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória – ES, 2008**

BRENO VALENTIM NOGUEIRA

**EFEITOS DO FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE
GRANULÓCITOS (G-CSF) SOBRE A HIPERTENSÃO
RENOVASCULAR EM CAMUNONGOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisição para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez

Vitória

2008

BRENO VALENTIM NOGUEIRA

**EFEITOS DO FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE
GRANULÓCITOS (G-CSF) SOBRE A HIPERTENSÃO
RENOVASCULAR EM CAMUNONGOS**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez (Orientador)

Profa. Dra. Silvana dos Santos Meyrelles (Co-Orientadora)

Profa. Dra. Nazaré Souza Bissoli (Examinador interno)

Profa. Dra. Robéria Maria Mandes Pontes Arruda (Examinador externo)

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva (Examinador externo)

Vitória, setembro de 2008.

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

N778r Nogueira, Breno Valentim, 1979-
Efeitos do tratamento com o fator estimulador de colônias (G-CSF) sobre a hipertensão renovascular em camundongos / Breno Valentim Nogueira. – 2008.
141 f. : il.

Orientador: Elisardo Corral Vasquez.
Co-Orientadora: Silvana dos Santos Meyrelles.
Tese (doutorado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. G-CSF. 2. Hipertensão renovascular. 3. Sistema renina-angiotensina. . I. Corral Vasquez, Elisardo. II. Meyrelles, Silvana dos Santos. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 612

Para se conseguir um título de Doutor é necessário dedicação e paixão por aquilo que você faz. Consequentemente, isso nos leva a ausência familiar em prol de um grande sonho que é o descobrir...

AGRADECIMENTOS

Ao professor Vasquez, por todos os ensinamentos e lições de vida ao longo desses anos. Um grande exemplo a ser seguido.

A professora Silvana, pelas orientações, dedicação ao seu laboratório e apoio nas horas difíceis.

A minha Família!

Aos meus pais, que sempre me forneceram suporte para o estudo e para vida, pelo amor e carinho. Aos meus irmãos Rafael e Ricardo por todos os momentos de convivência. A Grizuela que nos proporcionou a alegria do nascimento do meu sobrinho Heitor.

A Lílian, minha futura esposa, que me proporciona muito amor. Uma verdadeira oncinha, que deixa minha vida mais agitada. A toda sua família, especialmente as sobrinhas Carolina e a recém chegada Maitê.

A professora Dulce Elena Casarini e Zaira Palomino da UNIFESP, que possibilitaram a dosagem de angiotensina.

A Marcella Porto e Thiago Pereira pela ajuda na efetivação de determinados protocolos.

Aos amigos do LTCC: novamente ao cômico mano Thiago; Ágata, não sei como a classifica-lá, pois é a mais nova professora do pedaço e continua como amiga do LTCC; Camille pela ajuda com a creatinina e apoio em todas as horas; a Leandro e Marcella, sempre estão dispostos a ajudar; assim como: Isabele (“Bélinha”), Maíne, Lis, Bianca e Clarisse, Fernanda, Flávia, Sarah, Edicléia, Davis e demais colegas que estão ou passaram pelo laboratório, obrigado por todo esse tempo de convivência.

Aos professores do PPGCF; ao professor Mill, pelas assinaturas de cheques e uso do laboratório; ao professor Schenberg pela edição de foto.

Aos amigos da UFES, a Marcelo Baldo pelas discussões intelectuais, a toda galera da cozinha.

Ao Departamento de Morfologia, ao professor Redins pelo uso do microscópio, professor Ian pela utilização da centrífuga e freezer, professor Nyam pelo uso do laboratório, e um agradecimento especial para Luciene.

Ao Departamento de Patologia, Prof. Carlos Musso e Carmem, pelo acesso ao micrótopo criostato.

Aos funcionários do PPGCF, especialmente Fonseca, Maria e Cláudia.

As agências financiadoras: CAPES, CNPq, FACITEC, FAPES/PRONEX, Lab. Bioclínico.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras e Tabelas.....	9
Lista de Abreviaturas.....	12
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Epidemiologia e Fatores de Risco.....	18
1.2 Sistema Renina Angiotensina (SRA).....	19
1.3 Hipertensão Renovascular Experimental.....	22
1.4 Terapia Celular.....	26
1.5 Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (G-CSF)...	28
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivo Geral.....	32
2.2 Objetivos Específicos.....	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 Animais Experimentais.....	34
3.2 Produção da Hipertensão Renovascular (2 Rins-1 Clipe)...	35
3.3 Aplicação do G-CSF.....	36

3.4 Instrumentação para Medidas Hemodinâmicas.....	36
3.5 Coleta de Sangue e Órgãos Alvo.....	37
3.6 Contagem de Leucócitos.....	37
3.7 Coleta de Plasma para Dosagem de Angiotensina I, II e 1-7.....	39
3.8 Parâmetros Preditores da Função Renal.....	39
3.8.1 Quantificação de Creatinina Plasmática e Urinária.....	40
3.8.2 Quantificação de Proteínas Urinárias.....	41
3.9 Histoquímica.....	41
3.10 Morfometria.....	42
3.11 Análise Estatística.....	42
3.12 Protocolo Experimental.....	42
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Parâmetros Ponderais.....	45
4.2 Valores de Pressão e Frequência Cardíaca.....	48
4.3 Dosagem Plasmática de Angiotensina I, II e 1-7.....	51
4.4 Contagem de Células.....	51
4.5 Quantificação de Creatinina e Proteinúria.....	53
4.6 Morfologia e Morfometria.....	54
5 DISCUSSÃO.....	59
6 CONCLUSÃO.....	76

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
ANEXOS.....	102

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
Figura 1: Esquema geral das proteínas, peptídeos, enzimas e receptores do sistema renina-angiotensina.	19
Figura 2: Efeitos da estenose unilateral evocada sobre o rim clipado influenciando o rim contralateral.	25
Figura 3: Clipes de aço inox para camundongos.	35
Figura 4: Gráfico temporal do peso corporal.	36
Figura 5: Índice cardíaco.	47
Figura 6: Relação rim clipado pelo rim contralateral.	47
Figura 7: Gráfico da pressão arterial média.	49
Figura 8: Gráficos de pressão arterial sistólica e diastólica.	50
Figura 9: Gráfico de barras da frequência cardíaca.	50
Figura 10: Imagens macroscópicas típicas dos rins nos diferentes grupos experimentais.	55
Figura 11: Imagens do coração, aorta e rins de camundongos 2R1C veículo e tratado.	55
Figura 12: Imagens macroscópica e microscópica dos rins de camundongos 2R1C veículo e tratado.	56
Figura 13: Gráfico da área de infarto renal.	57
Figura 14: Imagens histológicas de infarto renal de camundongos 2R1C veículo.	57
Figura 15: Imagens histológicas mostrando infiltrado celular renal.	58
Tabela 1: Peso corporal, peso seco ventricular e renal	46
Tabela 2: Peso seco do timo, fígado, pulmões e baço	48

Tabela 3: Concentrações plasmáticas de angiotensina I, II e 1-7	51
Tabela 4: Contagem de leucócitos do sangue periférico e da fração mononuclear	52
Tabela 5: Hemograma completo do sangue periférico	53
Tabela 6: Parâmetros preditores da função renal	54
Organograma: Organograma mostrando a divisão dos grupos experimentais	34

LISTA DE ABREVIATURAS

- 1R1C: um rim, um clipe
- 2R1C: dois rins, um clipe
- 2R2C: dois rins, dois cliques
- *ACEIs*: *angiotensin-converting enzyme Inhibitors* ou inibidores da ECA
- Akt ou PKB: proteíno-quinase B
- Ang-1-7: angiotensina 1-7
- Ang I: angiotensina I
- Ang II: angiotensina II
- ANOVA: análise de variância
- *ARBs*: *AT₁ receptor blockers* ou bloqueadores de receptor AT₁
- bpm: batimentos por minuto
- C57BL/6: linhagem de camundongo C57 black/6
- c-kit ou CD117: receptor de citocina
- cm H₂O: centímetros de água
- ECA: enzima conversora de angiotensina
- ECA2: enzima conversora de angiotensina 2
- eGFP: *enhanced green fluorescent protein*
- EPM: erro padrão da média
- EPCs: *endothelial progenitor cells* ou células progenitoras endoteliais
- EPO: eritropoetina
- ERK: *extracellular signal-regulated kinases* ou quinase regulada por sinal extracelular
- et al: e colaboradores
- FC: frequência cardíaca
- G-CSF: *granulocyte colony-stimulating factor* ou fator estimulador de colônia de granulócitos ou fator estimulante de colônias granulocíticas
- G-CSFR: receptor de G-CSF
- GM-CSF: *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* ou fator estimulador de colônia de granulócitos-monócito

- HAS: hipertensão arterial sistêmica
- HE: coloração por hematoxilina-eosina
- HGF: *hepatocyte growth factor* ou fator de crescimento de hepatócitos
- ICAM-1: molécula de adesão intercelular do tipo 1
- IL: interleucina
- i.p.: intraperitonal
- Jak: Janus quinase
- MAPK: *mitogen-activated protein kinase* ou proteína-quinase ativada por mitógeno
- MCP-1: proteína quimiotática para monócitos 1
- M-CSF: *macrophage colony-stimulating factor* ou fator estimulador de colônia de macrófagos
- MO: medula óssea
- NEP: endopeptidase neutra
- NF- κ B: fator nuclear kappa B
- NO: óxido nítrico
- PAM: pressão arterial média
- PI3K: *phosphoinositide 3-kinases or phosphatidylinositol-3-kinases* ou quinase do fosfatidil inositol 3 ou fosfatidil inositol-3-fosfato
- s.c.: subcutâneo
- SCF ou MGF: *stem cell factor or mast cell growth factor* - fator de células tronco ou pluripotenciais, ligante do receptor c-kit
- SDF-1: *stromal cell-derived factor-1* ou fator derivado de células estromais tipo 1
- SRA: sistema renina-angiotensina
- SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona
- STAT: *signal transducers and activators of transcription protein* ou transdutores de sinal e ativadores de transcrição
- TNF- α : fator de necrose tumoral α
- VCAM-1: molécula de adesão celular vascular do tipo 1
- VEGF: *vascular endothelial growth factor* ou fator de crescimento do endotélio vascular

RESUMO

Introdução: O fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) é uma citocina que estimula a hematopoese. Clinicamente o G-CSF é utilizado em situações de neutropenia, mas recentemente foi demonstrado seu efeito protetor no infarto do miocárdio e na lesão renal em modelos de isquemia/reperfusão.

Objetivos: Este trabalho visa avaliar os efeitos do tratamento com o G-CSF sobre o sistema cardiovascular e renal na hipertensão renovascular 2-rins, 1-clipe (2R1C).

Métodos: Um clipe de aço inox foi implantado na artéria renal esquerda, de camundongos C57 machos (n = 32), para indução da hipertensão renovascular 2R1C. Em seguida, os animais receberam o G-CSF (100 µg/kg/dia, sc; Filgrastim®) por 14 dias. Após o tratamento, os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina/xilazina (91/9,1mg/Kg, ip) para introdução de um cateter na carótida comum, para que após um período mínimo de 24 h se obtivessem os registros hemodinâmicos no animal acordado. Os animais foram posteriormente sacrificados em câmara de CO₂ para coleta de sangue e órgãos alvos. Os dados estão expressos como média ± EPM; na análise estatística foi utilizado ANOVA 2-vias, seguida do *post hoc* de Fisher (*p<0,05; **p<0,01).

Resultados: Houve redução da pressão arterial média nos animais 2R1C tratados com G-CSF quando comparados com o grupo tratado com veículo (129±2** mmHg vs. 150±5 mmHg, n=8). A relação rim clipado/rim contralateral mostra menor atrofia do rim clipado no grupo tratado (0,50±0,02 vs. 0,66±0,01*). Adicionalmente, a análise histopatológica renal mostrou áreas de infarto no rim clipado do grupo não tratado, as quais foram prevenidas pelo G-CSF. A dosagem plasmática de angiotensina I, II e 1-7 mostra elevação destes peptídeos no grupo 2R1C quando comparado com os animais Sham. No entanto, os níveis de angiotensina I e 1-7 estão reduzidos no grupo 2R1C tratado com G-CSF, quando comparados com o grupo 2R1C não tratado e observou-se uma tendência a redução dos níveis plasmáticos de angiotensina II. A área de infarto ocupou em média 54% da área do rim clipado, quando os animais foram tratados com G-CSF houve redução da área de infarto que passou a ocupar em média 14% da área do rim clipado.

Conclusão: A administração de G-CSF previne a formação de áreas de infarto no rim clipado e atenua a elevação da pressão arterial em camundongos com hipertensão 2R1C, evidenciado o papel protetor renal do G-CSF.

Palavras-chave: Hipertensão renovascular, Ang II, G-CSF, infarto renal

ABSTRACT

Background: The hematopoietic cytokine granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is a critical regulator of myeloid progenitor cell proliferation, differentiation and survival. And also, causes a marked increase in the mobilization of hematopoietic stem cells into the peripheral blood circulation. Recently, several studies regarding the effect of G-CSF attenuate renal injury during episode of acute ischemia-reperfusion.

Aims: To evaluate the effects of G-CSF treatment into renal and cardiovascular system of mice with two-kidney, one-clip (2K1C) hypertension.

Methods: Male C57 mice received a clip (0.12 mm) on the renal artery to induce renovascular hypertension (C57-2K1C, n = 32). All groups received G-CSF (100 µg/kg/day, SC) for 14 days since the operation. After treatment, the hemodynamic parameters were measured in conscious animals. At the end of the experiment the sample blood was collected and animals were euthanized in CO₂ chamber. Also, the kidneys, hearts and others organs were excised, drained, and weighed. All values are expressed as mean±SEM. Two-way ANOVA was used to detect differences within each experimental group followed by post hoc Fisher test. Student's *t*-test for independent samples was used when appropriate. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

Results: The animals 2K1C G-CSF showed that mean arterial pressure was lower than observed in 2K1C vehicle ($129 \pm 2^{**}$ mmHg vs. 150 ± 5 mmHg, $n=8$). The clipped kidney/contralateral kidney ratio showed a less atrophy of the ischemic kidney in treated group (0.50 ± 0.02 vs. $0.66 \pm 0.01^*$). In addition, the histopathological analyses of kidney reveal a minor kidney infarct area with G-CSF use. The levels of plasma angiotensin I, II and 1-7 showed elevation in 2K1C vehicle when compared to sham group. However, we observed down levels of angiotensin I and 1-7 in 2K1C treated group. The infarct areas include 54% of all clipped kidney area, this areas reduced to 14% with G-CSF treatment.

Conclusion: In conclusion, our data indicate that G-CSF administration prevents the kidney infarct and attenuate the high arterial blood pressure in 2K1C hypertensive mice, reinforcing the protect role of G-CSF on the kidney ischemia.

Key words: Renovascular hypertension, Ang II, G-CSF, kidney infarct

1 Introdução

1.1 Epidemiologia e Fatores de Risco

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que as doenças cardiovasculares são responsáveis por 30% das mortes em todo o mundo, tornando-se um problema de saúde pública mundial. Dentre as doenças cardiovasculares destaca-se a hipertensão arterial sistêmica. Essa incide aproximadamente em um bilhão de pessoas no mundo, trazendo consigo uma série de complicações ao organismo que geralmente passam a ser sintomáticas em sua fase tardia de evolução (Kaplan, 1997). A dificuldade no estudo da hipertensão se deve ao fato desta ser de etiologia heterogênea, multifatorial. A hipertensão pode ser classificada como primária (“essencial”) ou secundária a um processo definido, como a estenose da artéria renal causando a hipertensão denominada de renovascular. A hipertensão renovascular ocorre entre 2 a 5% de todos os casos de hipertensão da população geral (Lewandowski, 2003). A prevalência pode ser maior do que 40% nos casos de hipertensão secundária. Na maioria desses indivíduos, a formação de placas de aterosclerose provocando a estenose da artéria renal é a principal causa da hipertensão renovascular (Ozsarlak & Parizel, 2004; Textor 2004; Zeller, 2005). Há uma grande associação entre a severidade da estenose na artéria renal e atrofia renal que pode levar a nefropatia isquêmica (Rimmer & Gennari, 1993; Caps et al., 1998). A nefropatia isquêmica ativa o sistema renina-angiotensina-aldosterona, podendo levar a hipertensão grave, hipertrofia cardíaca e insuficiência renal (Zeller, 2005). Ocasionalmente, indivíduos de idade mais avançada podem apresentar insuficiência renal na ausência de hipertensão, causada por isquemia crônica pela formação de placa aterosclerótica (Greco & Breyer, 1997; Meyrier et al., 1998). Por outro lado, a revascularização da artéria renal raramente cura a hipertensão, mas pode melhorar o controle da pressão sanguínea (Zeller, 2005). A hipertensão contribui diretamente para a progressão da doença renal, que por sua vez, pode exacerbar ainda mais a hipertensão (Berend & Levi, 2008). A hipertensão está presente em mais de 80% dos pacientes com insuficiência renal crônica (Izzo & Black, 2003). A retenção de sódio e a ativação do sistema renina-angiotensina tem sido considerado o mais importante

mecanismo na elevação da pressão arterial em pacientes com doença renal (Guyton et al., 1999; Schiffrin et al., 2007). Apesar do avanço na compreensão dessas doenças, ainda é necessário à elucidação de determinados mecanismos fisiopatológicos, e a busca de novos tratamentos torna-se imprescindível.

1.2 Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

O sistema renina-angiotensina (SRA) desempenha um importante papel no sistema cardiovascular através da regulação da pressão arterial e da homeostasia do sódio. A angiotensina II (ou Ang 1-8) é o seu hormônio biologicamente ativo mais potente (Reid et al., 1978). Embora haja outras formas de angiotensinas com graus variados de bioatividade, incluindo angiotensina III (ou Ang 2-8), angiotensina IV (ou Ang 3-8) e angiotensina 1-7 (Kobori et al., 2007). Algumas são identificadas por algarismos romanos (Ex., Ang II), e todas podem ser denotadas por algarismos arábicos referindo-se a sua seqüência de aminoácidos que começa na porção N-terminal do ácido aspártico da angiotensina I (Ang 1-10). As angiotensinas são hormônios peptídeos produzidos por uma série de reações que começam com a clivagem do angiotensinogênio pela renina (Figura 1).

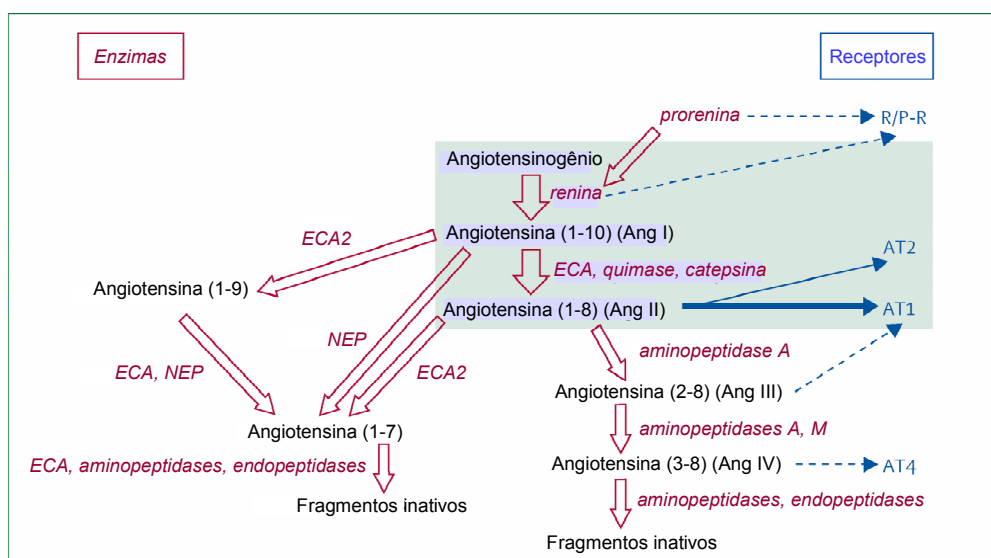


Figura 1: Esquema geral das proteínas, peptídeos, enzimas e receptores do sistema renina-angiotensina. ECA = enzima conversora de angiotensina, NEP = endopeptidase nutra (*neprilysin*).

Na arteríola aferente dos glomérulos renais encontramos células denominadas de células justaglomerulares. Essas células desempenham um importante papel no SRA, e estão em íntimo contato com as células que formam a mácula densa no túbulo contorcido distal dos néfrons. Determinados estímulos, tal como a redução da pressão de perfusão renal, fazem com que as células justaglomerulares secretem na circulação sanguínea e na linfa renal a renina (Davis, 1973). A renina descoberta em 1898 por Tigertedt e Bergman (citado em Phillips & Schmidt-Ott, 1999) é uma importante enzima que age diretamente sobre o angiotensinogênio (alfa-2-globulina) plasmático, produzido principalmente no fígado, formando um decapeptídeo denominado de angiotensina I (Ang I). A Ang I é então convertida em uma forma ativa, o octapeptídeo conhecido como angiotensina II (Ang II), através da enzima conversora de angiotensina (ECA) presente no plasma e na superfície endotelial, principalmente do endotélio pulmonar. Ao contrário de humanos e ratos, camundongos podem carrear um ou dois genes para renina, entretanto, a linhagem C57BL/6 possui um único gene para renina (Field & Gross, 1985).

