

**A TERAPIA COM CÉLULAS MONONUCLEARES
ATENUA A ATEROSCLEROSE EM CAMUNDONGOS
*APOE KNOCKOUT***

MARCELLA LEITE PORTO

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Mestrado em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória
2011

**A TERAPIA COM CÉLULAS MONONUCLEARES ATENUA A
ATEROSCLEROSE EM CAMUNDONGOS APOE *KNOCKOUT***

MARCELLA LEITE PORTO

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

Aprovada em 12/12/2011 por:

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez – Orientador, UFES

Prof. Dra. Silvana dos Santos Meyrelles – Co-orientadora, UFES

Prof. Dr. Marcelo Perim Baldo, UFES

Prof. Dra. Flávia Imbroisi Valle Errera, EMESCAM

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória

2011

Ficha Catalográfica

Porto, Marcella Leite, 1987

A Terapia com Células Mononucleares Atenua a Aterosclerose em Camundongos *apoE Knockout*. Vitória, 2011.

X, 82p., (UFES, M.Sc., Ciências Fisiológicas, 2011)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

Agradecimentos

À Deus por estar sempre presente na minha vida e tornar essa conquista possível. Aos meus pais Sergio e Cristina que foram os maiores incentivadores dessa jornada. Obrigada pelo amor incondicional. Ao meu irmão e cunhada, Rodrigo e Aline, que mesmo de longe estão sempre me encorajando a seguir em frente. A minha querida madrinha e Tia Leila que me apoiou em todos os momentos da minha vida. A Tia Sheila, Avó Sylvia e ao meu Avô Jackson que sempre torceram por mim. A Tia Ana, Tio Nilson, Caio e Camila: obrigada pelo apoio e por compartilhar todas as conquistas!

Ao meu amor, companheiro, príncipe, amigo, namorado Guilherme (acompanhado de toda família Baião Tavares) que entendeu a minha ausência e me ensinou a ser feliz de verdade. Você me completa. Sem você ao meu lado, os sonhos não se tornariam realidade.

Amo muito todos vocês!

Aos meus queridos orientadores Silvana e Vasquez: vocês foram incansáveis! Obrigada por acreditarem em mim! Vocês são muito mais que grandes mestres, são seres humanos excepcionais!

Aos meus “manos” desse projeto: Leandro, Breno e Thiago. Leandro, obrigada pela parceria de muito sucesso! Breno, você me ensinou os primeiros passos da histologia, jamais esquecerei! Thiago, sem palavras! Você é meu role model! Desculpa fazer você perder algumas noites de sono corrigindo meus resumos, paper, dissertação... Você me ensinou que eu podia mais!

Clá e Bia, obrigada pela paciência! Obrigada pela amizade! Bia, muito obrigada pelas orientações, pelas risadas no lab, pelas correções em cima da hora. Obrigada por todo apoio sempre!

Obrigada aos demais amigos do LTCC pelas discussões, troca de experiências, parcerias, experimentos!

Aos meus queridos amigos do LQP: Thiago (coisa linda), Pedro (parceiro de aula) e Leo (nosso militar que não pede desculpas pede a compreensão de todos). Obrigada pelos cafés, experimentos, amizade e piadas internas!

A família Bone que soube entender minha ausência e sempre incentivou a minha carreira acadêmica! Lígia e Anderson, afilhados queridos, desculpa obrigar vocês a assistir minhas apresentações... mas, foi muito importante para o meu crescimento!

Aos amigos pelo incentivo e amizade! Um agradecimento especial a minha amiga Bárbara, que apesar de não estar envolvida diretamente com esse trabalho, me dá todo o suporte emocional necessário para enfrentar as lutas diárias.

Não posso deixar de agradecer aos ratinhos que se sacrificaram por mim!

Muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	6
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMO.....	12
<i>ABSTRACT</i>	14
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. ATEROSCLEROSE.....	17
1.2. FATORES DE RISCO	18
1.3. METABOLISMO DE LIPÍDEOS.....	19
1.4. ESTRESSE OXIDATIVO	21
1.5. ATEROGENÊSE	22
1.6. CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES	23
1.7. CAMUNDONGO <i>APOE KNOCKOUT</i> (<i>APOE KO</i>)	25
2. INTRODUÇÃO AS CÉLULAS MONONUCLEARES.....	26
2.1. CÉLULAS-TRONCO	27
2.1.1. MESENQUIMAIS	28
2.1.2. HEMATOPOIÉTICAS.....	29
2.2. CÉLULAS PROGENITORAS	30
2.2.1. CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS	31
2.3. CÉLULAS MADURAS DO SANGUE.....	32
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. OBJETIVO GERAL.....	35
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4. METODOLOGIA	37
4.1. ANIMAIS.....	37
4.2. ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO BAÇO	37
4.3. QUANTIFICAÇÃO EM CÂMARA DE NEUBAUER.....	39
4.4. INFUSÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES	40
4.5. DOSAGEM DE COLESTEROL PLASMÁTICO	41

4.6.	ANÁLISE HISTOLÓGICA DA LESÃO ATEROMATOSA.....	41
4.7.	MORFOMETRIA.....	43
4.8.	LOCALIZAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES	43
4.9.	MEDIDA DE ÂNIONS SUPERÓXIDO	44
4.10.	IMUNOHISTOQUÍMICA	45
4.11.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5.	RESULTADOS	48
5.1.	DOSAGEM DE COLESTEROL PLASMÁTICO	48
5.2.	ÁREA DE DEPOSIÇÃO LIPÍDICA.....	49
5.3.	ANÁLISE MORFOMÉTRICA	50
5.4.	LOCALIZAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES COM X-GAL.....	51
5.5.	DETECÇÃO DE ANIONS SUPERÓXIDO	52
5.6.	IMUNOHISTOQUÍMICA	53
6.	DISCUSSÃO.....	56
7.	CONCLUSÃO	66
8.	REFERÊNCIAS	68
9.	ANEXO	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores de risco para a aterosclerose e seus respectivos processos patogênicos.....	18
Tabela 2 – Agentes oxidantes: espécies reativas de oxigênio	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxas de mortalidade por DCV e suas diferentes causas no Brasil.....	17
Figura 2 – O metabolismo das lipoproteínas.....	20
Figura 3 – Composição da placa aterosclerótica, ruptura e formação de trombo	23
Figura 4 – Classificação das lesões ateroscleróticas humanas de acordo com a American Heart Association.	25
Figura 5 – Esquema de células tronco hematopoiéticas e mesenquimais.	30
Figura 6 – Distinção entre célula tronco e célula progenitora.....	31
Figura 7 – Animais isogênicos apoE KO e LacZ.	37
Figura 8 - Isolamento das células mononucleares.	38
Figura 9 - Administração das células mononucleares.	40
Figura 10 - Criostato Jung CM 1800 – Leica.	42
Figura 11 - Abertura longitudinal da aorta torácica.....	44
Figura 12 - Molécula 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosideo.	44
Figura 13 - Análise de colesterol plasmático.	48
Figura 14 – Efeito da terapia com CMN sobre a deposição lipídica	49
Figura 15 – Efeito da terapia com CMN sobre as áreas de secção transversa vascular e luminal.....	50
Figura 16 - Fotos representativas da reação <i>en face</i> mostrando as células β -gal positivas.	51
Figura 17 – Efeito da terapia com CMN sobre a produção de ânions superóxido.....	52
Figura 18 – Efeito da terapia com CMN sobre a expressão da eNOS.	53
Figura 19 – <i>Homing</i> das CPEs após terapia com CMN.	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
APO	Apolipoproteína
apoE KO	Animal <i>Knockout</i> Para a Apolipoproteína E
AVE	Acidente Vascular Encefálico
C57	Animal Selvagem
CD 133	Antígeno Célula Tronco Hematopoiética
CE	Célula Endotelial
CETP	<i>Cholesterol Ester Transfer Protein</i>
CMN	Célula Mononuclear
CPE	Célula Progenitora Endotelial
DCV	Doença Cardiovascular
DIC	Doença Isquêmica do Coração
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EPM	Erro Padrão da Média
EtBr	Brometo de Etídio
Flk-1	Receptor para Fator de Crescimento Vascular Endotelial
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HE	Hidroetidina
IDL	Lipoproteína de Densidade Intermediária
IP	Intraperitoneal
KO	<i>Knockout</i>
<i>lacZ</i>	Animal Transgênico para β -Galactosidase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LLP	Lipase Lipoproteica
NO	Óxido Nítrico
$O_2^{\cdot-}$	Ânion Superóxido
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
QM	Quilomícron
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
RPM	Rotações Por Minuto