A Ang II formada é um potente agente vasoconstritor que também estimula a secreção de aldosterona pelo córtex da supra-renal. Em função dessa cascata o sistema também é denominado de sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). A Ang II também estimula a sede, a liberação de hormônio antidiurético e absorção intestinal de fluídos. Um dos produtos metabólicos da Ang II é a angiotensina 1-7 (Ang 1-7), que através do seu receptor *Mas*, funciona como um inibidor próprio da Ang II, pois possui efeitos opostos aos seus (Santos et al., 2003). Por exemplo, a Ang 1-7 aumenta a sensibilidade do barorreflexo, diminui a ação simpática, possui ação anti-proliferativa celular e é vasodilatadora; enquanto que a Ang II diminui a sensibilidade do barorreflexo, estimula o sistema simpático, tem efeitos proliferativos e é vasoconstritora. (Santos et al., 1988; Dzau et al., 1991; Ferrario, 1998). A Ang II é reconhecida como um fator de crescimento que regula a proliferação celular e o processo de fibrose, e ainda pode iniciar a inflamação pelo aumento indireto da permeabilidade vascular através do recrutamento de células inflamatórias (Dzau et al, 1991; Suzuki et al, 2003). A Ang II também estimula a eritropoiese na medula óssea e aumenta a agregação plaquetária (Mrug et al., 1997; Freudenthaler et al., 1999; Cole et al., 2000). A Ang II tem importante

ação vasoconstritora, atuando diretamente nos receptores AT₁ dos vasos pré-capilares, sendo o aumento da resistência arterial periférica um dos mecanismos para elevação da pressão arterial (Heeneman et al., 1997). O receptor AT₁ é o subtipo que medeia os efeitos clássicos da Ang II, sendo mais amplamente encontrado no indivíduo adulto e subdividido em AT_{1a} e AT_{1b} (Murphy et al., 1991; Sasamura et al., 1992). O receptor AT₂, outro receptor de alta afinidade para Ang II, possui efeitos opostos ao do AT₁, por exemplo, a inibição do crescimento celular, promoção da natriurese e indução de apoptose (Nakajima et al., 1993; Yamada et al., 1996). Esse receptor é preponderante durante o desenvolvimento fetal de mamíferos e é encontrado em muito menor quantidade no indivíduo adulto, restringindo-se ao rim, algumas regiões do cérebro, útero e medula adrenal. O receptor AT₂ medeia vasodilatação no rim adulto através da formação de bradicinina e óxido nítrico (NO) (Carey et al., 2000). Como já descrito, esses receptores possuem alta afinidade para Ang II, mas ambos possuem uma pequena afinidade para Ang III, e não foi observado afinidade para Ang I. A síntese desses receptores depende da ativação pela Ang II bem como da internalização pela formação do complexo hormônio-receptor (Goodfriend TL, 2000). A síntese de AT₁ é aumentada pela insulina, glicocorticóides e fator de crescimento epidérmico, enquanto que a síntese de AT₂ está aumentada em órgãos em processo de lesão, como o coração. Podendo assim prevenir uma vasoconstrição mediada pelo AT₁ e impedir a excessiva fibrose intersticial na insuficiência cardíaca (Ohkubo et al., 1997; Oishi et al., 2006).

É difícil delimitar a contribuição quantitativa do SRA sistêmico e tecidual local para formação de angiotensina, mas o rim tem todos os elementos do SRA para sua produção local. O SRA encontra-se compartimentalizado na rede tubular e intersticial, bem como por acumulação intracelular. Os rins e as glândulas supra-renais são tecidos que guardam grandes concentrações de Ang II, muito maiores do que as concentrações plasmáticas possam justificar (Ingert et al., 2002). Devendo essa concentração ser gerada localmente a partir do angiotensinogênio produzido pelas células dos túbulos proximais e células justaglomerulares. A renina secretada pelas células do aparelho justaglomerular no interstício renal e compartimento vascular também provê uma via de geração local de Ang I (Hackenthal et al., 1990; Schnermann et al., 1997). A ECA é

abundante nos rins de ratos, localizando-se nos túbulos proximais e distais, ducto coletor e células endoteliais (Casarini et al., 1997). Em roedores, o receptor AT_{1a} é encontrado em todos os segmentos dos néfrons, enquanto que o AT_{1b} é mais abundante somente no glomérulo (Bouby et al., 1997). Estudos funcionais da microvasculatura renal obtidos de camundongos *knockout* para o gene do receptor AT_{1a} têm mostrado que a arteríola aferente possui ambos os subtipos (AT_{1a}, AT_{1b}), enquanto que a eferente somente expressa o AT_{1a} (Harrison-Bernard et al., 2003).

1.3 Hipertensão Renovascular Experimental

A redução da pressão de perfusão renal por estenose de uma ou ambas as artérias renais causa hipertensão renovascular unilateral ou bilateral através de uma inapropriada atividade do SRAA prejudicando a excreção de sódio e água. A compreensão desse mecanismo começou em 1934, quando Goldblatt et al. demonstraram a elevação substancial da pressão arterial em cães através da colocação de um clamp regulável na artéria renal para suprimir o fluxo sanguíneo. Há dois modelos animais clássicos de hipertensão com obstrução do fluxo sanguíneo da artéria renal: a chamada hipertensão 1-rim, 1-clipe (1R1C), na qual é promovida a estenose da artéria renal por um clipe em volta da artéria e remoção do rim contralateral; e a hipertensão 2-rins, 1-clipe (2R1C), em que apenas um clipe causa a estenose da artéria renal com redução crônica da perfusão, sem remoção do outro rim. O modelo 1R1C também compartilha muitas características com um terceiro modelo, o chamado 2-rins, 2-clipes (2R2C) que mimetiza a redução da perfusão de ambos os rins (Kurnjek et al., 1983; Zeng et al., 1998).

O mecanismo envolvido na hipertensão 2R1C é diferente do observado na hipertensão 1R1C (Ledingham, 1971; Cabral et al., 1997). No modelo de hipertensão 2R1C o estabelecimento e a manutenção da hipertensão dependem principalmente da ativação contínua do SRA. De modo que aparentemente a pressão distal à estenose no rim clipado não é completamente restaurada, havendo então, contínua produção de renina no rim isquêmico e elevados níveis circulantes de Ang II (Navar et al., 2002). Os níveis de aldosterona acompanham as elevações de renina e Ang II, mas o rim

contralateral pode excretar com certa eficiência a sobrecarga de sódio imposta pelo rim isquêmico, prevenindo o excessivo acúmulo de sódio no organismo (Cabral et al., 1997; Lerman et al., 2005). Logo no primeiro dia após a implantação do clipe na artéria renal, observa-se uma pequena elevação da pressão arterial (Cabral et al., 1997). Em ratos ou coelhos, o modelo 2R1C leva a um gradual e crônico aumento da pressão arterial, atingindo o platô depois de duas semanas, podendo haver subsequente decréscimo em 10-20% dos animais em resposta a severa atrofia renal devido à excessiva estenose. Mas a concentração plasmática de renina retorna para os valores normais se a hipertensão é moderada (Lerman et al., 2005). Pode haver numerosas razões para o declínio nas concentrações plasmáticas de renina (Lerman et al., 1999; 2001). Em cães o aumento da pressão arterial é transiente, retornando aos valores normais em poucas semanas. No entanto, se a estenose promover uma redução além de 50% do fluxo normal, ocorrem aumentos prolongados da pressão arterial (Ferrario et al., 1971). O tempo de manutenção da pressão elevada e os níveis pressóricos atingidos no modelo 2R1C dependem da espécie e do grau de estenose da artéria renal (Fazan et al., 2001; Lerman et al., 2005).

O modelo renovascular 2R1C tem sido exaustivamente utilizado em ratos para mimetizar a hipertensão renovascular clínica, (Wilson & Byrom, 1939; Moyses et al., 1994; Kobori et al., 2007). Contudo, o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular e a produção de transgênicos (Smithies & Kin, 1994; Smithies, 1997), direcionaram os estudos desse modelo para o camundongo (Jonhs et al., 1996; Wiesel et al., 1997; Mazzolai et al., 2004; Arruda et al., 2005; Nogueira et al., 2007). Em contraste com o bastante previsível padrão observado nos diferentes modelos animais, humanos com estenose da artéria renal mostram considerável variabilidade na concentração plasmática de renina, porque há uma grande variabilidade nos graus de estenose, coexistência de morbididades, idade, ingestão de sódio e tratamento com anti-hipertensivos (Lerman et al., 2005). Mas parece haver um aumento inicial da concentração de renina plasmática que se normaliza tardiamente (Vasilev et al., 1978). Concentrações normais de renina podem ser encontradas em torno de 25-37% dos pacientes com estenose da artéria renal (Rossi et al., 1997).

No modelo 2R1C o desenvolvimento da hipertensão é acompanhado por um significativo aumento nos níveis de Ang II intrarenal, tanto no rim clipado quanto no rim não clipado (Guan et al., 1992; Sadjadi et al., 2002). Estudos demonstraram que aumentos na concentração plasmática Ang II são capazes de induzir aumentos substanciais, que excedem os níveis plasmáticos, da Ang II intrarenal via receptor AT₁ (Zou et al., 1998). O aumento da concentração de Ang II intrarenal mediada por receptor AT₁ pode persistir mesmo após a redução dos níveis plasmáticos de Ang II (Navar et al., 2002). O rim contralateral (não isquêmico) possui aumento na produção de RNA mensageiro para angiotensinogênio, aumento na atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) intrarenal com aumento ou manutenção da produção local de Ang II, apesar da reduzida produção de renina neste rim, levando ao acúmulo da Ang II intrarenal (Guan et al., 1992, Navar et al., 2002). Independentemente da produção da ECA intrarenal, a produção de Ang II no rim clipado parece está aumentada via quimase (Sadjadi et al., 2005). Recentemente, demonstrou-se aumento nos níveis de renina no ducto coletor de ratos com hipertensão 2R1C (Prieto-Carrasquero et al., 2005).

Embora o rim contralateral não seja o fator causal inicial, ele desenvolve inapropriado aumento da reabsorção de sódio, resultando no aumento do volume de fluido extracelular, que pode ser contraposto somente pela elevação da pressão arterial (Navar et al., 2002). A reduzida pressão de perfusão no rim isquêmico causa aumento unilateral da produção e liberação de renina, resultando em elevados níveis circulantes de Ang I e Ang II. O rim contralateral permanece exposto à elevada pressão arterial sistêmica e pode, portanto, ser capaz de aumentar a excreção de sódio durante o tempo no qual o mecanismo de pressão-natriurese permanecer intacto. Na presença de elevações de Ang II associada com níveis de aldosterona, a relação pressão-natriurese do rim contra-lateral torna-se marcadamente suprimida (Navar et al., 2002). Os níveis plasmáticos elevados de Ang II influenciam o rim contralateral através de múltiplos mecanismos, incluindo a vasoconstrição nas arteríolas aferente e eferente que reduz o fluxo de plasma renal e a taxa de filtração glomerular; aumento da absorção de sódio através do túbulo proximal e distal; em longo prazo, pode haver hipertrofia da arteríola aferente e nefrosclerose (Navar et al., 2002). A combinação da hipertensão,

nefrosclerose e aumento das concentrações intrarenais de Ang II podem levar ao dano permanente do rim contralateral, ao passo que a pressão arterial pode não retornar aos níveis normais mesmo após o reparo da estenose ou nefrectomia do rim isquêmico, tornando-se essencial a descoberta e tratamento precoce da hipertensão renovascular (Izzo & Black, 2003; Zeller, 2005). Esses estudos comprovam a complexidade dos mecanismos envolvidos na hipertensão 2R1C, que pode ser visto de uma maneira abrangente na figura 2.

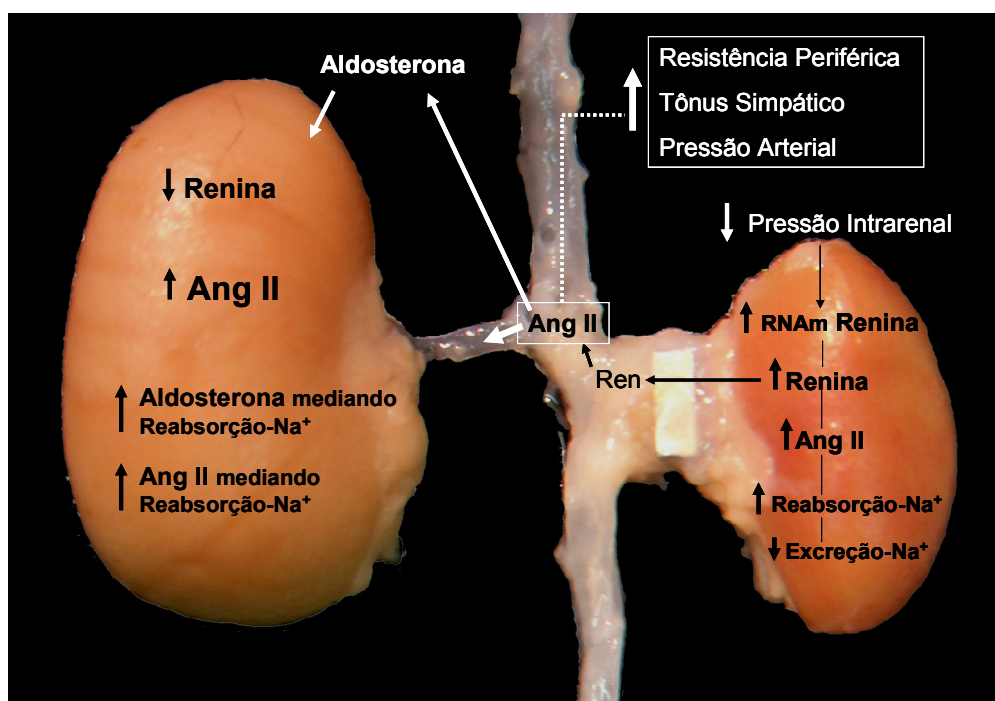


Figura 2: Efeitos da estenose unilateral evocada sobre o rim clipado influenciando o rim contralateral. Podemos observar as diferenças existentes no SRA intrarenal entre o rim clipado e o contralateral. Modificado de Navar et al., 2002.

O aumento do SRA intrarenal tem sido implicado na progressão da hipertensão e lesão renal de modelos experimentais. A investigação funcional e estudos de amostras de biópsia renal também enfatizam esse aumento no homem. Muitos estudos têm demonstrado renoproteção significativa através do bloqueio do SRA comparado com efeito de outras drogas anti-hipertensivas, sugerindo um papel crucial da ativação do

SRA intrarenal nas doenças renais humanas (Kobori et al., 2007). Há vários grupos farmacológicos sendo utilizados com intuito de contrapor-se ao SRA, como os inibidores da ECA (*ACEIs*), bloqueadores de receptor AT_1 (*ARBs*) e recentemente o alisquireno, um inibidor direto de renina (Wood et al., 2003; Gradman & Kad, 2008). Investigações farmacológicas com *ACEIs* e *ARBs* suportam a idéia de que a Ang II exerce um papel fundamental na patogênese da hipertensão e lesão renal por ativação inapropriada de AT_1 (Timmermans et al., 1993; Navar et al., 2000). O uso de *ACEIs* não afeta a atividade da ECA, de modo que ocorre elevação das concentrações plasmáticas de Ang 1-7, que também deixa de ser degradada pela ECA que foi inibida. O rim desempenha um papel crucial no desenvolvimento da hipertensão, a hipertensão é tanto causa como consequência da doença renal (Izzo & Black, 2003). Vasodilatadores ou antagonistas de Ang reduzem a pressão arterial, mas também reduzem a pressão de perfusão renal podendo causar maior retenção volumétrica. Por outro lado, o uso de diuréticos aumenta a excreção de sódio e favorece a depleção volumétrica, mas isto leva a ativação do SRA. Por isso, as diretrizes estabelecidas pelas sociedades de hipertensão recomendam que *ACEIs* e *ARBs* sejam usados concomitantemente com diuréticos como primeira linha de terapia para reduzir a pressão sangüínea em pacientes hipertensos com doença renal (Chobanian et al., 2003; Cifkova et al., 2003; Ikeda et al., 2006).

1.4 Terapia Celular

Nos últimos anos, a terapia celular vem se tornado uma promissora ferramenta contra as doenças cardiovasculares (Orlic et al., 2001a; Rauscher et al., 2003; Olivares et al., 2004; Vilas-Boas et al., 2004; Soares et al., 2004; Tura et al., 2007), bem como para os processos regenerativos em diferentes modelos de lesão renal (Poulsom et al., 2001; Gupta et al., 2002; Kale et al., 2003; Lin et al., 2003; Rookmaaker et al., 2003). Estudos demonstram que as células tronco possuem plasticidade para gerar tipos celulares diferentes daqueles para o qual elas haviam sido programadas (Graf, 2002; Zubair et al., 2002; Wagers & Weissman, 2004). Como exemplo, a diferenciação de células tronco em células endoteliais e cardiomiócitos (Asahara et al., 1997; Makino et

al., 1999; Jackson et al., 2001). Pesquisas demonstram o aumento de células progenitoras endoteliais (EPCs) circulantes em função da atividade física, do uso de estatinas, estrógenos e fatores de crescimento; enquanto o envelhecimento, hipercolesterolemia, diabetes e hipertensão reduzem o número de EPCs na circulação sanguínea (Vasa et al., 2001; Loomans et al., 2004; Urbich & Dimmeler, 2005). Pouco são os estudos que utilizam células tronco na hipertensão arterial, e em sua maioria, concentram-se nas células progenitoras endoteliais (Kukharchuk et al., 2003; Loomans et al., 2004; Imanishi et al., 2005; Dias da Silva et al., 2005). O estudo no rato espontaneamente hipertenso é recente, onde estudos mostram queda da pressão temporariamente com a terapia celular ou com fator estimulador de colônias de granulócitos (Kukharchuk et al., 2003; Dias da Silva et al., 2005), outros não observaram queda da pressão (Gonçalves et al. 2008).

As células tronco pluripotentes provenientes da medula óssea do indivíduo adulto são utilizadas clinicamente há vários anos no tratamento de leucemias (Thomas et al., 1986; Clift et al., 1993). Seu uso em outras doenças torna-se uma grande alternativa terapêutica. Minimizando ainda questões éticas que envolvam as células tronco embrionárias, além de não sofrerem rejeição, quando provenientes do próprio indivíduo ou linhagem compatível. Uma alternativa menos invasiva e mais rápida, seria a mobilização das células tronco de medula óssea para a circulação periférica através do emprego de algumas citocinas ou fatores de crescimento, como o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), o fator de células tronco (SCF) e interleucina-3 (IL-3), os quais mobilizam preferencialmente células tronco hematopoiéticas, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator 1 derivado de células estromais (SDF-1), os quais mobilizam preferencialmente células progenitoras endoteliais (Papayannopoulou, 2004; Losordo & Dimmeler, 2004; Takano et al., 2006; Gazitt, 2008). Um estudo pioneiro com intuito de mobilizar as células tronco da medula óssea através da associação do G-CSF com SCF foi o de Orlic et al. (2001b), no qual o tratamento se mostrou eficaz para regeneração do miocárdio infartado de camundongos. Além do recrutamento celular, essas citocinas também atuam diretamente nas células alvo de órgãos afetados, acrescentando ainda mais benefício ao tratamento (Yang et al., 2002; Iwaguro et al., 2002; Nishida & Hamaoka, 2006;

Takano et al., 2006). Por exemplo, a eritropoetina (EPO) e o G-CSF possuem efeitos anti-apoptóticos diretos, através dos seus respectivos receptores, em modelos murinos de lesão renal por isquemia/reperfusão (Spandou et al., 2006; Xie et al., 2006).

1.5 Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (G-CSF)

As citocinas são moléculas mensageiras solúveis e de curta ação do sistema imunológico. Esse termo inclui as linfocinas, monocinas e vários polipeptídios que regulam as respostas imunológica, inflamatória e reparadora do indivíduo. A maioria das citocinas tem um amplo espectro de efeitos, e algumas são produzidas por vários tipos celulares. Atualmente esse grupo molecular é classificado em cinco categorias: citocinas que medeiam a imunidade natural; citocinas que regulam o crescimento, ativação e diferenciação de linfócitos; citocinas que ativam as células inflamatórias; as citocinas que afetam os movimentos dos leucócitos também chamadas de quimiocinas; e citocinas que estimulam a hematopoiese. Muitas das citocinas que estimulam a hematopoiese são derivadas de linfócitos ou de células estromais que estimulam o crescimento e produção de novas células sanguíneas atuando sobre células tronco hematopoéticas (Cotran et al., 2000; Takano et al., 2006). Vários membros dessa família denominam-se fatores estimuladores de colônias (CSF) porque foram inicialmente detectados por sua capacidade de promover o crescimento *in vitro* de colônias de células hematopoéticas da medula óssea. Dentre os mais conhecidos membros desse grupo, encontram-se o GM-CSF, G-CSF e ligante c-kit (SCF).

O G-CSF é uma glicoproteína produzida principalmente por células da linhagem monócitos/macrófago, mas pode ser produzida por células de origem mesodérmica, como endotélio, fibroblasto e células mesoteliais (Zhang et al., 2004). Sua ação é mediada pelo receptor G-CSFR expresso na superfície da membrana em células da linhagem hematopoiética, tais como: monócitos, neutrófilos maduros, algumas linhagens linfóides, progenitor mielóide e mesmo algumas linhagens de células leucêmicas (Avalos, 1996). Esse receptor também foi encontrado em células de origem não hematopoiética, como as células endoteliais e miócitos cardíacos (Calhoun et al., 1999; Li et al., 2006). O aumento da expressão do G-CSFR foi observado em

camundongos tratados com G-CSF, tanto nos animais controles quanto naqueles com lesão renal (Li et al., 2008). A concentração plasmática normal do G-CSF em humanos é de cerca de 40 pg/mL, podendo esta atingir níveis que ultrapassam 2.000 pg/mL em determinadas condições como infecção (Kawakami et al., 1990). Também foram observados aumentos nas concentrações de G-CSF em camundongos submetidos à isquemia/reperfusão renal (Zhang et al., 2004). De modo que a produção tecidual local pode desempenhar uma possível ação protetora no rim com lesão por isquemia/reperfusão.

Clinicamente, o G-CSF é utilizado em situações de neutropenia, devido à quimioterapia principalmente, com intuito de regular a produção de neutrófilos. Iwasaki et al., demonstraram no ano de 2005 o efeito protetor do G-CSF sobre a lesão tubular renal de camundongos induzida pela cisplatina. O G-CSF vem sendo utilizado para mobilização de células tronco hematopoiética da medula óssea para a circulação periférica em casos de transplantes hematopoiéticos (Nishida & Hamaoka, 2006). Além disso, estudos demonstram a capacidade protetora e regenerativa do G-CSF em modelos animais de isquemia cardíaca, renal e cerebral (Ohtsuka et al., 2004; Takano et al., 2006; Nishida et al., 2004; Toth et al., 2008).