TG	Triglicerídeo
U.A.	Unidades Arbitrárias
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo
β -gal	β -Galactosidase

RESUMO

As doenças cardiovasculares estão entre as maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo. Dentre estas, destaca-se a aterosclerose, uma doença inflamatória crônica que acomete a parede de artérias de grande e médio calibre. Apesar das terapias convencionais, intervenções farmacológicas ou cirúrgicas, serem de grande valia, a terapia celular surge como uma nova estratégia terapêutica no tratamento e prevenção da aterosclerose. Dessa forma, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da infusão de células mononucleares (CMN) sobre a evolução das lesões ateroscleróticas em camundongos knockout para o gene da apolipoproteína E (apoE KO).

Camundongos apoE KO fêmeas com 6 meses de idade (n=16) e camundongos *lacZ* (animais transgênicos para β -Galactosidase) foram utilizados nesse estudo. Os animais apoE KO receberam dieta hipercolesterolêmica (1,25% colesterol) para acelerar o processo de aterogênese por quatro meses. Aos quatro meses de idade, os animais eram divididos em dois grupos: 1) Grupo controle apoE KO e 2) Grupo que recebeu a terapia com CMN apoE KO-CMN. Os animais apoE KO-CMN receberam 8 infusões endovenosas de células mononucleares isoladas do baço de camundongos *lacZ* (10^6 células/semana).

Após eutanásia, coletou-se o sangue para dosagem de colesterol plasmático, a artéria aorta foi removida para análise histoquímicas. Investigou-se a área de deposição lipídica, o remodelamento vascular, a expressão de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), a produção de ânions superóxido e a presença de células progenitoras endoteliais. Os dados estão expressos como média \pm EPM e a análise estatística foi realizada por teste *t* de student ou ANOVA 1-via (* $p < 0,05$).

A análise histológica da aorta mostrou uma redução significativa na área de deposição lipídica nos animais que receberam a terapia celular (apoE KO-CMN) quando comparados ao grupo controle apoE KO ($0,051^* \pm 0,004$ vs $0,117 \pm 0,016$ mm², respectivamente, * $p < 0,01$). Além disso, a análise morfométrica revelou que a terapia com CMN impediu o remodelamento positivo dos animais apoE KO, normalmente observado (apoE KO-CMN: $0,98 \pm 0,07$ vs apoE KO: $1,37 \pm 0,09$),

utilizando animais selvagens (C57BL/6J) como referência. O grupo tratado com CMN também apresenta redução da produção de ânions superóxido e aumento da expressão da eNOS quando comparados aos animais apoE KO. Finalmente, a imunohistoquímica revelou uma migração de células progenitoras endoteliais (CPE) nas aortas dos animais apoE KO-CMN.

Conclui-se que a terapia com CMN atenua a progressão da aterosclerose em aortas de camundongos apoE KO. Nossos dados fornecem evidências de que o mecanismo pelo qual esta atenuação ocorre inclui a migração de CPEs, diminuição no estresse oxidativo e aumento da expressão de eNOS.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are leading causes of morbidity and mortality worldwide. Among these, there is atherosclerosis, a chronic inflammatory disease of the arterial wall. Despite conventional therapies (pharmacological or surgical interventions) are of great value, cell therapy emerges as a new therapeutic strategy for treating and preventing atherosclerosis. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of mononuclear cell (MNC) therapy on the development of atherosclerotic lesions in the apolipoprotein E knockout (apoE KO) mouse.

ApoE KO female mice (24-week-old) were randomly divided into two groups: 1) an apoE KO control group (n = 8) and 2) an apoE KO group that received MNC therapy (apoE KO-MNC, n = 8). β -galactosidase (β -gal) (encoded by the lacZ gene) transgenic mice (12-week-old) were used as MNC donors. Six-month-old apoE KO mice were fed a cholesterol-rich diet (1.25% cholesterol) for 4 to accelerate the process of atherogenesis. ApoE KO-MNC received mononuclear cells isolated from the spleen of lacZ mice (10^6 cells / week) for 8 weeks.