A via de sinalização intracelular PI3K/Akt desempenha um papel crucial na sobrevivência de diversos tipos celulares, regulando sua proliferação e apoptose (Kandel & Hay, 1999; Brunet et al., 1999). Quando ativada, a Akt retorna para o citoplasma e fosforila várias proteínas-alvo. Uma delas, chamada de *BAD*, é uma proteína que normalmente induz as células a entrarem no processo de apoptose. A Akt fosforila a *BAD*, inativando-a, e assim, promovendo a sobrevivência celular (Albert et al., 2004). Alguns estudos demonstraram que a ação anti-apoptótica do G-CSF é mediada por via PI3K/Akt, estando esta envolvida no reparo da lesão isquêmica do cérebro e coração (Fujio et al., 2000; Matsui et al., 2001; Shibata et al., 2002; Ueda et al., 2006). Essa via de sinalização também desempenha um importante papel na regulação do reparo renal após lesão por isquemia/reperfusão (Xie et al., 2006). Recentemente, foi demonstrado que a ação citoprotetora do G-CSF contra a lesão renal por isquemia/reperfusão em camundongos C57, parece está associada com seu efeito anti-apoptótico mediado por *up-regulation* da via de sinalização PI3K/Akt (Li et al.,

2008). No mesmo estudo, foi observado o aumento da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 nos rins dos camundongos tratados com G-CSF, enquanto que a expressão da proteína pró-apoptótica Bax foi significativamente reduzida.

No entanto, a literatura envolvendo os benefícios do G-CSF na lesão renal é recente, possuindo pontos divergentes entre alguns estudos, como a dose administrada e o modelo de lesão renal induzida através isquemia ou substância tóxica. Apesar da maioria dos estudos trazerem os efeitos benéficos do uso do G-CSF na lesão renal, Tögel et al. (2004) criticam o recrutamento celular acompanhado de granulocitose. Nesse estudo, a alta dose de G-CSF administrada (250 µg/kg/dia) foi associada com agravamento da falência renal e mortalidade dos camundongos submetidos à lesão por isquemia/reperfusão. Por outro lado, nos camundongos controles, a administração do G-CSF não exerceu qualquer efeito renal.

A lesão isquêmica renal no modelo murino de hipertensão 2R1C torna-se um alvo potencial para a terapia com G-CSF. Sabe-se que tanto o SRA quanto o G-CSF têm influências sobre as células tronco da medula óssea. Porém, a interação entre o SRA, principalmente Ang II, e o G-CSF ainda é desconhecida. Além disso, não foram encontrados na literatura estudos que relacionassem a influência do G-CSF sobre a hipertensão renovascular, o que torna o presente estudo inédito e relevante.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do G-CSF sobre o sistema cardiovascular e renal no camundongo com hipertensão renovascular 2-rins, 1-clipe (2R1C).

2.2 Objetivos Específicos

- Observar se o G-CSF é capaz de modificar os níveis de pressão arterial sistêmica em camundongos normotensos e hipertensos;

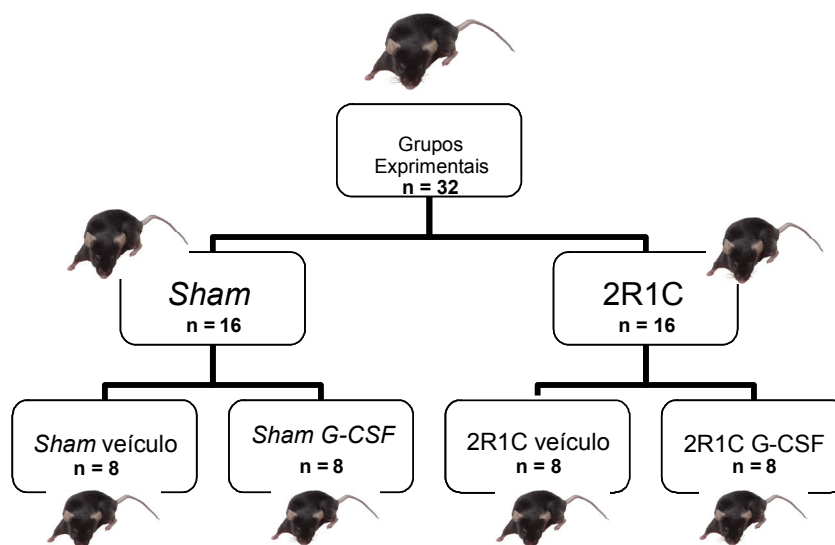
- Avaliar a influência da hipertensão renovascular e do G-CSF sobre os níveis plasmáticos de angiotensina I, II e 1-7;
- Avaliar a efetividade do G-CSF sobre o recrutamento celular, e sua influência sobre o baço e medula óssea de camundongos C57;
- Analisar a influência da hipertensão 2R1C e do G-CSF sobre as alterações morfológicas renais e cardíaca;
- Avaliar a função renal através da quantificação dos níveis plasmáticos e urinários de creatinina nos camundongos 2R1C e tratados com G-CSF, bem como os níveis de proteinúria nestes animais;

3 Materiais e Métodos

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos isogênicos da raça C57BL/6, machos adultos jovens com idade variando entre 8-9 semanas e pesando em média 23 g. Os animais eram provenientes de uma colônia de criação de responsabilidade do nosso próprio laboratório, sendo criados e mantidos no biotério de Transgenes e Controle Cardiovascular, pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas no Centro de Ciências da Saúde da UFES. Os animais recebiam água e ração (Labina[®], Purina) *ad libitum* e tinham controlado o ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como, a temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e a umidade ($60\pm 10\%$) do local onde permaneciam. A utilização e o manuseio experimental dos animais foram de acordo com as normas estabelecidas pelo *Guide for care and use of laboratory animals (NIH Publication, 1985)* e *Guide to the care and use of experimental animals (Olfert et al, 1993)*.

Para os experimentos, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (ver organograma abaixo), sendo dois grupos controles normotensos e dois grupos com hipertensão renovascular 2 rins, 1 clipe (2R1C). Os grupos controles receberam veículo (*sham* veículo, n = 8) ou G-CSF (*sham* G-CSF, n = 8), e o mesmo foi realizado com os grupos hipertensos (2R1C veículo, n = 8; 2R1C G-CSF, n = 8).



Organograma: O organograma dos grupos experimentais de camundongos, mostrando a subdivisão dos grupos controles (*Sham*) e hipertensos (2R1C).

3.2 Produção da Hipertensão Renovascular (2 Rins-1 Clipe)

Os animais, com aproximadamente 23 g, foram anestesiados com uma mistura de ketamina (91 mg/Kg) e xilazina (9,1 mg/Kg) *i.p.*, colocados em posição decúbito dorsal e com auxílio de uma lupa cirúrgica (Opto Eletrônica S/A Sn-2002, São Carlos, SP) o rim esquerdo foi exposto por meio de uma pequena incisão lateral. Após um completo isolamento da artéria renal esquerda, um clipe de aço inox (Exidel SA, Suíça – figura 3), desenvolvido especificamente para camundongos, com uma abertura

de 0,12 mm, foi colocado na artéria renal próximo à aorta abdominal (Wiesel et al., 1997). Em seguida, o rim foi gentilmente acomodado na cavidade retroperitoneal, a musculatura foi suturada *catgut* simples e a pele com fio de algodão. Nos animais controles foram realizados os mesmos procedimentos cirúrgicos acima, exceto por não colocarmos o clipe na artéria renal, o que denominamos de cirurgia fictícia ou “falso operado” (*sham operated*). Durante toda a cirurgia a temperatura corporal era controlada por uma manta térmica regulada mantendo-a em 37 °C. Esses animais eram mantidos durante 2 (duas) semanas em gaiolas individuais e recebiam água e ração *ad libitum*, tinham controlado o ciclo de 12 horas claro/escuro, a temperatura (22±2 °C) e a umidade (60±10%) do local onde permaneciam.

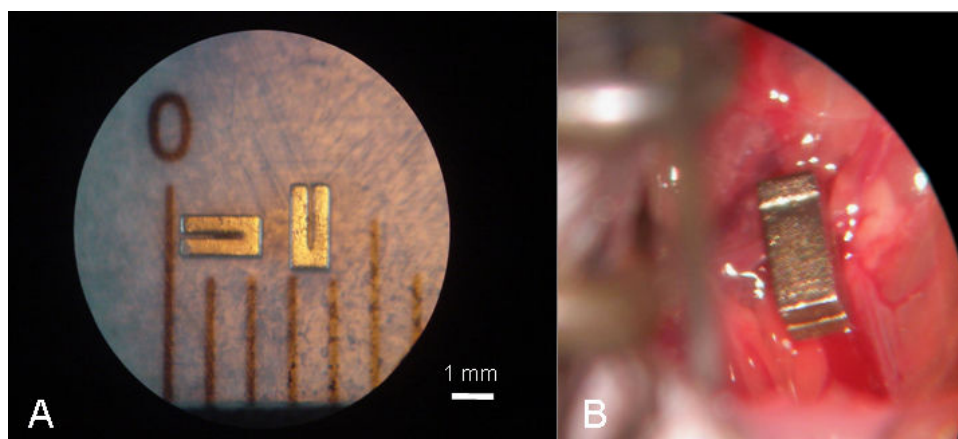


Figura 3: Na figura A, visualiza-se as dimensões dos cliques de aço inox para camundongos; em B, visualiza-se o clipe implantado na artéria renal esquerda.

3.3 Aplicação do G-CSF

Os animais receberam diariamente o G-CSF (Filgrastim®, Bio Sidus S.A., Argentina; importado e embalado por: Biosintética Farmacêutica Ltda., Brasil), na dose de 100 µg/kg/dia s.c., por 14 dias desde a implantação do clipe na artéria renal. Os grupos que não receberam o G-CSF, receberam veículo (solução glicosada 5%). O G-CSF endógeno é uma glicoproteína produzida por monócitos, fibroblastos e células endoteliais, enquanto que o filgrastim é produzido por bactérias (*E.coli*) geneticamente

modificadas pela adição de um gene para o fator estimulador de colônias de granulócitos, através da técnica de DNA recombinante. O filgrastim consiste de uma cadeia única de polipeptídeos, não glicosilada, contendo 175 aminoácidos com peso molecular de 18.800 daltons. Apresenta um resíduo livre de cisteína, diferindo do G-CSF natural por apresentar um resíduo terminal N-metionina adicional, necessário para a expressão da *E.coli*. O filgrastim aumenta consideravelmente o número de neutrófilos no sangue periférico em 24 horas. O efeito sobre os neutrófilos é dose-dependente. Após a interrupção do uso da aplicação de filgrastim, a contagem de neutrófilos é reduzida em 50% ao final de 1 a 2 dias, normalizando-se em um prazo de 1 a 7 dias (informações do fabricante).

3.4 Instrumentação para Medidas Hemodinâmicas

Cateteres de silicone (0.040 mm O.D. - 0.025 I.D.; Micro-Renathane®, Braintree Science Inc, USA) tiveram redução do seu diâmetro por aquecimento e foram preenchidos com solução de salina/heparina (50:1) para evitar a formação de coágulos quando inseridos nas artérias dos animais. Os animais foram então anestesiados (ketamina 91 mg/kg e xilazina 9,1 mg/kg *i.p.*) e posicionados sobre uma manta térmica. Com auxílio de uma lupa cirúrgica foi inserido um cateter na carótida direita de cada animal, e este foi posteriormente exteriorizado pelo dorso dos animais com auxílio de um trocater. Decorrido um período mínimo de 24 horas após a cirurgia, para recuperação dos animais, foram realizadas as medidas hemodinâmicas. Através da conexão do cateter com o transdutor de pressão, sinais foram emitidos para um sistema de aquisição de dados (BIOPAC Systems, Santa Barbara, CA, USA), para obtenção dos registros de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).

3.5 Coleta de Sangue e Órgãos Alvo

Os animais foram posteriormente sacrificados em câmara de CO₂, ou por deslocamento cervical, para coleta de sangue e órgãos alvos. O sangue foi coletado do

ventrículo direito com uso de uma seringa. O baço, fígado, pulmões, coração (ventrículos) e timo foram extraídos cuidadosamente, posteriormente colocados em estufa aquecida a 40° C por 24 horas, para desidratação dos mesmos, e então foram novamente pesados.

3.6 Contagem de Leucócitos

A alíquota de 20 µL de sangue foi adicionada a um microtubo (Eppendorf®) contendo 380 µL de ácido acético a 2% para lise de hemácias. Após a homogeneização por 2 minutos, uma alíquota dessa solução foi colocada em uma câmara de Neubauer (0,100 mm profundidade, 0,0025 mm² - Labor Optik) coberta por uma lamínula apropriada. Depois de 5 minutos para distribuição adequada das células, a câmara de Neubauer foi levada a um microscópio óptico invertido (Q730I, Quimis® Aparelhos Científicos Ltda., Brasil), onde se realizava a contagem dos leucócitos totais. Foram contadas as células dos quatro quadrantes externos superiores e dos quatro inferiores. Então, realizou-se a média das células contidas nos quadrantes, a qual foi multiplicada por 200 para se chegar ao valor absoluto dos leucócitos sangüíneos por microlitro. O restante da amostra sangüínea foi enviado ao Laboratório Bioclínico para realização do hemograma completo.

Também foi realizada a contagem da fração mononuclear das células de medula óssea e baço. Para isso, imediatamente após o sacrifício do animal foi feita a extração dos membros posteriores e baço. Os fêmures, tíbias e baço de cada animal foram conservados em meio de cultura (DMEM/F12) associado à baixa temperatura (gelo) até o término da limpeza (retirada de músculo e tecido conjuntivo) dos ossos. Posteriormente com uso de agulha tipo insulina e seringa de 10 mL contendo meio de cultura, foi realizado a lavagem (*flush*) do canal medular contendo a medula óssea através das epífises ósseas cortadas. O lavado medular foi depositado em tubo cônico de 15 mL (Falcon) e centrifugado (1200 rpm, 10 minutos) para a formação do *pellet*. O mesmo procedimento foi realizado com o baço, que foi reduzido a pequenos pedaços por lâmina de bisturi. O *pellet* foi resuspendido em meio de cultura e cuidadosamente depositado sobre o gradiente de densidade (Histopaque® - 1083, Sigma) para uma

nova centrifugação (1500 rpm, 30 minutos). Após a coleta do anel de células mononucleares foi realizada a lavagem das células com PBS através de três centrifugações (1200 rpm, 10 minutos), pois o gradiente é tóxico para as células. Terminado esse procedimento foi realizada a contagem de células mononucleares de baço e medula óssea na câmara de Neubauer. Para a contagem foi retirada uma alíquota de 10µl da suspensão de células e homogeneizado em 90µl de PBS, 10µl foram transferidos para solução corante azul de Türk, que contém ácido acético para hemólise dos eritrócitos, e posteriormente 10µl para a solução azul de tripan. O azul de tripan é excluído do citoplasma das células viáveis, já as células mortas são incapazes de excluí-lo e aparecem azuis, permitindo-se assim o cálculo do percentual de células viáveis. O número de células foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Número de células}}{\text{Número de campos contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

Para viabilidade:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células} - \text{N}^{\circ} \text{ de células mortas}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

3.7 Coleta de Plasma para Dosagem de Angiotensina I, II e 1-7

Vinte e um camundongos C57 foram separados nos diferentes grupos experimentais para dosagem plasmática de Ang I, II e 1-7. Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e o sangue foi rapidamente coletado através do ventrículo direito com uso de uma seringa que continha EDTA e 100 µL de coquetel inibidor de proteases para uso geral (P2714, Sigma Aldrich). O sangue foi delicadamente homogeneizado e centrifugado por quinze minutos, 3000

rpm, à 4°C. O plasma foi congelado imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -70°C até a análise por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) no Departamento de Nefrologia da UNIFESP.

A extração das angiotensinas foi realizada em colunas C₁₈ Sep-Pak previamente ativadas com metanol (5 mL), tetrahidrofurano (5 mL), hexano (5 mL), metanol (5 mL) e água (10 mL). Após a ativação, as amostras foram aplicadas nas colunas, lavadas com água e eluídas na mistura de etanol, ácido acético e água (90:4:6). Os eluatos foram liofilizados e redissolvidos em 500 µL de fase móvel A (5% de acetonitrila em 0,1% de ácido ortofosfórico), e então filtrados com membrana de 0,22 µm para serem analisados por HPLC.

Os peptídeos foram separados em coluna de fase reversa Aquapore ODS 300 (250 x 4,6 mm), 7 µ, utilizando 5 min de gradiente isocrático seguido por 20 minutos de gradiente linear de 5% a 35% de fase móvel B (95% Acetonitrila em ácido trifluoroacético 0,1%), sob um fluxo de 1,5 mL/min por 40 minutos por HPLC. A coluna de HPLC foi calibrada utilizando padrões sintéticos e a detecção dos peptídeos foi acompanhada em absorbância 214 nm. Os cálculos foram efetuados a partir de uma curva padrão de concentração conhecida.

3.8 Parâmetros Preditores da Função Renal

Outro grupo de animais foi destinado para gaiola metabólica e análise histológica. Após 14 dias de tratamento, os camundongos foram colocados individualmente em gaiolas metabólicas para coleta de urina e obtenção do volume urinário. Por um período aproximadamente de 4 horas, esses animais não tiveram acesso à ração, para evitar a possível contaminação da urina com proteínas provenientes da ração. Após essa coleta de urina para dosagem de proteínas e creatinina, foi mensurado o volume urinário de 24 horas.

3.8.1 Quantificação da Creatinina Plasmática e Urinária

As medidas de creatinina foram realizadas no plasma e na urina dos animais, a fim de se inferir a função renal dos animais 2R1C e tratados com G-CSF. A concentração de creatinina foi realizada com uso de *kits* colorimétricos específicos (Bioclin, Brasil) para leitura no espectrofotômetro (Bioespectro, SP-220). A técnica está baseada na reação colorimétrica de ponto final (Jaffé modificada), na qual a creatinina reage com o ácido pícrico, formando um complexo de cor amarelo-avermelhado. Nesse pH ocorre a máxima formação do complexo corado creatinina-picrato e também com outros elementos plasmáticos. Com a adição do reagente ácido, o pH é diminuído e a cor devida à creatinina é desfeita, permanecendo a cor devida aos cromogênios. Por diferença entre as leituras obtidas no pH alcalino e no pH ácido, obtém-se o valor real da creatinina.

A partir dos valores de volume urinário e quantidade de creatinina no plasma e urina podemos calcular a excreção de creatinina em 24 horas e o seu *clearance* de acordo com as fórmulas abaixo:

- Excreção urinária de creatinina em 24 horas

$$\text{Creatinina (mg/24h)} = [\text{creatinina}] \text{ na urina} \times \text{volume}$$

- *Clearance* de Creatinina

$$\text{Clearance (mL/min)} = \frac{[U_{Cr}] \times V_U}{[P_{Cr}] \times 1440}$$

Onde: $[U_{Cr}]$ = Concentração urinária de creatinina (mg/dL); V_U = Volume urinário em 24 horas; $[P_{Cr}]$ = Concentração plasmática de creatinina (mg/dL); 1440 = Tempo de coleta relativa a 24 horas (minutos)

3.8.2 Quantificação de Proteínas Urinárias

A proteinúria foi determinada através de reação de ponto final com o *kit* colorimétrico específico (Sensiprot, Labtest Diagnóstica S.A., Brasil). De modo que o vermelho de pirogalol reage com o molibdato de sódio formando um complexo que combinado com a proteína em meio ácido desenvolve um cromóforo de cor azul, com o

máximo de absorção de 600 nm. A absorbância resultante é diretamente proporcional à concentração de proteína da amostra. O kit apresenta alta sensibilidade de detecção, podendo detectar concentrações de até 2 mg/dL, e apresenta resposta semelhante para albumina e globulinas.

3.9 Histoquímica

Após a passagem pela gaiola metabólica os camundongos foram sacrificados por meio de deslocamento cervical. Para execução da perfusão fez-se uma incisão no átrio direito e em seqüência infundiu-se 50 ml de salina tampão fosfato (PBS: 0,1 M; pH 7,4) no ventrículo esquerdo, seguido de 50 ml de paraformaldeído (4%), com pressão de 100 mm Hg. Ao término da perfusão foram retirados os órgãos de interesse, os quais foram estocados isoladamente em recipientes plásticos contendo solução de PBS com paraformaldeído (9:1), até o momento da preparação histológica. As amostras teciduais foram posteriormente preparadas para inclusão em parafina com uso de álcool e xileno (xilol) em diferentes tempos e concentrações. Após a inclusão, foram feitos cortes de 10 µm de espessura e os cortes colocados sobre lâminas de vidro tratadas com albumina para aderência tecidual. Então, os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE), deixando os tecidos corados em azul-arroxeados as estruturas basófilas e em róseo-avermelhado as estruturas acidófilas, e coradas pelo picro-sírius que evidencia o colágeno do tipo I na cor vermelha. Ao término da impregnação pelos corantes, realizou-se a montagem para preservação dos cortes. Uma resina (bálsamo) foi espalhada sobre os cortes e imediatamente coberta por uma lamínula de vidro (24 x 60 mm, nº 1, Herka[®], Alemanha).

3.10 Morfometria

Com uso de um microscópio trinocular (AX70, Olympus) acoplado a uma câmera digital (VK-C150, Hitachi, Japão) fez-se a captura das imagens de interesse dos rins. Esses procedimentos foram efetuados no Departamento de Morfologia da Universidade

Federal do Espírito Santo (UFES). Para quantificação da área de infarto renal, foram capturadas imagens das lâminas do rim esquerdo através de um *scanner* acoplado a um computador. Para que assim, fossem obtidas imagens panorâmicas em menor aumento de toda extensão renal. A área de infarto renal foi então quantificada através da variação de coloração apresentada (HE), utilizando-se as ferramentas do programa Image J (*National Institute of Health, USA*). Um estudo no modelo duplo-cego foi realizado para essa análise, de modo que não houvesse conhecimento a qual grupo pertencia cada animal analisado, evitando assim, qualquer tendência dos examinadores.