After euthanasia, a blood sample was collected and the plasma total cholesterol was measured. The aorta was removed for immunohistochemical analysis. We investigated vascular lipid deposition, vascular remodeling, oxidative stress, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and the presence of endothelial progenitor cells. in apoE KO mice treated with spleen MNCs isolated from lacZ transgenic mice (apoE KO-MNC) compared to untreated control mice (apoE KO). Data are presented as the mean \pm SEM. Statistical analysis was performed with Student's *t*-test for independent samples or one-way analysis of variance (ANOVA). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Histological analysis of aortas showed a significant reduction in the lipid deposition area in apoE KO-MNC mice compared to apoE KO mice (0.051 ± 0.004 vs 0.117 ± 0.016 mm², respectively, $p < 0.01$). In addition, vessel morphometry revealed that MNC therapy prevented the outward (positive) remodeling in apoE KO mice that is normally observed (apoE KO-MNC: 0.98 ± 0.07 vs apoE KO: 1.37 ± 0.09), using wild-type mice (C57BL/6J) as a reference. ApoE KO-MNC mice also have reduced

production of superoxide anions and increased eNOS expression compared to apoE KO mice. Finally, immunohistochemistry analysis revealed a homing of endothelial progenitor cells (EPCs) in the aortas of apoE KO-MNC mice.

We concluded that MNC therapy attenuates the progression of atherosclerosis in the aortas of apoE KO mice. Our data provide evidence that the mechanism by which this attenuation occurs includes the homing of EPCs, a decrease in oxidative stress and an upregulation of eNOS expression.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) estão entre as maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo ocidental (LIBBY et al., 2011). No Brasil, as DCV têm sido a principal causa de morte como mostra a Figura 1 (DATASUS, 2007). As DCV são ainda responsáveis por alta freqüência de internações, ocasionando custos médicos e socioeconômicos elevados (IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE, 2007). Dentre as DCV, destaca-se a aterosclerose, uma doença progressiva crônico-degenerativa dos vasos sanguíneos. As doenças decorrentes do agravamento da aterosclerose, como acidente vascular encefálico (AVE) e doença isquêmica do coração (DIC), estão entre as principais causas de morte em nosso país (DATASUS, 2007).

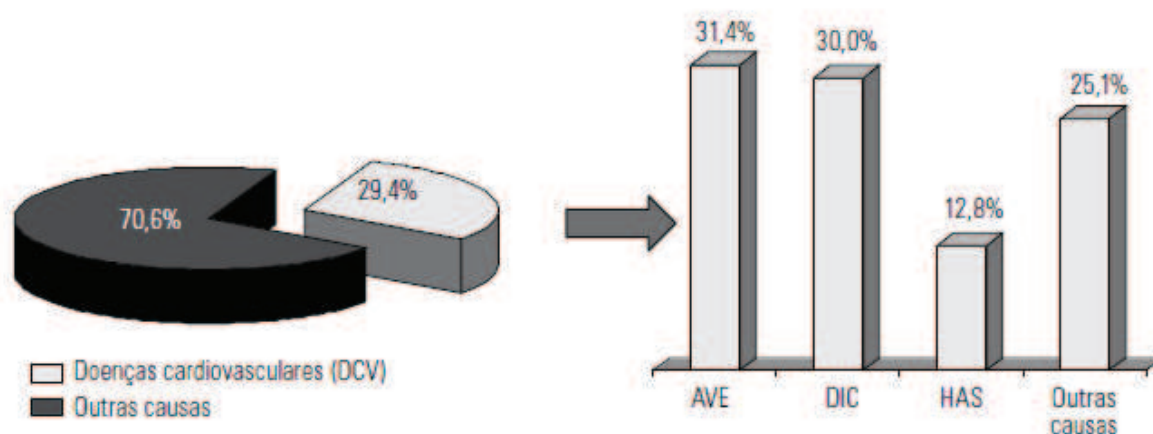


Figura 1 – Taxas de mortalidade por DCV e suas diferentes causas no Brasil, em 2007(DATASUS).

1.1. ATEROSCLEROSE

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente artérias de médio e grande calibre. Ocorrem alterações da camada íntima, representadas por acúmulo de lipídeos, carboidratos complexos, componentes do sangue, células e material intercelular (ROSS, 1993).