3.11 Análise Estatística

Os resultados estão expressos como média \pm EPM. Uma vez que o teste de normalidade foi positivo, as médias dos valores entre os grupos foram analisadas estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, completamente randomizadas, seguida do teste *post hoc* de Fisher. O teste *t* de Student foi utilizado para comparação quando desejada entre apenas 2 amostras, sejam elas pareadas ou independentes. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

3.12 Protocolo Experimental

A fim de se avaliar os efeitos do tratamento com o G-CSF sobre o sistema cardiovascular e renal na hipertensão renovascular 2R1C, foram analisados camundongos C57 com mesma faixa de peso e idade no início do estudo, de modo a se ter o mínimo de variáveis influenciando nos resultados.

Estudo 1: Avaliação da terapia com G-CSF sobre a hipertensão renovascular 2R1C

Poderia a terapia com G-CSF alterar os padrões hemodinâmicos observados no modelo 2R1C? Para tentar responder esta pergunta, primeiramente foram comparados os animais C57 controles (*sham*) veículo e tratados com G-CSF, para verificar possíveis alterações hemodinâmicas causadas pelo G-CSF no animal normotenso. Outros animais foram submetidos à cirurgia de implantação do clipe de aço inox na artéria renal esquerda que receberam veículo ou G-CSF. Após 14 dias, os animais foram anestesiados e canulados para registros hemodinâmicos no animal acordado.

Estudo 2: Influência da hipertensão renovascular 2R1C e do G-CSF no sistema renina-angiotensina, no número de células sanguíneas e na morfologia renal

Havendo redução dos níveis pressóricos, qual seria o mecanismo responsável por essa redução? Numa tentativa de responder essa pergunta foram quantificados os níveis plasmáticos de Ang I, II e 1-7, e também realizado a análise morfológica renal. Além disso, foi quantificado o número de células da fração mononuclear da medula óssea e baço, e leucócitos circulantes.

Estudo 3: Avaliação da função renal dos camundongos com hipertensão renovascular e a influência do G-CSF

Como estaria a função renal nos camundongos C57 aos 14 dias de hipertensão e após a administração do G-CSF? Para isso, após a passagem pela gaiola metabólica, foram quantificados os níveis plasmáticos e urinários de creatinina nos camundongos 2R1C e tratados com G-CSF, bem como os níveis de proteinúria nestes animais.

4. Resultados

4.1 Parâmetros Ponderais

O gráfico de dois pontos (figura 4) mostra o peso dos animais nos diferentes grupos, no dia da cirurgia e 14 dias após. Pode-se observar que não há diferenças entre os grupos no dia em que o animal foi submetido à cirurgia fictícia (*sham*) ou para implantação do clipe na artéria renal esquerda. Decorridos 14 dias, os camundongos

hipertensos (2R1C) veículo apresentaram perda de peso estatisticamente significativa quando comparados com os camundongos do grupo falso operado veículo ($24,2 \pm 0,34$ g vs $23,1 \pm 0,4$ g, $p < 0,05$). O grupo *sham* tratado ganhou peso, mas sem resultado significativo em relação ao grupo 2R1C tratado, visto que este grupo partiu de um patamar de peso pouco mais baixo que os demais grupos. Isso também demonstra que a aplicação do G-CSF não alterou o ganho de peso no decorrer do tempo. Apesar de não haver diferença de peso dentro do mesmo grupo na análise temporal, a inclinação ascendente da reta dos animais *sham* demonstra claramente a tendência ao ganho de peso no decorrer do tempo, enquanto que a inclinação descendente dos animais 2R1C mostra a tendência para perda de peso devido à hipertensão.

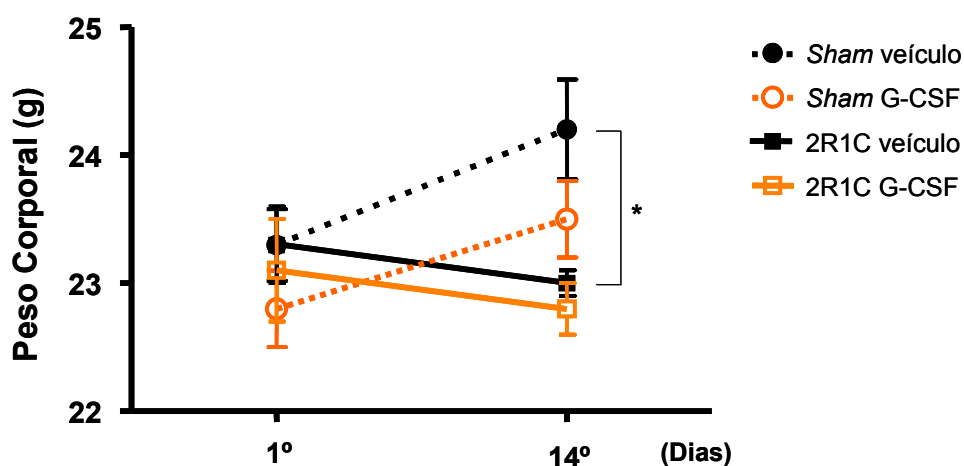


Figura 4: O gráfico temporal de dois pontos mostra o peso corporal (g) de camundongos C57BL ($n = 8$ por grupo) no dia em que foi realizado a cirurgia (sem diferença significativa entre os 4 grupos) e após quatorze dias. Os valores indicam média \pm EPM, * $p < 0,05$ vs *sham* veículo (ANOVA - 2 vias).

A tabela 1 mostra o peso corporal ao final de 14 dias, o peso seco ventricular e renal. De acordo com a tabela 1, os dados mostram o aumento significativo do peso ventricular nos grupos hipertensos em relação aos respectivos grupos controles, sem haver diferença estatística entre os camundongos 2R1C que receberam veículo ou G-CSF.

Tabela 1. Peso corporal, peso seco ventricular e renal.

	Grupos			
	Sham		2R1C	
	Veículo (8)	G-CSF (8)	Veículo (8)	G-CSF (8)
Peso corporal final (g)	24,2±0,34	23,5±0,3	23,1±0,4 [^]	22,8±0,2 ^{^^}
Peso ventricular (mg)	25±0,75	24±0,58	30±1,33 ^{**}	27,9±0,91 ^{**}
Peso renal (mg)				
Rim Direito	41±1	38±1	44±2 [#]	41±2
Rim Esquerdo	41±2	36±1	22±4 ^{**}	27±2 ^{**}

Valores expressos como média ± EPM

[^]p < 0,05 vs grupo controle veículo

^{^^}p < 0,01 vs grupo controle veículo

[#]p < 0,01 vs sham tratado

^{**}p < 0,01 vs respectivo grupo controle

Os resultados da relação peso ventricular pelo peso corporal (figura 5) corroboram os achados de peso ventricular absoluto, sem qualquer correção, mostrado na tabela 1. De modo que nos grupos controles (*sham*) a relação encontra-se em torno de 01 (um), mais precisamente 1,05±0,02 mg/g (*sham* veículo) e 1,03±0,03 mg/g (*sham* + G-CSF). Os índices do grupo 2R1C (1,31±0,06 mg/g) e 2R1C tratado (1,22±0,03 mg/g) apontam para hipertrofia cardíaca dos animais hipertensos.

A figura 6 exibe a relação entre o rim clipado (rim esquerdo) e o rim contralateral, cujos valores individuais foram vistos na tabela 1. Os camundongos dos grupos *sham* veículo e *sham* tratado apresentam a relação de 0,980±0,019 e 0,956±0,028, respectivamente. Enquanto que nos grupos hipertensos esses valores estão reduzidos, traduzindo o desequilíbrio entre o peso renal esquerdo e direito devido à colocação do clipe na artéria renal. Um achado surpreendente foi a diferença significativa dessa relação entre os grupos hipertensos (2R1C = 0,504±0,090 vs 2R1C + G-CSF = 0,672±0,055, p < 0,05), indicando o efeito do G-CSF em atenuar a desproporção entre o rim clipado e o contralateral.

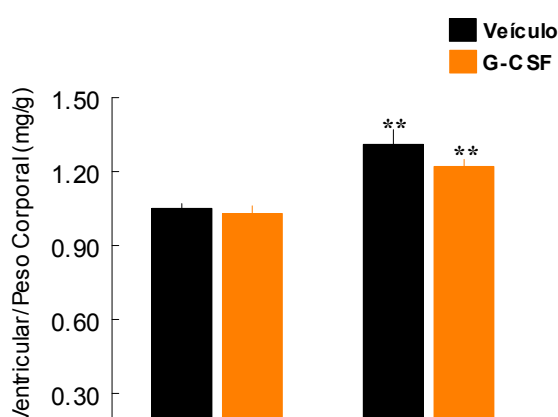


Figura 5: O gráfico de barras mostra a relação peso ventricular pelo peso corporal (mg/g), ou índice cardíaco, de camundongos C57BL (n = 8 por grupo). Os valores indicam média \pm EPM, ** p < 0,01 vs respectivo grupo controle (ANOVA - 2 vias).

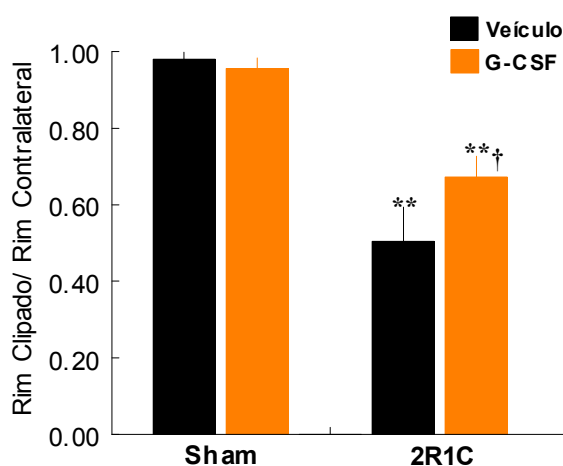


Figura 6: O gráfico de barras mostra a relação rim clipado sobre o rim contralateral de camundongos C57BL (n = 8 por grupo). Os valores indicam média \pm EPM, ** p < 0,01 vs respectivo grupo controle, † p < 0,05 vs grupo 2R1C (ANOVA - 2 vias).

A tabela 2 mostra o peso seco do timo, fígado, pulmões e baço. Não houve diferença estatística entre os pesos secos e úmidos (ver anexo) do timo e pulmões. No entanto, foi observada uma redução significativa da massa hepática no grupo 2R1C veículo. Essa significância desapareceu quando o peso do órgão foi corrigido pelo peso do animal. Observa-se também a esplenomegalia nos grupos que receberam o fator estimulador de colônias. Esse aumento foi ainda maior nos camundongos hipertensos que receberam o G-CSF.

Tabela 2. Peso seco do timo, fígado, pulmões e baço.

	Grupos			
	Sham		2R1C	
	Veículo (8)	G-CSF (8)	Veículo (8)	G-CSF (8)
Timo (mg)	7±0	6±1	6±1	7±1
Fígado (mg)	397±16	374±15	353±16#	369±13
Pulmões (mg)	32±1	31±1	32±1	34±1
Baço (mg)	17±1	26±3**	18±1	31±1**#

Valores expressos como média ± EPM.

p < 0,05 vs respectivo grupo controle

** p < 0,01 vs grupos veículo

Além dos resultados apresentados, também foi realizado a pesagem úmida das supra-renais. Não houve diferença entre os grupos veículos (*sham* = 4,63±0,34 mg; 2R1C = 5,39±0,4 mg), mas os grupos *sham* G-CSF (4,05±0,35 mg; p < 0,05) e 2R1C G-CSF (3,59±0,2 mg; p < 0,01) apresentaram diferença em relação ao grupo 2R1C veículo.

4.2 Valores de Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

A figura 7 mostra o gráfico de barras da pressão arterial média (PAM) nos diferentes grupos estudados, de modo que não houve diferença estatística entre os grupos controles (*sham*) que receberam veículo ou o G-CSF (105 ± 1 vs 102 ± 1 mm Hg). No 14º dia de hipertensão renovascular, os camundongos 2R1C que receberam veículo apresentaram elevação significativa da PAM de aproximadamente 45 mm Hg, quando comparado com respectivo grupo controle (105 ± 1 vs 150 ± 5 mm Hg, p < 0,01). Interessantemente, a administração do G-CSF por 14 dias impediu que os valores de PAM do grupo 2R1C atingissem os níveis do grupo 2R1C veículo, havendo diferença estatística entre os valores de pressão dos grupos hipertensos (2R1C = 150 ± 5 vs 2R1C + G-CSF = 127 ± 2 mm Hg, p < 0,01).

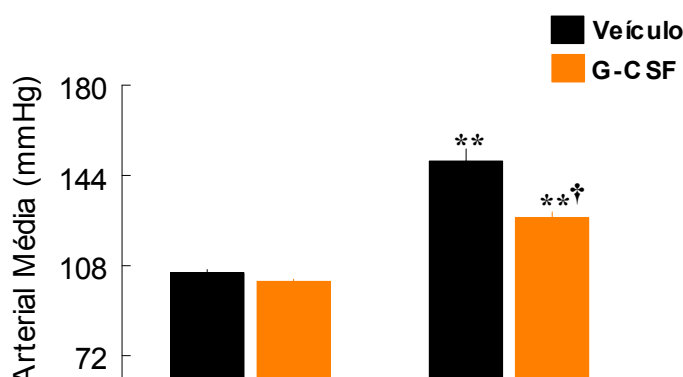


Figura 7: Valores basais de pressão arterial média de camundongos C57BL normotensos (*sham*) e hipertensos (2R1C) após 14 dias de estenose da artéria renal, n = 8 por grupo. Os valores indicam média \pm EPM, ** p < 0,01 vs respectivo grupo controle; † p < 0,01 vs grupo 2R1C (ANOVA - 2 vias).

Abaixo, na figura 8, podemos observar os valores de pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD). Não há diferenças da PAS e PAD entre os grupos *sham*. Quando comparados os grupos hipertensos com seus respectivos controles, observamos diferenças significantes tanto da PAS (veículo = 128 ± 2 vs 182 ± 7 mm Hg, p < 0,01; tratado = 126 ± 1 vs 162 ± 4 mm Hg, p < 0,01), quanto da PAD (veículo = 82 ± 1 vs 119 ± 6 mm Hg, p < 0,01; tratado = 78 ± 1 vs 92 ± 3 mm Hg, p < 0,01). Quando comparados, os grupos hipertensos apresentaram alta significância estatística (p < 0,01) de PAS e PAD, demonstrando a influência do G-CSF sobre a pressão arterial.

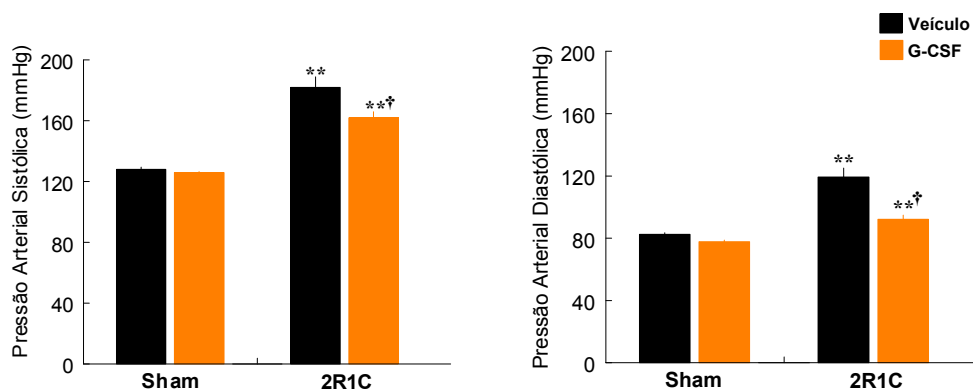


Figura 8: Valores basais de pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica de camundongos C57BL (n = 8 por grupo). Os valores indicam média \pm EPM, ** p < 0,01 vs respectivo grupo controle; † p < 0,01 vs grupo 2R1C (ANOVA - 2 vias).

Os resultados de frequência cardíaca (figura 9) mostram que não houve diferença significativa entre os grupos controles (veículo, 538 ± 14 bpm; tratado, 499 ± 12 bpm). Observou-se taquicardia nos animais com hipertensão renovascular 2R1C. Porém, não houve redução significativa quando o animal hipertenso foi tratado com o G-CSF (2R1C = 624 ± 26 bpm vs 2R1C + G-CSF = 593 ± 16).

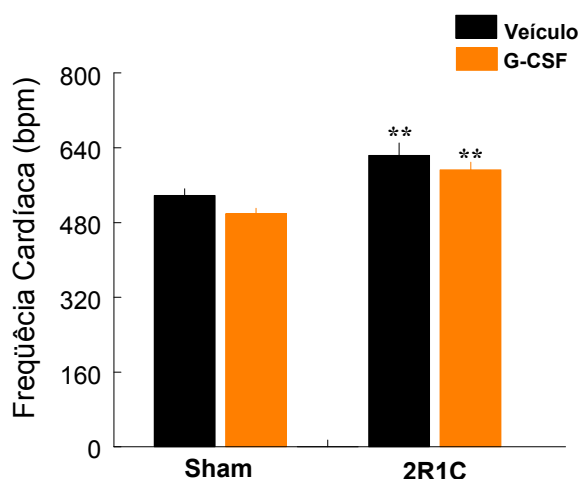


Figura 9: Valores basais de frequência cardíaca de camundongos C57BL (n = 8 por grupo). Os valores indicam média \pm EPM, ** p < 0,01 vs respectivo grupo controle (ANOVA - 2 vias).

4.3 Dosagem Plasmática de Angiotensina I, II e 1-7

Um importante dado obtido foi a dosagem plasmática de Ang I, Ang II e Ang 1-7. Conforme observado na tabela 3, não houveram diferenças entre os grupos controles, que receberam veículo ou o G-CSF. Os níveis de Ang I e Ang 1-7 estão muito elevados no grupo de camundongos 2R1C em relação ao grupo controle. Também, no grupo 2R1C veículo os níveis plasmáticos de Ang II estão extremamente elevados no 14º dia após a clipagem. Quando se adiciona o fator estimulador de colônias ao grupo 2R1C,

pode-se observar que os níveis de Ang I e 1-7 estão equivalentes aos grupos *sham*, mas os níveis de Ang II continuaram significativamente elevados, apesar da aparente queda ($p = 0,2$) quando comparado com grupo 2R1C veículo.

Tabela 3. Concentrações plasmáticas de Angiotensina I, II e 1-7.

	Grupos			
	<i>Sham</i>		2R1C	
	Veículo (5)	G-CSF (5)	Veículo (5)	G-CSF (6)
Angiotensina I (pmol/mL)	88±6	88±6	141±18**	74±10#
Angiotensina II (pmol/mL)	29±9	27±5	119±16**	93±7**
Angiotensina 1-7 (pmol/mL)	88±9	92±1	154±9**	96±3#

Valores expressos como média ± EPM

** $p < 0,01$ vs grupo *sham*

$p < 0,01$ vs grupo 2R1C

4.4 Contagem de Células

A tabela 4 mostra os valores absolutos da contagem dos leucócitos totais do sangue circulante periférico e também a contagem de células da fração mononuclear de baço e medula óssea. Não houve diferença estatística entre os grupos veículos quanto ao número de leucócitos sangüíneos. Porém, se o desenho do estudo for modificado e for realizado o teste *t* haverá significância entre os grupos *sham* e 2R1C ($p < 0,01$). Nos grupos que receberam o G-CSF houve grande aumento de leucócitos totais circulantes com relação aos grupos veículos. Houve também um maior número de leucócitos no grupo com hipertensão 2R1C tratado ($n = 10$) em relação ao grupo normotenso tratado ($n = 7$).

Os resultados apresentados na tabela 4 sobre a contagem da fração mononuclear mostram uma tendência ao aumento de células do baço dos camundongos *sham* tratados ($n = 5$) em relação aos grupos veículos, mas além da amostra ser pequena, há um grande desvio na mesma. No entanto, observamos um grande aumento do número das células do baço dos camundongos do grupo 2R1C tratado ($n = 6$) tanto em relação aos grupos veículo quanto em relação ao grupo *sham* tratado. A contagem da fração mononuclear das células de medula óssea não mostra

diferença entre o grupo *sham* (n = 5) e 2R1C (n = 5) veículo. Mas há grande acréscimo do número de células da medula dos animais normotensos que receberam o G-CSF, e um aumento mais discreto do grupo 2R1C + G-CSF, com relação aos grupos veículo. Não há diferença entre os grupos tratados. A viabilidade celular no baço e medula óssea variou entre 95-97%.

Tabela 4. Contagem de leucócitos do sangue periférico e da fração mononuclear.

	Grupos			
	Sham		2R1C	
	Veículo	G-CSF	Veículo	G-CSF
Sangue periférico/ mm ³	2370±288 (12)	8057±1820**♣ (8)	4495±487 (17)	12413±2366### (10)
Baço/ mL, x10 ⁷	1,526±0,206 (5)	4,568±1,021 (5)	2,068±0,750 (5)	11,316±3,439### (6)
Medula óssea/ mL, x10 ⁷	2,310±0,148 (5)	4,594±0,780** (5)	2,118±0,162 (5)	3,803±0,437* (6)

Valores expressos como média ± EPM.

* p < 0,05 vs grupos veículo

** p < 0,01 vs grupos veículo

♣ p < 0,05 vs 2R1C veículo

p < 0,05 vs sham + G-CSF

A tabela 5 mostra o hemograma completo dos camundongos dos diferentes grupos experimentais. Podemos observar que houve eficácia do G-CSF no recrutamento de neutrófilos nos grupos tratados. Também, houve uma tendência (p = 0,064) do grupo 2R1C veículo ao aumento do número de neutrófilos. Nos camundongos do grupo *sham* veículo ocorreu maior percentual (80%) de linfócitos circulantes em relação ao número de neutrófilos (15%). Com o uso do G-CSF ocorreu uma equivalência nessa proporção, de modo que há elevação do percentual de neutrófilos, e conseqüentemente, redução do percentual de linfócitos, apesar do aumento do número de linfócitos nos grupos tratados. Não houve diferenças na quantidade de monócitos, basófilos ou eosinófilos circulantes.

Tabela 5. Hemograma completo do sangue periférico.

	Grupos			
	Sham		2R1C	
	Veículo (8)	G-CSF (4)	Veículo (10)	G-CSF (8)
Neutrófilo (%)	15±4	39±10*	32±6*	44±7**
Linfócito (%)	80±4	58±10	64±7	52±8**
Hemácias/mm ³	7.889±616	6.800±347	9.169±763#	7.188±494
Hemoglobina (g/dL)	11±1	11±0,4	14±1	11,7±1
Plaquetas/ mm ³ , x 10 ³	800±51	798±142	629±61	633±60

Valores expressos como média ± EPM.

* p < 0,05 vs *sham* veículo

** p < 0,01 vs *sham* veículo

p < 0,05 vs grupos G-CSF

O número de hemácias está elevado no grupo 2R1C veículo quando comparado com os grupos que receberam o G-CSF, porém não houve diferença estatística quando comparado com seu respectivo grupo controle *sham*. A hemoglobina também tendeu a se elevar no grupo 2R1C. Com relação ao número de plaquetas, observou-se uma tendência à redução destas nos grupos hipertensos veículo (p = 0,06) e tratado (p = 0,065) quando comparados com grupo *sham* veículo. Devido ao maior erro padrão da média e número pequeno de animais, essa tendência no grupo *sham* G-CSF ficou reduzida.

4.5 Quantificação de Creatinina e Proteinúria

A tabela 6 mostra parâmetros que possam ser relacionados à função renal, como creatinina plasmática, proteinúria, etc. Não foi encontrada significância estatística entre os volumes urinários de 24 horas, apesar de aparentemente este ser maior nos animais 2R1C. Também não houve diferenças nas concentrações de creatinina urinária e plasmática entre os diferentes grupos, apesar dos grupos tratados apresentarem maior valor absoluto. Não houve resultados significantes para o *clearance* de creatinina, apesar dos resultados apontarem para o aumento no grupo 2R1C. Também não ocorreu diferença na medida de proteínas urinárias.

Tabela 6. Parâmetros preditores da função renal

	Grupos			
	Sham		2R1C	
	Veículo (4)	G-CSF (4)	Veículo (7)	G-CSF (5)
Volume urinário de 24h (mL)	2,1±0,3	1,8±0,2	4,1±0,9	4,5±1,7
Creatinina urinária (mg/dL)	18,75±4,15	31,28±1,81	21,52±2,44	30,96±7,95
Creatinina plasmática (mg/dL)	0,62±0,12	0,79±0,14	0,61±0,12	0,85±0,04
Clearance (μL/min)	48±12	64±14	97±30	90±45
Proteinúria (mg/dL)	100±3	108±7	93±4	97±4

Valores expressos como média ± EPM.

4.6 Morfologia e Morfometria

A figura 10 mostra a macroscopia dos rins dos quatro grupos estudados. A simples observação macroscópica direta do rim clipado atrai a atenção, pelo fato do rim clipado (esquerdo) apresentar atrofia e o rim contralateral exibir hipertrofia compensatória. Quando o grupo 2R1C foi tratado com G-CSF observou-se uma menor atrofia, ou mesmo a ausência de atrofia, no rim clipado (Figura 11). Esse curioso fato foi comprovado pela relação rim clipado/ rim contralateral visto anteriormente na figura 6. A figura 12 mostra em maior aumento a macroscopia dos rins de um animal 2R1C e 2R1C tratado com G-CSF com sua respectiva imagem microscópica do rim clipado. No ápice do rim clipado do mesmo animal mostrado na figura 11 e 12 é possível visualizar uma área de necrose coagulativa que também foi vista em outros animais do grupo 2R1C veículo. A microscopia vista na figura 12 compara o rim esquerdo de um animal 2R1C veículo com o 2R1C tratado. O tecido corado com hematoxilina-eosina mostra anucleação de um glomérulo no limite de uma área de infarto com tecido renal remanescente. O infarto renal apresenta necrose coagulativa, perda de núcleos, aglomeração do citoplasma e aumento da eosinofilia celular, mas com preservação dos contornos básicos da arquitetura glomerular e tubular.

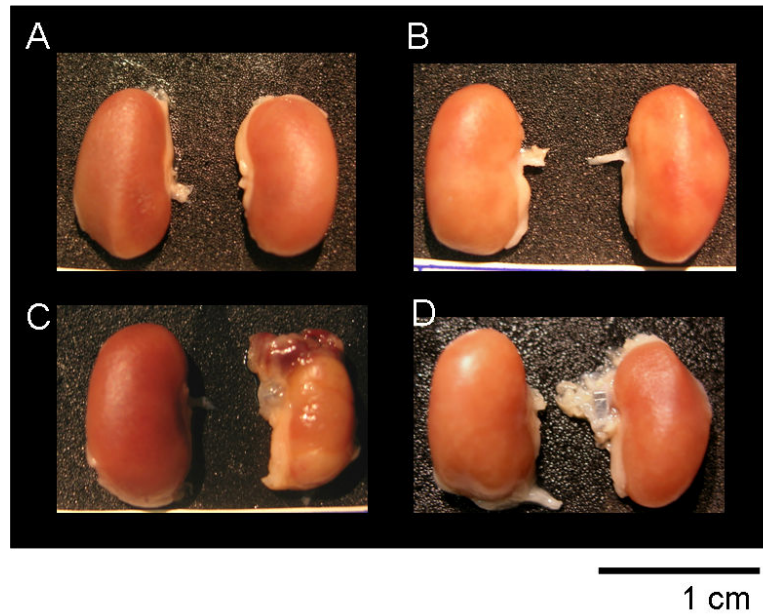


Figura 10. A imagem A e B mostram os rins dos grupos *sham* veículo e tratado, respectivamente; em C a macroscopia dos rins de um animal 2R1C veículo, em D visualizam-se os rins de um animal 2R1C tratado com G-CSF. Em C e D é possível visualizar o clipe na artéria renal esquerda. A barra no canto inferior direito mede 1 cm.

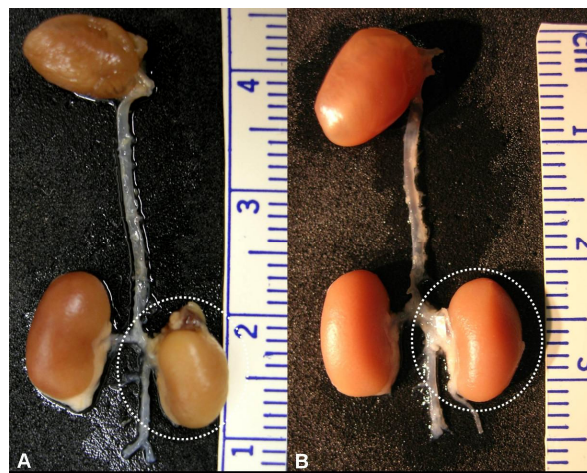


Figura 11. A imagem A e B mostram a aorta ligada ao coração e mais abaixo aos rins de um animal 2R1C e 2R1C tratado com G-CSF, respectivamente. O rim clipado (esquerdo) aparece circulado em ambas as imagens. É possível visualizar o clipe que está parcialmente coberto por tecido conjuntivo.

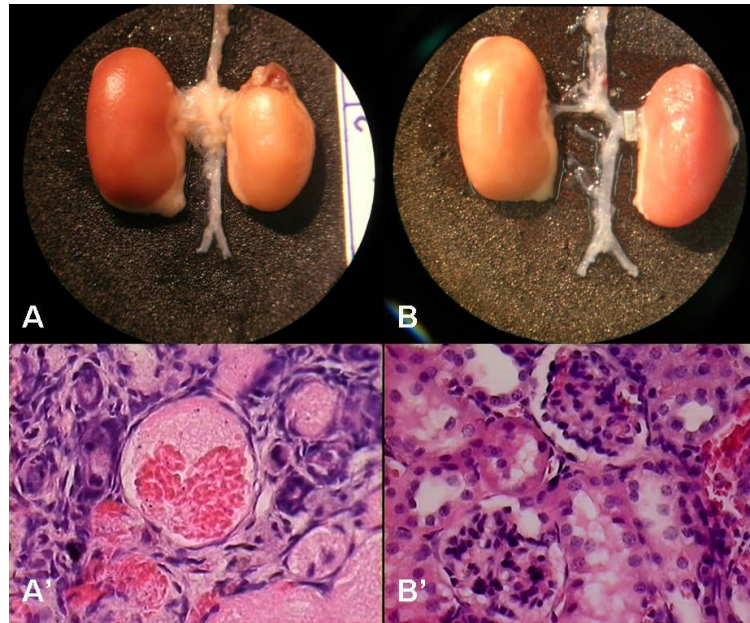


Figura 12. Figura A e B mostram os rins de um animal 2R1C e um 2R1C tratado com G-CSF, respectivamente. Na figura A' e B' vê-se a microscopia do rim clipado desses mesmos animais; em A', destaca-se a anucleação do glomérulo no limite de uma área de infarto com tecido renal remanescente. Coloração HE, 400x.

A quantificação da área de infarto renal (figura 13) mostra uma clara evidência protetora do G-CSF. Uma vez que a média da área infartada atingiu 54% do rim isquêmico (clipado) do grupo 2R1C, enquanto que o grupo 2R1C tratado apresentou uma média de infarto de apenas 14% da área total do rim clipado. Dos 7 animais analisados no grupo 2R1C veículo, apenas 2 não apresentaram áreas de infarto. Enquanto que dos 5 animais analisados no grupo 2R1C tratado com G-CSF, 4 não apresentaram áreas de infarto. Não houve diferenças entre os pesos dos animais que receberam o clipe de ambos os grupos, sendo que os experimentos foram realizados pareadamente (ver anexo).

Na figura 14, observam-se imagens microscópicas de infarto renal dos camundongos do grupo 2R1C veículo. Somente foi observado infiltrado celular no rim esquerdo de dois animais do grupo 2R1C tratado com G-CSF, conforme visto na figura 15.

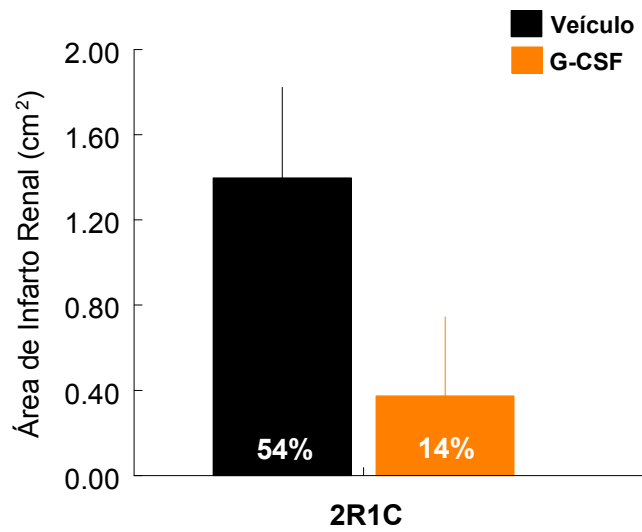


Figura 13. O gráfico mostra a média da área de infarto renal nos grupos 2R1C veículo (n = 7) e tratados com G-CSF (n = 5). O valor percentual se refere à área do rim clipado acometida pelo infarto.

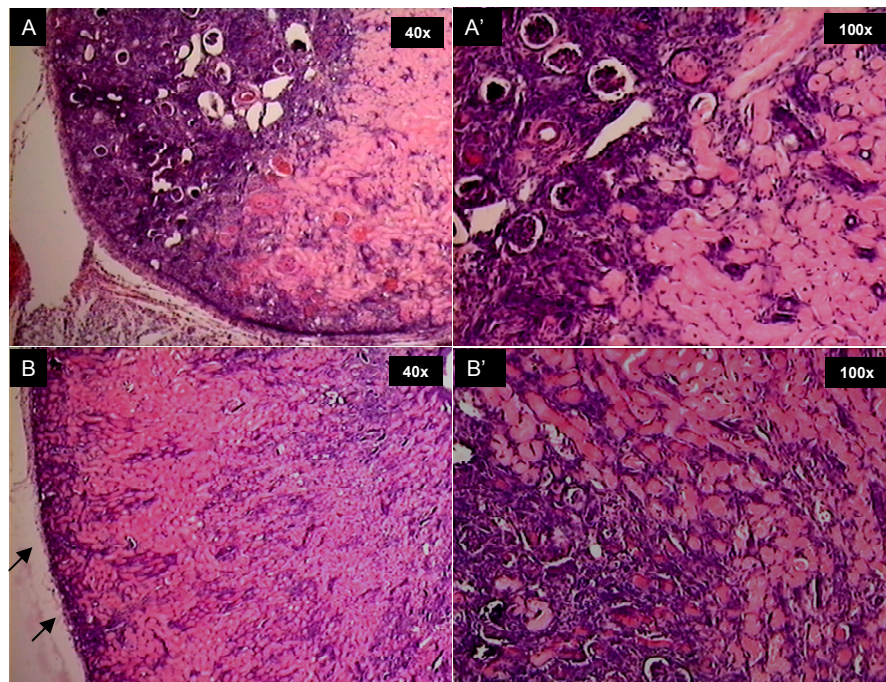


Figura 14. As imagens histológicas apresentadas são do rim isquêmico de dois animais do grupo 2R1C veículo. Nas figuras é possível visualizar com clareza a área de infarto (A e B), que aparece acidófila (rósea) com ausência de núcleos celulares. Em B, pode-se observar uma estreita faixa de tecido subcortical preservado (setas), que foi poupado pela circulação capsular colateral.

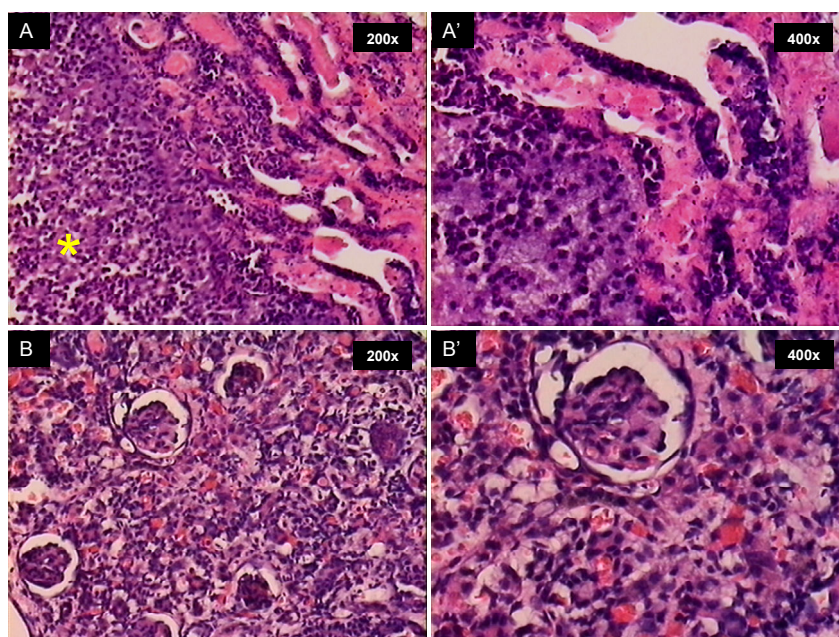


Figura 15. As imagens histológicas apresentadas são de dois camundongos do grupo 2R1C tratado com G-CSF. O asterisco na imagem A marca a região do cálice renal preenchido por células inflamatórias. A' destaca a região da medula em contato com cálice renal. Em B e B' uma região do córtex renal é apresentada com aumento da celularidade intersticial.

Discussão

Vários modelos animais têm sido utilizados na pesquisa sobre a fisiopatologia da hipertensão arterial. Tradicionalmente, as diferentes abordagens para mimetizar a hipertensão humana têm sido geradas em ratos ou animais de maior porte através da manipulação cirúrgica. Como exemplo, a hipertensão experimental Goldblatt 2R1C que guarda aspectos comuns à hipertensão renovascular encontrada em humanos. Os avanços recentes na tecnologia do DNA recombinante permitiram a criação de animais geneticamente modificados, nos quais as modificações de genes relacionados à hipertensão permitem o controle de certos hormônios ou receptores através de sua superexpressão ou inativação. Embora as técnicas de geração de transgênicos e *knockout* têm sido aplicadas em diferentes espécies, o camundongo apresenta uma maior taxa de sucesso, explicando assim, o desvio para sua maior utilização nas pesquisas (Shuldiner, 1996). O camundongo vem tornando-se o mais importante

modelo animal para o estudo das doenças cardiovasculares (Wiesel et al., 1997). Juntamente com o desenvolvimento das técnicas de biologia celular e molecular, surgem nos murinos novas abordagens terapêuticas, tais como o desenvolvimento de novos fármacos e a terapia celular.

O G-CSF é uma citocina hematopoiética que desempenha um importante papel na proliferação, diferenciação e sobrevivência da célula progenitora mielóide (Metcalf, 1991). G-CSF também causa um marcado aumento na mobilização de células tronco hematopoiética para circulação sanguínea periférica (Avalos, 1996; Link 2000). Recentemente, estudos vêm demonstrando o efeito protetor renal do G-CSF em modelos murinos de isquemia/reperfusão (Nishida & Hamaoka, 2006; Xie et al., 2006; Li et al., 2008). No entanto, ainda não se encontra na literatura o uso do G-CSF no modelo de hipertensão renovascular 2R1C, que promove isquemia parcial do rim clipado.

Johns et al. (1996) descreveram primeiramente a produção de diferentes modelos de hipertensão em camundongos. Dentre os quais, destaca-se o modelo de hipertensão renovascular 2R1C. Em camundongos, esse modelo também depende da ativação contínua do SRA. Como observado no estudo desenvolvido por Wiesel et al. (1997), a concentração da renina plasmática e a expressão renal do mRNA para renina estavam aumentados quatro semanas após a clipagem da artéria renal de camundongos C57BL/6. Hiyoshi et al. (2005) demonstraram em camundongos o aumento da concentração plasmática de renina no sétimo dia após a clipagem, com pico entre 14 e 28 dias, e o retorno para os níveis normais em 42 dias. Os níveis pressóricos acompanham as concentrações de renina. De modo que camundongos C57 pesando em torno de 20 g, quando submetidos à cirurgia 2R1C (com abertura do clipe de 0,12 mm), tiveram aumento da pressão sanguínea de aproximadamente 20 mm Hg duas semanas após a cirurgia, sem aumento adicional após quatro semanas (Wiesel et al., 1997). Outra maneira de promover a hipertensão arterial através da Ang II é através da infusão por microbombas osmóticas (*minipumps*) implantados subcutaneamente. Weiss et al. (2001), descrevem elevação da pressão nos camundongos C57BL/6 e ApoE^{-/-} maior do que 50 mm Hg em 4 semanas. Isso provavelmente por ser uma dosagem de Ang II (7 mg/kg/d) muito acima da produzida

pela hipertensão 2R1C. Sendo, portanto, o modelo 2R1C mais próximo da realidade fisiopatológica da hipertensão renovascular. Há ainda diferenças no metabolismo da Ang II entre ratos e camundongos. De modo que diferenças nos peptídeos circulantes, na regulação do receptor para Ang II, e reatividade vascular contribuem para a diminuição da resposta a infusão de Ang II em camundongos quando comparado com ratos (Cassis et al., 2004). Assim, doses maiores de Ang II podem ser requeridas para eliciar os mesmos níveis de efeitos em camundongos.

O estágio final de lesão em órgãos alvo no modelo 2R1C depende do tamanho e tempo de clipagem, e usualmente induz disfunção endotelial, hipertrofia cardíaca (aumento de 20 a 50% no tamanho do coração), e hipertrofia do rim contralateral exposto à hipertensão (Akabane et al., 1985; Pinto et al., 1998). Baseado no estudo de Wiesel et al. (1997), estudos prévios do nosso laboratório também demonstraram o desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica, taquicardia, hipertrofia cardíaca e disfunção endotelial em camundongos C57, após 28 dias de implantação do clipe na artéria renal (Arruda et al., 2005; Nogueira et al., 2007; Peotta, 2007). No presente trabalho também se utilizou da implantação de cliques de aço inox calibrado (0,12 mm) na artéria renal esquerda de camundongos C57, pesando em torno de 23 g. Após 14 dias de implantação do clipe os animais apresentaram: HAS, taquicardia e hipertrofia cardíaca. A redução do peso corporal e a hipertrofia do rim contralateral foram outros indicativos do sucesso para o surgimento da HAS no camundongo 2R1C. Outro estudo do nosso grupo de pesquisa utilizou o mesmo tempo de cirurgia e encontrou HAS, mas sem o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca (Gava et al., 2008).

O coração apresentou aumento do peso ventricular seco nos grupos hipertensos, sem haver diferença estatística entre eles. O índice cardíaco seguiu o mesmo padrão do valor absoluto de peso ventricular. Esse resultado corrobora outros estudos envolvendo o modelo 2R1C no camundongo (Wiesel et al. 1997). A hipertrofia cardíaca pode ser causada tanto pela sobrecarga mecânica imposta pelo aumento da resistência vascular periférica, quanto pelos níveis de Ang II. Mesmo com níveis mais baixos de pressão arterial em relação ao grupo 2R1C veículo, os camundongos do grupo 2R1C tratados com G-CSF poderiam manter a hipertrofia pelos níveis elevados de Ang II. Isto porque o aumento dos níveis locais de Ang II poderia levar a hipertrofia cardíaca sem

que necessariamente ocorresse aumento da pressão arterial (Mazzolai et al., 1998). Essa hipertrofia ocorreria por ação direta da Ang II no receptor AT_{1a} de miócitos cardíacos e fibroblastos (Murat et al., 2000).