1.2. FATORES DE RISCO

Sabe-se que a aterosclerose é resultado da associação de diversos fatores de risco, como história familiar, dieta, tabagismo, sedentarismo, hipertensão arterial, diabetes e obesidade. A hiperlipidemia é reconhecida como importante fator de risco, sendo que as maiores evidências apontam mais especificamente para a hipercolesterolemia.

Na literatura é freqüente o uso da classificação dos fatores de risco em função da sua natureza. A natureza biológica como níveis de colesterol, pressão arterial, gordura corporal e a natureza comportamental (estilo de vida) como prática de atividade física, tabagismo, consumo de lipídeos (TWISK et al., 2001; GUERRA et al., 2003).

Os principais fatores de risco para aterosclerose estão descritos na tabela abaixo, os quais podem ser agrupados, em não modificáveis, modificáveis pelo estilo de vida, modificáveis por intervenção terapêutica e fatores de risco não-tradicionais (SCOTT, 2004).

FATORES DE RISCO PARA ATEROSCLEROSE	
Fatores de risco	Processo patogênico
Não modificáveis	
Idade	Envelhecimento - diminuição dos fatores de relaxamento
Etnia	Afro-descendentes - tendência a pressão arterial elevada
Genêro	Homens - níveis diminuídos de hormônios protetores femininos
Genética	Deficiência de receptores para lipoproteínas
Modificáveis pelo estilo de vida	
Dieta rica em gordura e colesterol	Aumento sérico de colesterol
Baixo consumo de fibras	Estresse oxidativo
Obesidade	Síndrome metabólica
Tabagismo	Estresse oxidativo
Sedentarismo	Baixa perfusão / Alterações no perfil lipídico
Modificáveis pelo uso de drogas	
Dislipidemia	Estresse oxidativo
Hipertensão	Estresse oxidativo / Vasoconstricção
Não tradicionais	
Homocisteína	Estresse oxidativo
Infecções	Infamação
Lupus Eritematoso Sistêmico	Infamação

Tabela 1 – Fatores de risco para a aterosclerose e seus respectivos processos patogênicos. Modificado de Scott, 2004.

1.3. METABOLISMO DE LIPÍDEOS

As classes de lipoproteínas diferem em tamanho e densidade na composição química e no elenco de apolipoproteínas. São eles: quilomícrons, VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa), IDL (lipoproteína de densidade intermediária), LDL (lipoproteína de densidade baixa) e HDL (lipoproteína de densidade alta) (GENESTE, 2003).

Os quilomícrons são responsáveis pelo transporte dos lipídios absorvidos pelo intestino, originários da dieta e da circulação entero-hepática. No fígado, o conteúdo de colesterol é regulado por três mecanismos principais: a) síntese intracelular do colesterol; b) armazenamento após esterificação; c) excreção pela bile. Na luz intestinal, o colesterol é excretado na forma de metabólitos ou como ácidos biliares. Metade do colesterol biliar e aproximadamente 95% dos ácidos biliares são reabsorvidos e retornam ao fígado pelo sistema porta (ciclo entero-hepático). Envolvido pelas apolipoproteínas A e B48 é transportado para o sangue por meio dos vasos linfáticos. O quilomícron se fixa nos receptores capilares que contém a lipase lipoprotéica (LLP) que hidrolisa os triglicerídeos produzindo ácido graxo que é entregue aos tecidos. O quilomícron mais pobre em triglicerídeos, o quilomícron remanescente, se desliga dos receptores e no fígado se interioriza e é degradado liberando o colesterol. O transporte de lipídios de origem hepática ocorre por meio das VLDL, IDL e LDL (RADER e WILSON, 1995).

A VLDL é formada no fígado, rica em triglicerídeos endógenos. No sangue se fixa nos receptores capilares por meio da apoC, é hidrolisada pela LLP sendo o ácido graxo entregue aos tecidos. Perdendo triglicerídeo a VLDL se desprende do capilar e cai na corrente sanguínea como IDL, a lipoproteína de densidade intermediária se fixa no fígado por meio da apoE. No receptor hepático encontra com a HDL que retira apolipoproteínas e entrega colesterol, restando só a apoB 100. A IDL rica em colesterol se desprende sob a denominação de LDL, cuja função é entregar colesterol aos tecidos. As LDL são removidas pelo fígado através dos receptores B/E. A expressão desses receptores é a principal responsável pelo nível de colesterol no sangue e depende da atividade da enzima hidroximetil-glutaril (HMG) CoA redutase que é a enzima-chave intracelular para síntese do colesterol hepático.