Além do coração, o modelo 2R1C também se mostrou eficiente na hipertrofia do rim contralateral (rim direito) para compensar a redução da massa renal do rim clipado. Interessantemente, a administração do G-CSF no grupo 2R1C reduziu a desproporção entre o rim direito e esquerdo. Isso pode ser visto na relação rim clipado/ rim contralateral. Essa relação revela-se em torno de 1 nos grupos *sham*, visto que o peso do rim direito é similar a do rim esquerdo. Porém, a desproporção provocada pela inserção do clipe na artéria renal, tende a reduzir o valor da relação devido ao menor tamanho do rim clipado que foi o numerador da relação. A provável explicação para uma menor desproporção entre os rins no grupo 2R1C tratado, deve-se provavelmente ao papel protetor do G-CSF contra a isquemia. Isto seria principalmente pela conhecida ação anti-apoptótica desempenhada pelo G-CSF (Spandou et al., 2006; Xie et al., 2006; Li et al., 2008). Essa ação também foi refletida na área de infarto apresentada pelo rim isquêmico, a qual será discutida mais adiante. O peso úmido das glândulas supra-renais também estava aumentado no camundongo 2R1C veículo e reduzido quando administrado G-CSF nos animais hipertensos. Provavelmente ocorreu hipertrofia da camada glomerulosa, devido às altas concentrações de Ang II, levando ao provável aumento na produção de aldosterona no grupo 2R1C veículo. Contudo, faz-se necessário um estudo morfométrico mais detalhado sobre as camadas da glândula suprarrenal, visto o diminuto peso das mesmas, aumentando a possibilidade de falsos resultados.

O aumento da frequência cardíaca é um dos efeitos clássicos da hipertensão renovascular 2R1C, que também ocorre no camundongo (Just et al., 2000). Essa ocorre pela elevação da concentração de Ang II circulante, a qual atua em diferentes áreas do sistema nervoso central, determinando aumento do tono simpático cardíaco (Navar et al., 1998). A potenciação do efeito simpático também ocorre ao nível vascular e da medula adrenal. No terminal simpático a Ang II estimula a síntese de norepinefrina, potencia sua liberação pelo estímulo neural e bloqueia a recaptção neuronal, efeitos estes que aumentam a resposta simpática (Heeneman et al., 1997). No presente estudo

não houve diferença nos valores de frequência cardíaca quando os animais *sham* foram tratados com G-CSF. Mostrando que o G-CSF não influenciou no controle da mesma. Houve taquicardia nos camundongos do grupo 2R1C veículo e tratado com G-CSF em relação aos grupos controles. O G-CSF não alterou a frequência cardíaca dos camundongos com hipertensão 2R1C.

A administração do G-CSF por 14 dias não alterou a pressão dos camundongos machos submetidos à cirurgia fictícia (*sham*). No entanto, o uso do G-CSF na dose de 100 µg/kg/dia *s.c.*, por 14 dias, impediu a maior elevação da pressão arterial nos camundongos clipados. Houve diferença de cerca de 20 mm Hg entre a PAM do grupo 2R1C veículo e tratado com G-CSF; a média de PAM no grupo 2R1C veículo foi de 150 ± 5 mm Hg, contra 127 ± 2 mm Hg no grupo 2R1C tratado com G-CSF. A PAS e a PAD seguiram o mesmo padrão da PAM, mostrando que não houve interferência nos componentes isolados devido o uso do G-CSF.

Cabe questionar como o G-CSF poderia ter interferido na elevação da pressão arterial no modelo 2R1C. Recentemente, foi demonstrado que a ação protetora do G-CSF contra a lesão renal por isquemia/reperfusão em camundongos C57, parece estar associada com seu efeito anti-apoptótico, mediado por *up-regulation* da via de sinalização PI3K/Akt (Li et al., 2008). Provavelmente, uma menor lesão renal acarretou numa menor liberação de renina para a circulação sistêmica, impedido assim uma maior formação de Ang II. Uma outra provável explicação seria o *down-regulation* do receptor AT₁ pelo G-CSF. O estudo de Li et al. (2006) demonstrou através da técnica de *Western blotting* e imunohistoquímica *in situ*, que no miocárdio de camundongos C57 submetidos à ligadura da coronária ocorre redução do receptor AT₁ com a administração do G-CSF.

As dosagens das angiotensinas plasmáticas poderia ajudar a esclarecer nossos resultados. As concentrações plasmáticas de Ang I, II e 1-7 foram mensuradas nos diferentes grupos experimentais. Não houve diferença nas concentrações plasmáticas entre os dois grupos *sham*, de forma que o G-CSF parece não ter influenciado o SRA dos animais normotensos. Ao final dos 14 dias após a cirurgia, foram encontrados níveis quase dobrados de Ang I e 1-7 nos animais 2R1C veículo quando comparados com grupo *sham* veículo. As concentrações plasmáticas de Ang II estavam 4 vezes

mais elevadas após 14 dias de implantação do clipe na artéria renal dos camundongos C57. Indiretamente esses dados corroboram o estudo de Wiesel et al. (1997), no qual as concentrações de renina plasmática estavam três vezes acima do normal aos 28 dias de hipertensão 2R1C. Isso também ocorreu no estudo de Hiyoshi et al. (2005), que descrevem o pico de renina plasmática em camundongos C57 2R1C entre 14 e 28 dias. Quando os animais 2R1C foram tratados com G-CSF houve alterações nas concentrações desses peptídeos. Os níveis de Ang I e Ang 1-7 se igualaram aos dos grupos *sham*, enquanto que a concentração de Ang II ainda permaneceu alta. O *down-regulation* do receptor AT₁ poderia explicar a manutenção dos níveis elevados de Ang II circulantes, com redução da resistência vascular periférica pela menor expressão de AT₁. Mesmo com a provável redução do receptor AT₁ houve o aumento do componente simpático, indiretamente visto pela taquicardia. Caso outras vias de formação de Ang II pudessem estar envolvidas, ou mesmo a via da ECA, isto deve ter ocorrido em um tempo inicial, visto que neste momento o substrato (Ang I) está com valor semelhante ao dos animais *sham*. Outra possibilidade seria o aumento dos níveis plasmáticos de angiotensinogênio e a conversão direta na Ang II, por via catepsina G, calicreína, tripsina, ou fator ativador do plasminogênio tecidual (Kobori et al., 2007).

A maioria das ações da Ang II ocorre via receptores AT₁ que possuem uma ampla distribuição, como nas células musculares lisas, miocárdio, pulmões cérebro, rins, fígado e glândulas adrenais (Timmermans et al., 1993). As ações da Ang II podem ser evidenciadas claramente pelo bloqueio do receptor AT₁ ou pela inibição da atividade da ECA (Kowala et al., 1994; Keidar et al., 1997; Makaritsis et al., 1998). A ativação dos receptores AT₁ poderia, dependendo do tipo celular, levar a contração celular, hipertrofia, proliferação ou apoptose (Griendling et al., 1993). Apesar dos efeitos da Ang 1-7 e do receptor AT₂ na contraposição dos efeitos da Ang II, o NO (óxido nítrico) liberado pelo endotélio ainda é considerado como o principal opositor aos efeitos da Ang II (Millatt et al., 1999). A estimulação pela Ang II resulta na produção de espécies reativas de oxigênio na parede arterial que levam ao aumento da expressão de genes pro-inflamatórios e diminuição da biodisponibilidade do NO (Griendling et al., 1997). Por via da Ang II ocorre o aumento na produção de radicais livres derivados do oxigênio pela ativação da NADH/NADPH oxidase, o qual é o principal componente dessa via

metabólica em células endoteliais, musculares lisas e fibroblastos da adventícia (Griendling et al., 1994; Laursen et al., 1997). A Ang II também aumenta a expressão de MCP-1 em aorta de modelos de hipertensão e em cultura de células musculares lisas vasculares (Capers et al., 1997; Chen et al., 1998), além de aumentar a expressão de moléculas de adesão como ICMA-1 e VCAM-1, através do estresse oxidativo (Chien et al., 1998). Esses efeitos da Ang II estariam diretamente relacionados à disfunção endotelial.

A ligação da Ang II com receptor AT_1 promove a internalização do complexo hormônio-receptor, isto faz parte do rápido *down-regulation* ou desensibilização que é comum à maioria dos receptores ligados a proteína G. Isso não ocorre quando antagonistas como os ARBs ligam-se ao AT_1 . O receptor AT_2 não é internalizado ou ocorre *down-regulation* agudamente pela ligação de Ang II ou drogas (Izzo & Black, 2003).

A Ang II via receptor AT_1 acoplado a proteína G ativa as fosfolipases C, A_2 e D. Entre as quinases que estão próximas ao AT_1 , podemos citar a família da Src, Jak e STAT; no final da cascata de quinases, encontramos a família da MAPK, MEK e ERK que alteram proteínas, como o fator nuclear kB que interage com elementos que regulam a transcrição gênica (Izzo & Black, 2003). O G-CSF ativa uma variedade de cascatas de sinalização intracelular, como a *Janus kinase* (Jak), STAT, MAP *kinase*, a família de cinases da Src (Avalos, 1996). A via Jak2-STAT3 também parece ter grande influência na inibição da apoptose de cardiomiócitos (Takano et al., 2006). Uma outra importante via já descrita anteriormente de proteção causada pelo G-CSF é a via PI3K/Akt de sinalização para sobrevivência celular (Dong & Lerner, 2000). O G-CSF também exerce efeitos antiinflamatórios, atenuando a liberação de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 (Boneberg et al., 2000; Bauhofer et al., 2002).

Estudos vêm demonstrando a ação anti-apoptótica do G-CSF mediada pela via PI3K/Akt em diferentes órgãos com lesão isquêmica (Fujio et al., 2000; Matsui et al., 2001; Shibata et al., 2002; Xie et al., 2006; Ueda et al., 2006). Recentemente, foi demonstrada essa ação citoprotetora do G-CSF pela via PI3K/Akt para lesão renal por isquemia/reperfusão em camundongos C57 (Li et al., 2008).

Os rins constituem locais preferidos para o desenvolvimento de infartos, visto que um quarto do débito cardíaco passa através destes órgãos, além de ser um importante alvo para êmbolos, bem como para o desenvolvimento de lesões ateromatosas em sua artéria nutridora. O infarto renal geralmente cursa com necrose coagulativa, havendo perda de núcleos, aglomeração do citoplasma e aumento da eosinofilia celular, mas com preservação dos contornos básicos da arquitetura glomerular e tubular. O aumento da eosinofilia é atribuível à perda da basofilia normal conferida pelo RNA do citoplasma e à maior ligação da eosina às proteínas intracitoplasmáticas desnaturadas. A acidose intracelular desnatura não só as proteínas estruturais, como também as proteínas enzimáticas, bloqueando assim a proteólise da célula. O núcleo desaparece em aproximadamente um ou dois dias com a necrose. O contorno básico da célula coagulada permanece por um período mínimo de alguns dias, podendo persistir por semanas. A necrose coagulativa, com preservação da arquitetura tecidual geral, é típica da morte hipóxica das células em todos os tecidos, exceto o cérebro (Cotran et al., 2000).

Os grandes infartos de um único rim, assim como observado em nosso estudo, constituem uma base bem conhecida para hipertensão (Izzo & Black, 2003). Experimentalmente em camundongos C57 de 20 g, foi observado que cliques com a abertura de 0,11 mm induzem um alto percentual de infarto renal, enquanto cliques com 0,13 mm de abertura não produzem hipertensão (Wiesel et al., 1997). No presente estudo, utilizou-se cliques com 0,12 mm de abertura na artéria renal de camundongos C57 pesando em média 23 g. Essa escolha foi embasada no trabalho de Wiesel et al. (1997) e em estudos prévios do nosso laboratório (Arruda et al., 2005; Nogueira et al., 2007; Peotta, 2007). Macroscopicamente, observou-se a atrofia do rim clipado e hipertrofia do rim contralateral no grupo 2R1C veículo. Interessantemente, no grupo 2R1C tratado com G-CSF notou-se uma menor atrofia do rim clipado e coloração semelhante ao rim controle, indicando uma boa perfusão sanguínea. Isso foi comprovado pela relação rim clipado/ rim contralateral já descrita anteriormente. Na análise histológica, foi observado maior média da área de infarto renal no grupo 2R1C veículo. Essa área correspondeu a 54% da área total do rim clipado, enquanto que no grupo 2R1C tratado com G-CSF a área de infarto abrangeu apenas 14% do rim clipado.

Mas, cabe ressaltar que esses são valores médios. Dos 7 animais 2R1C veículo analisados, apenas 2 não apresentaram área de infarto. Em contraste, dos 5 animais analisados do grupo hipertenso tratado, 4 não apresentaram área de infarto e somente um animal apresentou área isquêmica, a qual por ser de grande dimensão poderia ter sido devido a um dobramento da artéria sobre o clipe. Também é importante mencionar que ambos os grupos clipados partiram da mesma média de peso corporal (veículo = $23,6 \pm 0,2$ g; tratado = $23,6 \pm 0,2$ g). Esse resultado corrobora outros estudos que mostram a ação citoprotetora do G-CSF contra a isquemia em diferentes tecidos (Nishida & Hamaoka, 2006; Takano et al., 2006; Toth et al., 2008). Tal fato pode ser explicado pela ação anti-apoptótica, mitogênica, de sobrevivência e proliferação celular desencadeada pelo G-CSF nas células renais (Xie et al., 2006; Li et al., 2008). O G-CSF também possui efeito sobre a mobilização de células da medula óssea, como as células tronco hematopoiéticas, o que poderia acelerar a recuperação renal e a formação de novos vasos (Nishida & Hamaoka, 2006; Akihama et al., 2007).

Ryan et al. (1995), demonstraram através de imagem por ressonância magnética da medula óssea e biópsia de crianças, a mudança do tecido adiposo para tecido hematopoiético com uso do G-CSF. Atualmente, sabe-se que o G-CSF é capaz de mobilizar tanto células hematopoiéticas quanto não-hematopoiéticas (Takahashi et al., 1999; Nishida & Hamaoka, 2006). Orlic et al. (2001b), demonstraram que o G-CSF é capaz de mobilizar células da medula óssea para o coração isquêmico, facilitando tanto o reparo da área infartada como também melhorando a função e o trabalho cardíaco. As células tronco hematopoiéticas e as EPCs são derivadas de um precursor comum denominado hemangioblasto, e podem ser encontradas não somente na medula óssea, mas também no baço e sangue periférico. Desse modo, parece que as EPCs desempenham um importante papel na regeneração tecidual do sistema cardiovascular (Asahara et al., 1997, 2004). Recentemente, Ohtsuka et al. (2004) avaliaram o uso isolado do G-CSF no miocárdio, encontrando melhora do remodelamento ventricular e das funções cardíacas através da neovascularização.

O endotélio renal também é um sítio de lesão em pacientes hipertensos, onde o aumento do estresse oxidativo diminui a biodisponibilidade do NO (Zoccali, 2007). Estudos também têm demonstrado que a lesão endotelial precede a injúria tubular,

sendo a primeira causa de disfunção renal na insuficiência renal aguda por lesão devido à isquemia/reperfusão (Kakoki et al., 2000; Brodsky et al., 2002). O estresse oxidativo também é importante na fisiopatologia desse tipo de lesão (Lameire & Vanholder, 2004; Masztalerz et al., 2006). Além disso, Akihama et al. (2007) demonstram que o G-CSF facilita a regeneração das células endoteliais, mas não de células tubulares, em camundongos submetidos à lesão renal por isquemia/reperfusão, através do recrutamento de células derivadas de medula óssea para o endotélio.

Não é simples determinar o quanto as células recrutadas contribuíram nesse processo. No entanto, Stokman et al. (2005) utilizaram à terapia conjunta de SCF/G-CSF em camundongos C57 irradiados que receberam transplante celular de camundongos eGFP (Okabe et al., 1997), observando baixa taxa de transdiferenciação de células tronco no rim e acreditando que a melhora na recuperação da função renal seja por alteração da cinética inflamatória causada pelas citocinas, apesar da piora do influxo de granulócitos renal. Fukuhara et al. (2005), através do uso de células provenientes de camundongos eGFP, também mostraram que a quantidade destas células no coração infartado de camundongos C57 era pequena, quando comparada com outras células locais, para justificar a regeneração de cardiomiócitos após o uso de G-CSF (200 µg/kg/dia, 8 dias).

A utilização do G-CSF em lesões isquêmicas tem demonstrado bons resultados. Entretanto, devido ao fato das lesões isquêmicas ocorrerem geralmente por complicações na placa de ateroma, o estudo do efeito do G-CSF na doença aterosclerótica torna-se imprescindível. Hasegawa et al. (2006), demonstram em coelhos Watanabe hiperlipidêmicos a melhora do grau de estenose em coronárias, com diminuição da área de placa na aorta torácica e aumento da taxa de reendotelização. No entanto, uma tentativa de uso preventivo do G-CSF pode ser agravante, uma vez que estudos mostram que a administração do G-CSF em camundongos ApoE^{-/-} agravam a formação de placas ateromatosas (Haghighat et al., 2007).

A literatura envolvendo os benefícios do G-CSF na lesão renal é recente, possuindo pontos divergentes entre alguns estudos, tais como a dose administrada e o modelo de lesão renal induzida através de isquemia ou substâncias tóxicas. Apesar da maioria dos estudos terem observado os efeitos benéficos do uso do G-CSF na lesão

renal, Tögel et al. (2004) criticam o recrutamento celular acompanhado de granulocitose. Nesse estudo, a alta dose de G-CSF administrada foi associada com agravamento da falência renal e mortalidade dos camundongos submetidos à lesão por isquemia/reperfusão. Os camundongos neutropênicos com a mesma lesão isquêmica renal, desenvolveram insuficiência renal branda. E por outro lado, nos camundongos controles, a administração do G-CSF não exerceu qualquer efeito renal. Em nosso estudo somente foi encontrado infiltrado de granulócitos no rim clipado de 2 em 5 animais do grupo tratado com G-CSF.

Em estudos que utilizaram a cisplatina para promover lesão renal aguda em camundongos, não houve granulocitose com uso do G-CSF, provavelmente pelo efeito mielosupressor deste quimioterápico (Nishida et al., 2004; Iwasaki et al., 2005). Também há relato de piora da função renal em pacientes transplantados que receberam G-CSF (Minguez et al., 1995). O aumento de neutrófilos poderia ser fonte para o aumento de espécies reativas de oxigênio, levando a piora da função renal (Nishida & Hamaoka, 2006). Também, poderia haver aumento da expressão renal de SDF-1 após lesão isquêmica, mas apesar deste fator poder induzir a leucocitose, ele atrai EPC's e células tronco hematopoiéticas para o local que podem desempenhar efeitos renoprotetores (Tögel et al., 2005). Talvez o tempo de ativação, a concentração e interação das diferentes citocinas sejam a resposta chave para o efeito pleno de reparação.

A falência renal aguda é um grande problema clínico que afeta mais de 5% de todos os pacientes hospitalizados (Alkhunaizi & Schrier, 1999). Sua principal causa é a necrose tubular como consequência da lesão isquêmica após episódios de hipotensão ou clampeamento vascular cirúrgico. Além disso, o transplante renal está sempre associado a algum grau de lesão por isquemia/reperfusão (Stokman et al., 2005).

No presente estudo, a análise da função renal foi realizada através das concentrações plasmática e urinária de creatinina, bem como a proteinúria. Não encontramos significância estatística entre os volumes urinários de 24 horas, mas o volume de urina nos diferentes grupos hipertensos tendeu a ser maior do que nos grupos normotensos. Apesar de não haver diferenças estatísticas na concentração da creatinina urinária e plasmática entre os diferentes grupos, observa-se o

direcionamento para elevação destas concentrações nos grupos tratados com G-CSF. No entanto, o número de animais utilizado para esse protocolo foi pequeno, com aumento no desvio da amostra, com conseqüente prejuízo da análise. O *clearance* de creatinina aponta para o aumento nos grupos 2R1C, provavelmente pelo aumento taxa de filtração promovida pela hipertensão, mas o desvio padrão entre os animais também foi relativamente alto, prejudicando o aparecimento de diferença significativa entre os grupos. Também não houve diferença nas concentrações de proteínas urinárias entre os diferentes grupos. Níveis de creatinina semelhantes aos dos camundongos C57 do grupo *sham* veículo, podem ser vistos no trabalho de Li et al. (2008), que não encontraram alterações após o uso do G-CSF (10 µg/kg/dia) durante 7 dias.

Uma dose menor de G-CSF talvez mantivesse o efeito protetor renal sem alterar as funções renais. Visto que doses pequenas (10 µg/kg/dia, s.c.) de G-CSF são capazes de ativar a via da PI3K/Akt em camundongos C57 submetidos à lesão renal por isquemia/reperfusão (Li et al., 2008), impedindo a apoptose, com aumento da expressão de Bcl-2 e diminuição da Bax. Também já foi demonstrado que a inibição da via PI3K/Akt pelo wortmannin impede o desencadeamento dos efeitos benéficos do G-CSF (Li et al., 2008). No estudo de Akihama et al. (2007), com o uso do G-CSF na dose igual à usada por nós (100 µg/kg/dia s.c.) porém por 7 dias consecutivos, não houve alteração dos níveis plasmáticos de creatinina em camundongos, o que poderia ser diferente se o tratamento fosse mais prolongado.

A dose de G-CSF (Filgrastim®) recomendada para humanos que receberam transplante de medula óssea é de 10 µg/kg/dia *i.v.* ou *s.c.*, e de 5 µg/kg/dia para os pacientes com neutropenia secundária induzida por quimioterápicos. Em geral o tempo de tratamento é de 14 dias, podendo variar, e a administração de doses de até 70 µg/kg/dia geralmente são eficazes e bem toleradas.

A interação entre diferentes citocinas também deve ser avaliada para o processo de reparação. Como exemplo, Orlic et al. (2001b) utilizaram G-CSF (100 µg/kg/dia) combinado com SCF (200 µg/kg/dia) para melhora do infarto no miocárdio, mas o uso do G-CSF isoladamente após o infarto não foi avaliado naquele estudo. A combinação do G-CSF com EPO ou HGF talvez seja interessante, por suas ações apresentadas, ou

mesmo a combinação com fármacos, tais como o inibidor de renina (alisquireno) ou *ARBs*.