As VLDL trocam TG por ésteres de colesterol com as HDL e LDL por intermédio da ação da proteína de transferência de colesterol esterificado ou “*cholesterol ester transfer protein*” (CETP).

O HDL contribui para a proteção do leito vascular contra a aterogênese, tais como a remoção de lipídios oxidados da LDL, inibição da fixação de moléculas de adesão e monócitos ao endotélio e estimulação da liberação de óxido nítrico (IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIA E PREVENÇÃO DA ATROSCLEROSE, 2007).

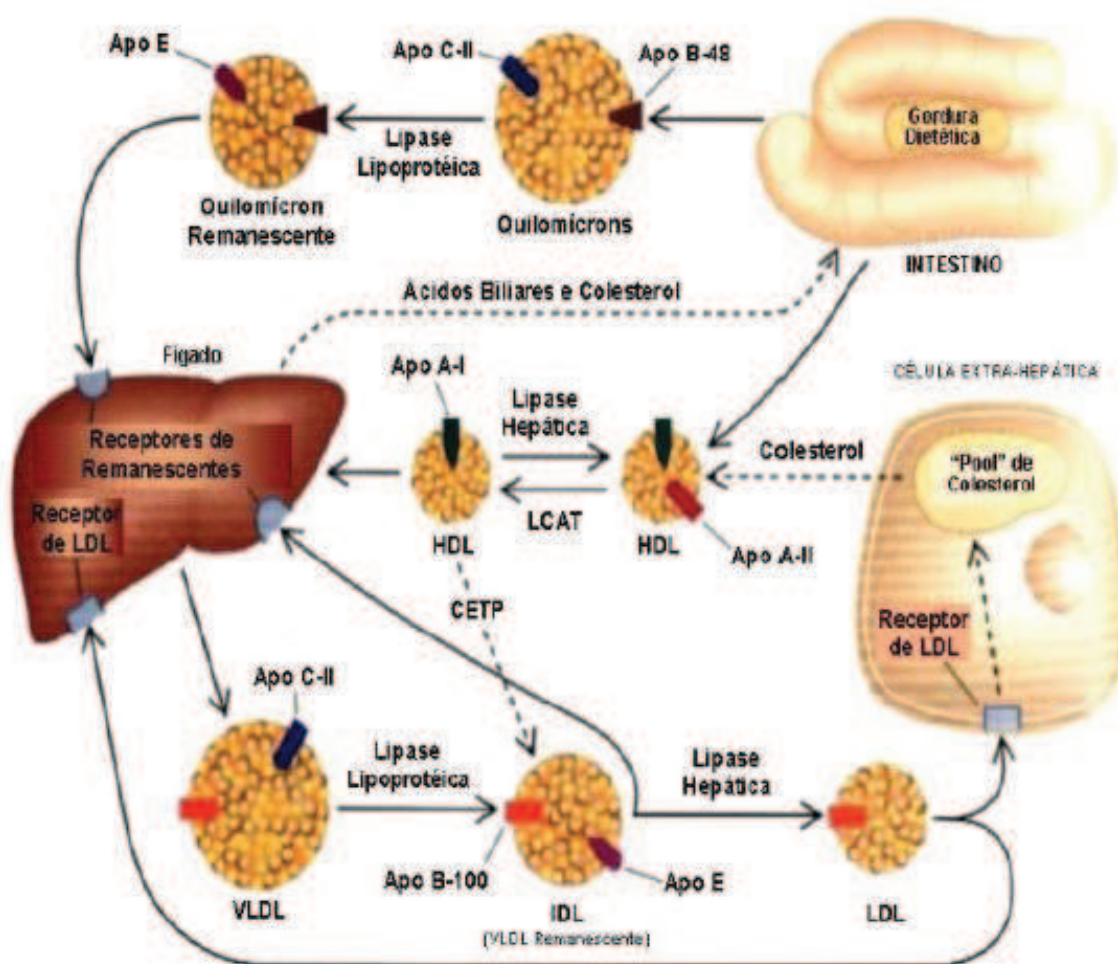


Figura 2 – O metabolismo das lipoproteínas. O intestino absorve os lipídeos da dieta em QM. A Lipase protéica hidrolisa os QM que são captados pelo fígado pela ligação da apo E. O fígado secreta os lipídeos como VLDL com apo B-100. VLDL é hidrolisada em IDL, a qual pode ser captada pelo fígado ou sofrer hidrólise pela lipase hepática e se tornar LDL. Células hepáticas e periféricas removem a LDL da circulação quando apo B-100 se liga ao

receptor de LDL. HDL remove o excesso de colesterol das células para o fígado para excreção na bile. Modificado de Rader e Wilson, 1995.