No presente estudo, a eficácia da administração do G-CSF foi realizada através da contagem dos leucócitos circulantes e da esplenomegalia. Em camundongos, o baço apresenta-se como um importante órgão que desempenha funções hematopoiéticas. Em nosso estudo, foi observado aumento significativo do baço no grupo *sham* tratado com G-CSF em relação aos grupos que receberam veículo. A esplenomegalia foi ainda maior no grupo 2R1C tratado com G-CSF, sendo significativo até mesmo em relação ao *sham* G-CSF. Isto mostra que há efeito aditivo entre os níveis elevados de Ang II e o G-CSF. A contagem de células da fração mononuclear desse órgão revelou uma tendência ao aumento no grupo *sham* G-CSF, mas no grupo hipertenso que recebeu G-CSF houve um aumento acentuado desta fração. A contagem de células da fração mononuclear de medula óssea mostrou aumento do número de células nos grupos que receberam G-CSF em relação aos grupos controles. Entre eles não houve diferença significativa, mas no grupo *sham* G-CSF observou-se uma maior quantidade de células na medula óssea, de forma que a Ang II poderia ter acentuado a mobilização de células para a circulação periférica, ou a taxa de diferenciação assimétrica. Corroborando essa idéia, foi encontrado um maior número de leucócitos circulantes no grupo 2R1C G-CSF em relação a todos os demais grupos. Interessante, foi a observação de maior número de leucócitos e hemácias circulantes no grupo 2R1C veículo em relação ao seu respectivo controle. Isso se deveria ao provável efeito da Ang II sobre a produção celular nos órgãos hematopoiéticos. A Ang II parece estimular a proliferação de células progenitoras hematopoiéticas e a diferenciação eritróide através do receptor AT₁, de modo que o uso de *ARBs* aboliria completamente esta resposta. Também, a Ang II estimularia a produção de eritropoietina *in vitro* e em pacientes saudáveis (Mrug et al., 1997; Freudenthaler et al., 1999) e a falta desta causaria anemia em camundongos *knock-out* para ECA (Cole et al., 2000). Receptores AT₁ também são expressos em células tronco hematopoiéticas CD34⁺ humanas. (Haznedaroglu & Öztürk, 2003).

No presente estudo, constatamos a eficácia do G-CSF no recrutamento de neutrófilos nos dois grupos tratados, além de observarmos a tendência de aumento do número de neutrófilos no grupo 2R1C que recebeu veículo. Nos camundongos do grupo

sham que recebeu veículo ocorreu um maior percentual (80%) de linfócitos circulantes em relação ao número de neutrófilos (15%). O estudo de Gagnon & Ansari (1990) corroboram essa proporção celular encontrada nos camundongos C57 *Sham*. Com o uso do G-CSF ocorreu uma equivalência nessa proporção, de modo que houve elevação do percentual de neutrófilos e, conseqüentemente, redução do percentual de linfócitos, apesar do aumento do número de linfócitos nos grupos tratados. Fato esse, também descrito por Tögel et al. (2004). No estudo de Akihama et al. (2007) a contagem de leucócitos no sangue periférico de camundongos foi realizada diariamente após a aplicação de G-CSF (100 µg/kg/dia, *i.p.*) durante 7 dias, sendo encontrado aumento significativo a partir do 3º dia e pico no 7º dia ($32,8 \pm 14,6 \times 10^3 / \mu\text{L}$).

Outro achado curioso em nosso estudo, foi a tendência a redução plaquetária nos grupos hipertensos. Cabe ressaltar que receptores AT₁ foram encontrados nas plaquetas (Crabos et al., 1993) e que níveis plaquetários de RNAm para AT₁ foram inversamente correlacionados com os níveis plasmáticos de Ang II em pacientes hipertensos (Haznedaroglu & Öztürk, 2003).

Estudos revelaram que o uso de ACEIs está associado com anemia e leucopenia, levando ao surgimento da hipótese da existência de um SRA local na medula óssea capaz de afetar o crescimento, proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas (Haznedaroglu & Öztürk, 2003). A ECA também foi localizada no endotélio e em células inflamatórias (Dzau et al., 2001) e ela poderia ser um marcador de células tronco hematopoiéticas (Jokubaitis et al., 2007). A elevação dos níveis da ECA em pacientes com leucemia aguda, sugere que a ECA possa ser produzida em altas quantidades nas células leucêmicas provenientes da medula óssea. Macrófagos/monócitos de ratos também expressam renina e seus leucócitos também podem sintetizar e liberar angiotensinogênio, embora a produção de angiotensinogênio não tenha sido comprovada em leucócitos humanos (Haznedaroglu & Öztürk, 2003). O angiotensinogênio pode ser convertido diretamente em Ang II por vias alternativas, como através da ação da catepsina G (Kobori et al, 2007), a qual também está presente em monócitos e tem sido demonstrada na medula óssea (Haznedaroglu & Öztürk, 2003). Em cultura, foi demonstrado que a aldosterona inibe o desenvolvimento de EPCs derivadas da fração mononuclear de medula óssea (Marumo et al., 2006). Em culturas

provenientes de células tronco CD34⁺, foi observado a expressão de receptor para aldosterona nestas células, que sobre o efeito da aldosterona promoveu o aumento na formação de colônias de granulócitos-macrófagos e a diminuição do número de colônias eritróides, enquanto que os glicocorticóides desempenham efeito oposto (Grafte-Faure et al., 1999). No rim, o bloqueio do receptor AT₁ preserva células semelhantes às células tronco adulta em camundongos C57 com obstrução do ureter (Marumo et al., 2007).

Embora o mecanismo que envolve o SRA seja complexo, a compreensão sobre as diferentes citocinas e suas influências sobre este sistema, como foi o propósito deste estudo, poderá prover soluções terapêuticas para hipertensão em futuro próximo. No presente estudo, o G-CSF se mostrou altamente capaz de prevenir o infarto renal nos camundongo 2R1C e, conseqüente, atenuou a elevação de pressão arterial, apesar do aumento da creatinina urinária, a qual terá de ser investigada em futuros experimentos.

Conclusão

A promoção da hipertensão renovascular 2R1C se mostrou altamente eficiente no camundongo C57, de modo que 14 dias após a implantação do clipe na artéria renal esquerda, os animais apresentaram perda de peso, altos níveis de pressão sanguínea, hipertrofia cardíaca, atrofia do rim clipado e hipertrofia do rim contralateral.

Podemos constatar a interferência do SRA, provavelmente pelas altas concentrações de Ang II encontradas, na produção de células sanguíneas. Houve aumento no percentual de neutrófilos circulantes e eritropoese nos camundongos com hipertensão renovascular 2R1C.

Comprovamos a eficácia na administração do G-CSF através do aumento do número de leucócitos, principalmente neutrófilos, e da esplenomegalia nos grupos tratados. A alta concentração de Ang II associada ao G-CSF, provavelmente proporcionou efeitos aditivos sobre recrutamento de células nucleadas circulantes. Uma vez que a contagem total dos leucócitos circulantes foi maior no grupo 2R1C tratado em relação ao controle tratado.

A administração de 100 µg/kg/dia do G-CSF, por 14 dias, não alterou os níveis pressóricos dos camundongos normotensos. Porém sua aplicação a partir do dia da implantação do clipe impediu a maior elevação de pressão arterial sistêmica nos camundongos 2R1C.

O uso do G-CSF no grupo 2R1C impediu a maior atrofia do rim isquêmico, o que foi melhor revelado pela relação rim clipado/ rim contralateral. Isso também pode ser relacionado com a prevenção do infarto renal no rim isquêmico dos camundongos tratados.

A análise da função renal revelou um direcionamento para uma leve piora da função renal dos animais tratados com G-CSF, mas sem haver diferenças estatísticas em qualquer dos parâmetros analisados, o que deve ser melhor investigado futuramente.

O principal achado deste estudo foi o surpreendente efeito protetor do G-CSF contra a isquemia renal, com a prevenção da formação de infarto no rim clipado e a atenuação da elevação da pressão arterial sistêmica em camundongos com hipertensão 2R1C.

Akabane S, Natsume T, Matsushima Y, Deguchi F, Kuramochi M, Ito K (1985). Alterations in renal Na⁺K⁺ATPase activity and [3H]ouabain binding in Goldblatt hypertensive rabbits. *J Hypertens*, 3: 469-474.

Akihama S, Sato K, Satoh S, Tsuchiya N, Kato T, Komatsuda A, Hirokawa M, Sawada K, Nanjo H, Habuchi T (2007). Bone marrow-derived cells mobilized by granulocyte-colony stimulating factor facilitate vascular regeneration in mouse kidney after ischemia/reperfusion injury. *Tohoku J Exp Med*, 213: 341-349.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2004). *Biologia molecular da célula*. Editora: Artmed. Porto Alegre; 4ª Ed.: 881-882.

Alkhunaizi AM, Schrier RW (1999). Management of acute renal failure: New perspectives. *Am J Kidney Dis*, 28: 315-328.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275:965-967.

Asahara T, Kawamoto (2004). Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C572-C579.

Arruda RMP, Peotta VA, Meyrelles SS, Vasquez EC (2005). Evaluation of vascular function in apolipoprotein E knockout mice with angiotensin-dependent renovascular hypertension. *Hypertension*; 46(part 2): 932-936.

Avalos BR (1996). Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood*, 88: 761-777.

Bauhofer A, Stinner B, Kohlert F, Reckzeh B, Lorenz W, Celik I (2002). Granulocyte colony-stimulating factor but not peritoneal lavage increases survival rate after experimental abdominal contamination and infection. *Br J Surg*, 89: 1457-14-64.

Berend K, Levi M (2008). Is it time to celebrate a century of blood pressure management? *Nephrol Dial Transplant*, 0: 1-4.

Boneberg EM, Hareng L, Gantner F, Wendel A, Hartung T (2000). Human monocytes express functional receptors for granulocyte colony-stimulating factor that mediate suppression of monokines and interferon-gamma. *Blood*, 95: 270-276.

Bouby N, Hus-Citharel A, Marchetti J, Bankir L, Corvol P, Llorens-Cortes C (1997). Expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes and angiotensin II-induced calcium mobilization along the rat nephron. *J Am Soc Nephrol*, 8: 1658-1667.

Brodsky SV, Yamamoto T, Tada T, Kim B, Chen J, Kajiya F, Goligorsky MS (2002). Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure: rescue by transplanted endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 282: F1140-F1149.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*; 96: 857-868.

Cabral AM, Vasquez EC, Mauad H. Hipertensão Experimental: Aspectos Fisiopatológicos e Técnicas de Produção. Em: Hipertensão Arterial. Sarvier, 1997, pp 61-71.

Calhoun DA, Donnelly WH Jr, Du Y, Dame JB, Li Y, Christensen RD (1999). Distribution of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and G-CSF-receptor mRNA and protein in the human fetus. *Pediatr Res*, 46: 333-338.

Capers Q 4th, Alexander RW, Lou P, De Leon H, Wilcox JN, Ishizaka N, Howard AB, Taylor WR (1997). Monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic tissues of hypertensive rats. *Hypertension*, 30(6):1397-1402.

Caps MT, Zierler RE, Polissar NL, Bergelin RO, Beach KW, Cantwell-Gab K, Casadei A, Davidson RC, Strandness DE Jr (1998). Risk of atrophy in kidneys with atherosclerotic renal artery stenosis. *Kidney Int*, 53: 735-742.

Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM (2000). Role of the angiotensin type 2 (AT₂) receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension*, 35: 155-163.

Casarini DE, Boim MA, Stella RC, Krieger-Azzolini MH, Krieger JE, Schor N (1997). Angiotensin I-converting enzyme activity in tubular fluid along the rat nephron. *Am J Physiol*, 272: F405-F409.

Cassis LA, Huang J, Gong MC, Daugherty A (2004). Role of metabolism and receptor responsiveness in the attenuated responses to Angiotensin II in mice compared to rats. *Regulatory Peptides*, 117: 107-116.

Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM (1998). Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 83(9): 952-959.

Chien S, Li S, Shyy YJ (1998). Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells. *Hypertension*, 31: 162-169.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ, National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure, National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee (2003). The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*, 289: 2560-2572.

Cifkova R, Erdine S, Fagard R, Farsang C, Heagerty AM, Kiowski W, Kjeldsen S, Luscher T, Mallion JM, Mancia G, Poulter N, Rahn KH, Rodicio JL, Ruilope LM, van Zwieten P, Waeber B, Williams B, Zanchetti A, ESH/ESC Hypertension Guidelines Committee (2003). Practice guidelines for primary care physicians: 2003 ESH/ESC hypertension guidelines. *J Hypertens*, 21: 1779-1786.

Clift RA, Appelbaum FR, Thomas ED (1993). Treatment of chronic myeloid leukemia by marrow transplantation. *Blood*, 82: 1954-1956.

Cole J, Ertoy D, Lin H, Sutliff RL, Ezan E, Guyene TT, Capecchi M, Corvol P, Bernstein KE (2000). Lack of angiotensin II-facilitated erythropoiesis causes anemia in angiotensin-converting enzyme-deficient mice. *J Clin Invest*, 106: 1391-1398.

Cotran RS, Kumar V, Collins T (2000). Robbins: patologia estrutural e funcional. Editora: Guanabara Koogan. Rio de Janeiro; 6ª Ed.: 14-15; 171-172.

Crabos M, Bertschin S, Buhler FR, Rogg H, Evequoz D, Eberhard M, Erne P (1993). Identification of AT1 receptors on human platelets and decreased angiotensin II binding in hypertension. *Journal of Hypertension*, 11(Suppl 5): S230-S231.

Davis JO (1973). The control of renin release. *Am J Méd*, 55(3): 333-350.

Daugherty A, Manning MW, Cassis LA (2000). Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest*, 105(11): 1605-1612.

Daugherty A, Cassis LA (2002). Mechanisms of abdominal aortic aneurysm formation. *Curr Atheroscler Rep*, 4: 222-227.

Dias da Silva VJ, Machado MPR, Rocha AM, Franchini, KG, Voltarelli JC (2005). Bone marrow stem/progenitor cells reduce arterial blood pressure and ameliorate endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *FASEB J*, 19: 7439-7439.

Dong F, Larner AC (2000). Activation of Akt kinase by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): evidence for the role of a tyrosine kinase activity distinct from the Janus kinases. *Blood*, 95: 1656-1662.

Dzau VJ, Gibbons GH, Pratt RE (1991). Molecular mechanisms of vascular renin-angiotensin system in myointimal hyperplasia. *Hypertension*, 18(4 Suppl): II100-105.

Dzau VJ (2001). Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensina and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis.

Fazan Jr R, Silva VD, Salgado HC (2001). Modelos de hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertns*, 8:19-29.

Ferrario CM, Blumle C, Nadzam GR, McCubbin JW (1971). An externally adjustable renal artery clamp. *J Appl Physiol*, 31:635.

Ferrario CM (1998). Angiotension-(1-7) and antihypertensive mechanisms. *J Nephrol*, 11(6): 278-283.

Field LJ, Gross KW (1985). Ren-1 and Ren-2 loci are expressed in mouse kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 6196-6200.

Freudenthaler SM, Schreeb K, Korner T, Gleiter CH (1999). Angiotensin II increase erythropoietin production in healthy volunteers. *Eur J Clin Invest*, 29: 816-823.

Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitis RN, Walsh K (2000). Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation*, 101: 660-667.

Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Yutani C, Kitamura S (2005). Endogenous bone-marrow-derived stem cells contribute only a small proportion of regenerated myocardium in the acute infarction model. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 24: 67-72.

Gagnon RF, Ansari M (1990). Development and progression of uremic changes in the mouse with surgically induced renal failure. *Nephron*, 54: 70-76.

Gava AL, Peotta VA, Cabral AM, Vasquez EC, Meyrelles SS (2008). Overexpression of eNOS prevents the development of renovascular hypertension in mice. *Can J Physiol Pharmacol*, 86(7): 458-464.

Gazitt Y (2008). Immunologic profiles of effector cells and peripheral blood stem cells mobilized with different hematopoietic growth factors. *Stem Cells*, 18: 390-390.

Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW (1934). Studies on experimental hypertension. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med*, 59:347-349.

Gonçalves CP, Pimentel EB, Werneck de Castro JPS, Goldenberg RCS, Mill JG (2008). Uso da terapia celular em ratos espontaneamente hipertensos. Livro de resumos do XII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular; pg. 45. Vitória/ES.

Goodfriend TL (2000). Angiotensin receptors: history and mysteries. *Am J Hypertens*. 13: 442-449.

Graf T (2002). Differentiation plasticity of hematopoietic cells. [Blood](#), 99(9):3089-3101.

Gradman AH, Kad R (2008). Renin Inhibition in Hypertension. *JACC*, 51(5): 519-528.

Grafte-Faure S, Leveque C, Vasse M, Soria C, Norris V, Vannier JP (1999). Effects of Glucocorticoids and Mineralocorticoids on Proliferation and Maturation of Human Peripheral Blood Stem Cells. *American Journal of Hematology*, 62: 65-73.

Greco BA, Breyer JA (1997). Atherosclerotic ischemic renal disease. *Am J Kidney Dis*, 29: 167.

Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW (1993). Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation*, 87(6): 1816-1828.

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, 74(6):1141-1148.

Griendling KK, Alexander RW (1997). Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation*, 96(10): 3264-3275.

Guan S, Fox J, Mitchell KD, Navar LG (1992). Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension*;20:763–767.

Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kim Y, Rosenberg ME (2002). A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure. *Kidney Int*, 62: 1285-1290.

Guyton AC, Coleman TG, Wilcox CS (1999). Quantitative analysis of the pathophysiology of hypertension. *J Am Soc Nephrol*, 10: 2248-2249.

Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R (1990). Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Ver*, 70: 1067-1116.

Haghighat A, Weiss D, Whalin MK, Cowan PD, Taylor WR (2007). Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte macrophage colony-stimulating factor exacerbate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient Mice. *Circulation*, 115: 2049-2054.

Hasegawa H, Takano H, Ohtsuka M, Ueda K, Niitsuma Y, Qin Y, Tadokoro H, Shiomi M, Komuro I (2006). G-CSF prevents the progression of atherosclerosis and neointimal formation in rabbits. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344: 370-376.

Harrison-Bernard LM, Navar LG, Ho MM, Vinson GP, El-Dahr SS (1997). Immunohistochemical localization of ANG II AT₁ receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. *Am J Physiol*, 273: F170-F177.

Harrison-Bernard LM, Cook AK, Oliverio MI, Coffman TM (2003). Renal segmental microvascular responses to ANG II in AT_{1A} receptor null mice. *Am J Physiol*, 284: F538-F545.

Haznedaroglu IC, Öztürk MA (2003). Towards the understanding of the local hematopoietic bone marrow renin-angiotensin system. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35: 867-880.

Heeneman S, Smits JF, Leenders PJ, Schiffers PM, Daemen MJ (1997). Effects of angiotensin II on cardiac function and peripheral vascular structure during compensated heart failure in the rat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(10): 1985-1994.

Hiyoshi H, Yayama K, Takano M, Okamoto H (2005). Angiotensin Type 2 Receptor–Mediated Phosphorylation of eNOS in the Aortas of Mice With 2-Kidney, 1-Clip Hypertension. *Hypertension*, 45: 967-973.

Ikeda N, Hasegawa T, Hasegawa T, Saito I, Saruta T (2006). Awareness of the Japanese Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension (JSH 2000) and compliance to its recommendations: surveys in 2000 and 2004. *J Hum Hypertens*; 20: 263-266.

Imanishi T, Kobayashi K, Hano T, Nishio I (2005). Effect of estrogen on differentiation and senescence in endothelial progenitor cells derived from bone marrow in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*, 28(9):763-772.

Imanishi T, Moriwaki C, Hano T, Nishio I (2005). Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 23:1831-1837.

Inger C, Grima M, Coquard C, Barthelmebs M, Imbs JL (2002). Contribution of angiotensin II internalization to intrarenal angiotensin II levels in rats. *Am J Physiol*, 283: F1003-F1010.

Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, Silver M, Li T, Isner JM, Asahara T (2002). Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*, 105: 732-738.

Iwasaki M, Adachi Y, Minamino K, Suzuki Y, Zhang Y, Okigaki M, Nakano K, Koike Y, Wang J, Mukaide H, Taketani S, Mori Y, Takahashi H, Iwasaka T, Ikehara S (2005). Mobilization of bone marrow cells by G-CSF rescues mice from cisplatin-induced renal failure, and M-CSF enhances the effects of G-CSF. *J Am Soc Nephrol*, 16: 658-666.

Izzo JL, Black HR (2003). Hypertension Primer: the essentials of high blood pressure. Third edition, chapter A3; A48; A49, p. 8-11; 138-143. Dallas, Texas.

[Jackson KA](#), [Majka SM](#), [Wang H](#), [Pocius J](#), [Hartley CJ](#), [Majesky MW](#), [Entman ML](#), [Michael LH](#), [Hirschi KK](#), [Goodell MA](#) (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*, 107(11): 1395-1402.

Johns C, Gavras I, Handy DE, Salomao A, Gavras H (1996). Models of experimental hypertension. *Hypertension*, 28: 1064-1069.

Jokubaitis VJ, Sinka L, Driessen R, Whitty G, Haylock DN, Bertonecello I, Smith I, Peault B, Tavian M, Simmons PJ (2007). Angiotensin-Converting Enzyme (CD143) marks hematopoietic stem cells in human embryonic, fetal and adult hematopoietic tissues. *Blood*, doi:10.1182/blood-2007-05-091710

Just A, Faulhaber J, Ehmke H (2000). Autonomic cardiovascular control in conscious mice. *Am J Physiol Regul Integrative Comp Physiol*, 279: R2214-R2221.

Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Suzuki E, Nagata D, Nishimatsu H, Kimura K, Goto A, Omata M (2000). Effects of vasodilatory antihypertensive agents on endothelial dysfunction in rats with ischemic acute renal failure. *Hypertens. Res.*, 23: 527-533.

Kale S, Karihaloo A, Clark PR, Kashgarian M, Krause DS, Cantley LG (2003). Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest*, 112: 42-49.

Kandel ES, Hay N (1999). The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res*, 253: 210-29.

Kaplan NM (1997). Systemic hypertension: mechanisms and diagnosis. In Braunwald E. *Heart Disease*, 5^a Ed.:807.

Kawakami M, Tsutsumi H, Kumakawa T, Abe H, Hirai M, Kurosawa S, Mori M, Fukushima M (1990). Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections. *Blood*, 76: 1962-1964.

Keidar S, Attias J, Smith J, Breslow JL, Hayek T (1997). The angiotensin-II receptor antagonist, losartan, inhibits LDL lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 236(3): 622-625.

Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A (2007). The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacology Review*, 59(3): 251-287.

Kowala MC, Grove RI, Aberg G (1994). Inhibitors of angiotensin converting enzyme decrease early atherosclerosis in hyperlipidemic hamsters. Fosinopril reduces plasma cholesterol and captopril inhibits macrophage-foam cell accumulation independently of blood pressure and plasma lipids. *Atherosclerosis*, 108(1): 61-72.

Kukharchuk OL, Radchenko VV, Sipman BM, Sahach VF (2003). Effect of allotransplantation of embryonic pluripotent progenitor cells on dynamics of systemic arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Fiziol Zh*, 49: 68-71.

[Kurnjek ML](#), [Mangiarua E](#), [Basso N](#), [Taquini AC](#) (1983). Further studies on the development of two-kidney, two clip Goldblatt hypertension in 6-hydroxydopamine-treated rats. [Hypertension](#), 5(6 Pt 3): 3-7.

Lameire NH, Vanholder R (2004). Pathophysiology of ischaemic acute renal failure. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 18: 21-36.

Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG (1997). Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation*, 95(3): 588-593.

Ledingham JH (1971). Mechanism of renal hypertension. *Proc Royal Soc Med*, 64:409-418.

Lerman LO, Schwartz RS, Grande JP, Sheedy PF, Romero JC (1999). Noninvasive evaluation of a novel swine model of renal artery stenosis. *J Am Soc Nephrol*, 10: 1455-1465.

Lerman LO, Nath KA, Rodriguez-Porcel M, Krier JD, Schwartz RS, Napoli C, Romero JC (2001). Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension. *Hypertension*, 37: 541- 6.

Lerman OL, Chade AR, Sica V, Napoli C (2005). Animal models of hypertension: An overview. *J Lab Clin Med*, 146: 160-173.

Lewandowski J (2003). Renovascular hypertension: is it only the top of the iceberg? *Pol Merkuriusz Lek*, 15(88): 371-375.

Li Y, Takemura G, Okada H, Miyata S, Esaki M, Maruyama R, Kanamori H, Li L, Ogino A, Misao Y, Khai NC, Mikami A, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H (2006). Treatment with granulocyte colony-stimulating factor ameliorates chronic heart failure. *Laboratory Investigation*, 86: 32-44.

Li Y, Wu J, Shou Z, He Q, Zhang P, Han F, Li H, Chen J (2008). Pretreatment with granulocyte colony-stimulating factor attenuated renal ischaemia and reperfusion injury via activation of PI3/Akt signal pathway. *Nephrology*, 1-9, doi:10.1111/j.1440-1797.2008.00928.x

Lin F, Cordes K, Li L, Hood L, Couser WG, Shankland SJ, Igarashi P (2003). Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol*, 14: 1188-1199.

Link DC (2000). Mechanisms of granulocyte colony-stimulating factor-induced hematopoietic progenitor-cell mobilization. *Semin Hematol*, 37(S2): 25-32.

Loomans CJ, Dao HH, van Zonneveld AJ, Rabelink TJ (2004). Is endothelial progenitor cell dysfunction involved in altered angiogenic processes in patients with hypertension? *Curr Hypertens Rep*, 6(1):51-54.

Losordo DW, Dimmeler S (2004). Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part I: angiogenic cytokines. *Circulation*, 109: 2487-2491.

Losordo DW, Dimmeler S (2004). Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation*, 109: 2692-2697.

Makaritsis KP, Gavras H, Du Y, Chobanian AV, Brecher P (1998). Alpha1-adrenergic plus angiotensin receptor blockade reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Hypertension*, 32(6):1044-8.

Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata JI, Umezawa A, Ogawa S (1999). Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J. Clin. Invest*, 103: 697-705.

Marumo T, Uchimura H, Hayashi M, Hishikawa K, Fujita T (2006). Aldosterone impairs bone marrow-derived progenitor cell formation. *Hypertension*, 48: 490-496.

Marumo T, Hishikawa K, Matsuzaki Y, Imai N, Takase O, himosawa T, Okano H, Fujita T (2007). Angiotensin II type 1 receptor blockade prevents decrease in adult stem-like cells in kidney after ureteral obstruction. *European Journal of Pharmacology*, 573: 216-220.

Masuya M, Drake CJ, Fleming PA, Reilly CM, Zeng H, Hill WD, Martin-Studdard A, Hess DC, Ogawa M (2003). Hematopoietic origin of glomerular mesangial cells. *Blood*, 101: 2215-2218.

Masztalerz M, Wlodarczyk Z, Czuczejko J, slupski M, Kedziora J (2006). Superoxide anion as a marker of ischemia-reperfusion injury of the transplanted kidney. *Transplant Proc*, 38: 46-48.

Matsumoto R, Omura T, Yoshiyama M, Hayashi T, Inamoto S, Koh KR, Ohta K, Izumi Y, Nakamura Y, Akioka K, Kitaura Y, Takeuchi K, Yoshikawa J (2005). Vascular endothelial growth factor-expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25: 1168-1173.

Matsui T, Tao J, del Monte F, del Monte F, Lee KH, Li L, Picard M, Force TL, Franke TF, Hajar RJ, Rosenzweig A (2001). Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia *in vivo*. *Circulation*; 104: 330-335.

Mazzolai L, Nussberger J, Aubert JF, Brunner DB, Gabbiani G, Brunner HR, Pedrazzini T (1998). Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system. *Hypertension*, 31:1324-1330.

Mazzolai L, Duchosal MA, Korber M, Bouzourene K, Aubert JF, Hao H, Vallet V, Brunner HR, Nussberger J, Gabbiani G, Hayoz D (2004). Endogenous angiotensin II induces atherosclerotic plaque vulnerability and elicits a Th1 response in apoE^{-/-} mice. *Hypertension*, 44: 277-282.

Metcalf D (1991). Control of granulocytes and macrophages: Molecular, cellular, and clinical aspects. *Science*, 254: 529-533.

Meyrier A, Hill GS, Simon P (1998). Ischemic renal diseases: new insights into old entities. *Kidney International*, 54: 2-13.

Minguez C, Mazuecos A, Ceballos M, Tejuca F, Rivero M (1995). Worsening of renal function in a renal transplant patient treated with granulocyte colony-stimulating factor. *Nephrol Dial Transplant*, 10: 2166-2167.

Millatt LJ, Abdel-Rahman EM, Siragy HM (1999). Angiotensin II and nitric oxide: a question of balance. *Regul Pept*, 81(1-3): 1-10.

Moysés MR, Cabral AM, Marcal D, Vasquez EC (1994). Sigmoidal curve-fitting of baroreceptor sensitivity in renovascular 2K1C hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res*. 27(6):1419-24.

Mrug M, Stopka T, Julian BA, Prchal JF, Prchal JT (1997). Angiotensin II stimulates proliferation of normal early erythroid progenitors. *J Clin Invest*, 100: 2310-2314.

Murat A, Pellieux C, Brunner HR, Pedrazzini T (2000). Calcineurin blockade prevents cardiac mitogen-activated protein kinase activation and hypertrophy in renovascular hypertension. *J Biol Chem*, 275: 40867-40873.

Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE (1991). Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature*, 351: 233-236.

Navar LG, Zou L, von Thun A, Wang CT, Imig JD, Mitchell KD (1998). Unraveling the mystery of Goldblatt hypertension. *News Physiol Sci*, 13: 170-176.

Navar LG, Harrison-Bernard LM, Imig JD, Cervenka L, Mitchell KD (2000). Renal responses to AT1 receptor blockade. *Am J Hypertens*, 13: 45S-54S.

Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H (2002). Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension*, 39: 316-322.

Nakajima M, Mukoyama M, Pratt RE, Horiuchi M, Dzau VJ (1993). Cloning of cDNA and analysis of the gene for mouse angiotensin II type 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 197: 393-399.

Nishida M, Hamaoka K (2006). How does G-CSF act on the kidney during acute tubular injury? *Nephron Exp Nephrol*, 104: e123-e128.

Nogueira BV, Peotta VA, Meyrelles SS, Vasquez EC (2007). Evaluation of aortic remodeling in apolipoprotein E-deficient mice and renovascular hypertensive mice. *Archives of Medical Research*, 38: 816-821.

Ohkubo N, Matsubara H, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kijima K, Maruyama K, Masaki H, Tsutumi Y, Shibasaki Y, Iwasaka T, Inada M (1997). Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism. *Circulation*, 96: 3954-3962.

Ohtsuka M, Takano H, Zou Y, Toko H, Akazawa H, Qin Y, Suzuki M, Hasegawa H, Nakaya H, Komuro I (2004). Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *FASEB J*, 18: 851-853.

Oishi Y, Ozono R, Yoshizumi M, Akishita M, Horiuchi M, Oshima T (2006). AT2 receptor mediates the cardioprotective effects of AT1 receptor antagonist in post-myocardial infarction remodeling. *Life Sciences*, 80: 82-88.

Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Letters*, 407: 313-319.

Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA (1993). Guide to the care and use of experimental animals. ISBN: 0-919087-18-3

[Olivares EL](#), [Ribeiro VP](#), [Werneck de Castro JP](#), [Ribeiro KC](#), [Mattos EC](#), [Goldenberg RC](#), [Mill JG](#), [Dohmann HF](#), [dos Santos RR](#), [de Carvalho AC](#), [Masuda MO](#) (2004). Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts. [Am J Physiol Heart Circ Physiol](#), 287(2): H464-470.

[Orlic D](#), [Kajstura J](#), [Chimenti S](#), [Jakoniuk I](#), [Anderson SM](#), [Li B](#), [Pickel J](#), [McKay R](#), [Nadal-Ginard B](#), [Bodine DM](#), [Leri A](#), [Anversa P](#) (2001a). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. [Nature](#), 410(6829): 701-705.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Ginard BN, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001b). Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart,

improving function and survival. *Proc Nat Acad Sci*, 98 (18): 10344-10349.

Ozsarlak O, Parizel PM (2004). Role of mr angiography in the evaluation of renovascular hypertension. *JBR-BTR*, 87(1): 36-42.

Papayannopoulou T (2004). Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood*, 103: 1580-1585.

Peotta VA, Gava AL, Vasquez EC, Meyrelles SS (2007). Evaluation of baroreflex control of heart rate in renovascular hypertensive mice. *Can J Physiol Pharmacol*, 85(8): 761-766.

Phillips MI, Schmidt-Ott KM (1999). The Discovery of Renin 100 Years Ago. *News Physiol Sci*, 14: 271-274.

Pinto YM, Paul M, Ganten D (1998). Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res*, 39(1): 77- 88.

Poulsom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnarasah S, Jeffery R, Hunt T, Alison M, Cook T, Pusey C, Wright NA (2001). Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol*, 195: 229- 235.

Prieto-Carrasquero MC, Botros F, Kobori H, Streber S, Navar LG (2005). Angiotensin II regulates distal nephron renin gene expression in Goldblatt hypertensive rats independently from high blood pressure. *Hypertension*, 46: 871.

Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. (1990). Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature*, 344: 254-257.

[Rauscher FM](#), [Goldschmidt-Clermont PJ](#), [Davis BH](#), [Wang T](#), [Gregg D](#), [Ramaswami P](#), [Pippen AM](#), [Annex BH](#), [Dong C](#), [Taylor DA](#) (2003). Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation*, 108(4): 457-63.

Reid IA, Morris BJ, Ganong WJ (1978). The renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol*, 40:377-410.

Rimmer JM, Gennari FJ. Atherosclerotic renovascular disease and progressive renal failure (1993). *Ann Intern Med*, 118: 712-719.

Rookmaaker MB, Smits AM, Tolboom H, Van 't Wout K, Martens AC, Goldschmeding R, Joles JA, Van Zonneveld AJ, Grone HJ, Rabelink TJ, Verhaar MC (2003). Bone-marrow derived cells contribute to glomerular endothelial repair in experimental glomerulonephritis. *Am J Pathol* 163: 553-562.

Rossi GP, Pavan E, Chiesura-Corona M, Bader M, Paganini G, Cesari M, De Toni R, Filtrin GP, Ganten D, Pessina AC (1997). Renovascular hypertension with low-to-normal plasma renin: clinical and angiographic features. *Clin Sci (Lond)*; 93: 435-443.

Ryan SP, Weinberger E, White KS, Shaw DWW, Patterson K, Nazar-Stewart V, Miser J (1995). MR Imaging of Bone Marrow in Children with Osteosarcoma: Effect of granulocyte colony-stimulating factor. *AJR*, 165: 915-920.

Santos RA, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero J, Chernicky CL, Greene LJ, Ferrario CM (1988). Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension*, (suppl. I) 11: 153-157.

Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T (2003). Angiotensin-(1-7) is an

endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 8258-8263.

Sadjadi J, Puttapparthi K, Welborn MB 3rd, Rogers TE, Moe O, Clagett GP, Turnage RH, Levi M, Modrall JG (2002). Upregulation of autocrine-paracrine renin-angiotensin systems in chronic renovascular hypertension. *J Vasc Surg*, 36: 386-392.

Sadjadi J, Kramer GL, Yu CH, Welborn MB 3rd, Modrall JG (2005). Angiotensin II exerts positive feedback on the intrarenal renin-angiotensin system by an angiotensin converting enzyme-dependent mechanism. *J Surg Res*, 129: 272-277.

Sasamura H, Hein L, Krieger JE, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ (1992). Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. *Biochem Biophys Res Commun*, 185: 253-259.

Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JFE (2007). Chronic kidney disease: effects on the vascular system. *Circulation*, 116: 85-97.

Schnermann JB, Traynor T, Yang T, Huang YG, Oliverio MI, Coffman T, Briggs JP (1997). Absence of tubuloglomerular feedback responses in AT1A receptor-deficient mice. *Am J Physiol*, 273: F315-F320.

Senitko M, Fenves AZ (2005). An update on renovascular hypertension. *Curr Cardiol Rep*, 7(6): 405-411.

Shibata M, Yamawaki T, Sasaki T, Hattori H, Hamada J, Fukuuchi Y, Okano H, Miura M (2002). Upregulation of Akt phosphorylation at the early stage of middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res*, 942: 1-10.

Shuldiner AR (1996). Transgenic animals. *N Engl J Med*, 334: 653-655.

Smithies O, Kim HS (1994). Targeted gene duplication and disruption for analyzing quantitative genetic traits in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91: 3612-3615.

Smithies O (1997). Theodore Cooper Memorial Lecture: A mouse view of hypertension. *Hypertension*, 30: 1318-1324.

Soares MBP, Lima RS, Rocha LL, Takyia CM, Pontes-de-Carvalho L, Carvalho ACC, Ribeiro-dos-Santos R (2004). Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *AJP*, 164(2): 441-447.

Spandou E, Tsouchikas I, Karkavelas G, Dounousi E, Simeonidou C, Guiba-Tziampiri O, Tsakiris D (2006). Erythropoietin attenuates renal injury in experimental acute renal failure ischemic/reperfusion model. *Nephrol Dial Transplant*, 21: 330-336.

Stokman G, Leemans JC, Claessen N, Weening JJ, Florquin S (2005). Hematopoietic stem cell mobilization therapy accelerates recovery of renal function independent of stem cell contribution. *J Am Soc Nephrol*, 16: 1684-1692.

Stokman G, Leemans JC, Stroo I, Hoedemaeker I, Claessen N, Teske GJD, Weening JJ, Florquin S (2008). Enhanced mobilization of bone marrow cells does not ameliorate renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*, 23: 483-491.

Suzuki Y, Ortega MR, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J (2003). Inflammation and angiotensin II. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35: 881-900.

Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Agner M, Isner JM, Asahara T (1999). Ischemia and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature Medicine*, 5: 434-438.

Takano H, Qin Y, Hasegawa H, Ueda K, Niitsuma Y, Ohtsuka M, Komuro I (2006). Effects of G-CSF on left ventricular remodeling and heart failure after acute myocardial infarction. *J Mol Med*, 84: 185-193.

Textor SC (2004). Ischemic nephropathy: where are we now? *J Am Soc Nephrol*, 15(8):1974-1982.

Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD (1993). Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Ver*, 45: 205-251.

[Thomas ED](#), [Clift RA](#), [Fefer A](#), [Appelbaum FR](#), [Beatty P](#), [Bensinger WI](#), [Buckner CD](#), [Cheever MA](#), [Deeg HJ](#), [Doney K](#) (1986). Marrow transplantation for the treatment of chronic myelogenous leukemia. [Ann Intern Med](#), 104(2): 155-63.

Tögel F, Isaac J, Westenfelder C (2004). Hematopoietic stem cell mobilization-associated granulocytosis severely worsens acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 15: 1261-1267.

Tögel F, Isaac J, Hu Z, Weiss K, Westenfelder C (2005). Renal SDF-1 signals mobilization and homing of CXCR4-positive cells to the kidney after ischemic injury. *Kidney Int*, 67: 1772-1784.

Toth ZE, Leker RR, Shahar T, Pastorino S, Szalayova I, Asemenew B, Key S, Parmelee A, Mayer B, Nemeth K, Bratincsák A, Mezey E (2008). The combination of granulocyte colony stimulatory factor and stem cell factor significantly increases the number of bone marrow derived endothelial cells in brains of mice following cerebral ischemia. *Blood*, prepublished online Feb 11, doi:10.1182/blood-2007-10-119073

Tura BR, Martino HF, Gowdak LH, dos Santos RR, Dohmann HF, Krieger JE, Feitosa G, Vilas-Boas F, Oliveira SA, Silva SA, Bozza AZ, Borojevic R, Carvalho ACC (2007).

Multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies – MiHeart Study. *Trials*,8:2 1-4.

Ueda K, Takano H, Hasegawa H, Niitsuma Y, Qin Y, Ohtsuka M, Komuro I (2006). Granulocyte colony stimulating factor directly inhibits myocardial ischemia-reperfusion injury through Akt–endothelial NO synthase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26: e108-e113.

Urbich C, Dimmeler S (2004). Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*, 95: 343-353.

Urbich C, Dimmeler S (2005). Risk factors for coronary artery disease, circulating endothelial progenitor cells, and the role of HMG-CoA reductase inhibitors. *Kidney International*, 67(5): 1672-1676.

Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S (2001). Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*, 89: E1-E7.

Vasilev T, Kiproff D, Puchlev A, Todorova L (1978). Plasma renin activity in patients with renovascular hypertension. *Cor Vasa*, 20(1): 35-43.

Verfaillie CM. Hematopoietic stem cells for transplantation (2002). *Nat Immunol*, 3: 314-317.

Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MBP, Pinho-Filho JÁ, Mota A, Almeida AJG, Carvalho C, Carvalho HG, Oliveira AD, Santos RR (2004). *Arq Bras Cardiol*, 82(2): 181-184.

Xie L, Zheng X, Qin J, Chen Z, Jin Y, Ding W (2006). Role of PI3-kinase/Akt signalling pathway in renal function and cell proliferation after renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Nephrology*, 11: 207-212.

[Wagers AJ](#), [Weissman IL](#) (2004). Plasticity of adult stem cells. [Cell](#), 116(5):639-48.

Weiss D, Kools JJ, Taylor WR (2001). Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Circulation*, 103: 448-454.

Wiesel P, Mazzolai L, Nussberger J, Pedrazzini T (1997). Two-Kidney, One Clip and One-Kidney, One Clip Hypertension in Mice. *Hypertension*, 29: 1025-1030.

Wilson C, Byrom FB (1939). Renal changes in malignant hypertension. *Lancet*, 1:136-139.

Wood JM, Maibaum J, Rahuel J, Grütter MG, Cohen NC, Rasetti V, Rüger H, Göschke R, Stutz S, Fuhrer W, Schilling W, Rigollier P, Yamaguchi Y, Cumin F, Baum HP, Schnell CR, Herold P, Mah R, Jensen C, O'Brien E, Stanton A, Bedigian MP (2003). Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*, 308: 698-705.

Yamada T, Huriuchi T, Dzau VJ (1996). Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 156-160.

Yang R, Ogasawara AK, Zioncheck TF, Ren Z, He GW, DeGuzman GG, Pelletier N, Shen BQ, Bunting S, Jin H (2002). Exaggerated hypotensive effect of vascular endothelial growth factor in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 39: 815-820.

Zhang Y, Woodward VK, Shelton JM, Richardson JA, Zhou XJ, Link D, Kielar ML, Jeyarajah DR, Lu CY (2004). Ischemia-reperfusion induces G-CSF gene expression by renal medullary thick ascending limb cells in vivo and in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol*, 286: F1193-F1201.

Zeller T (2005). Renal artery stenosis: epidemiology, clinical manifestation, and percutaneous endovascular therapy. *J Interv Cardiol*, 18(6): 497-506.

Zeng J, Zhang Y, Mo J, Su Z, Huang R (1998). Two-kidney, two clip renovascular hypertensive rats can be used as stroke prone rats. *Stroke*, 29: 1708-1714.

Zoccali C (2007). The endothelium as a target in renal diseases. *J Nephrol*, 20 (suppl 12): S39-S44.

Zou LX, Imig JD, Hymel A, Navar LG (1998). Renal uptake of circulating angiotensin II in Val5-angiotensin II infused rats is mediated by AT1 receptor. *Am J Hypertens*, 11: 570-578.

Zubair AC, Silberstein L, Ritz J (2002). Adult hematopoietic stem cell plasticity. *Transfusion*. 42:1096-1101.