1.4. ESTRESSE OXIDATIVO

Existem moléculas em nosso organismo denominadas agentes oxidantes. Estas substâncias podem ser genericamente classificadas como espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (HALLIWELL, 1996). O oxigênio é considerado o principal fornecedor de espécies reativas, mas estas também podem ser formadas pelas xantinas oxidases, citocromo P450-oxidases, pela auto-oxidação de catecolaminas e lipoxigenases (GIORDANO, 2005), além de fontes externas como dieta, poluentes do ar e cigarro (SCANDALIOS, 2005).

Quando ocorre um desbalanço entre agentes oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes, ocorre o estresse oxidativo. Acredita-se que a atividade das EROs na parede vascular pode contribuir com a formação da LDL oxidada, um importante fator para a patogênese da aterosclerose. Essas moléculas, representadas na tabela abaixo, são reconhecidas como as maiores responsáveis por comprometer a função endotelial celular.

$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$	Radical superóxido
$O_2^{\bullet -} + H_2O \rightarrow HO_2^{\bullet -} + OH$	Radical hidroperoxil
$HO_2^{\bullet -} + e^- + H \rightarrow H_2O_2$	Peróxido de hidrogênio
$H_2O_2 + e^- \rightarrow \bullet OH + OH^-$	Radical hidroxila

Tabela 2 – Agentes oxidantes: espécies reativas de oxigênio (Adaptado de KOURY e DONANGELO, 2003)

A aterosclerose é o protótipo da doença caracterizada em todas as suas fases por uma disfunção endotelial, que é definida como uma oferta insuficiente de NO que dispõe ao estresse oxidativo, à inflamação, à erosão e à vasoconstrição (HERMANN e LERMAN, 2001).

1.5. ATEROGENÊSE

Diversos fatores de risco contribuem para a formação da placa aterosclerótica, como hiperlipidemia, hipertensão arterial e tabagismo. Como consequência, a disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da camada íntima às lipoproteínas plasmáticas que ficam retidas no espaço subendotelial. Quanto maior o nível plasmático dessas lipoproteínas, maior é o seu acúmulo. (PAOLETTI et al., 2004)

O LDL aprisionado sofre oxidação, provavelmente pela ativação do complexo NADPH oxidase dos macrófagos. Ocorre o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial, processo estimulado pela presença de LDL oxidada. As moléculas de adesão são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a parede arterial. (PAOLETTI et al., 2004)

Os monócitos migram para o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos, que por sua vez captam as LDL oxidadas através da expressão de receptores *scavenger* de LDL oxidada. Os macrófagos repletos de lipídeos são chamados células espumosas (*foam cells*) e são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose. (IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIA E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE, 2007).

Alguns mediadores da inflamação estimulam a migração e proliferação das células musculares lisas da camada média arterial. Estas, ao migrarem para a íntima, passam a produzir não só citocinas e fatores de crescimento, como também matriz extracelular que formará parte da capa fibrosa da placa aterosclerótica. A placa aterosclerótica plenamente desenvolvida é constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular e núcleo lipídico. Estes elementos formam na placa aterosclerótica, o núcleo lipídico, rico em colesterol e a capa fibrosa, rica em colágeno (IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE, 2007).

As placas estáveis caracterizam-se por predomínio de colágeno, organizado em capa fibrosa espessa, escassas células inflamatórias e núcleo lipídico de proporções

menores. As instáveis apresentam atividade inflamatória intensa, com grande atividade proteolítica, núcleo lipídico proeminente e capa fibrótica tênue. A ruptura desta capa expõe material lipídico, levando à formação de um trombo sobrejacente (IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE, 2007).

Na figura abaixo é possível observar a composição da placa aterosclerótica, bem como sua ruptura, exposição do conteúdo subintimal e formação de trombo.

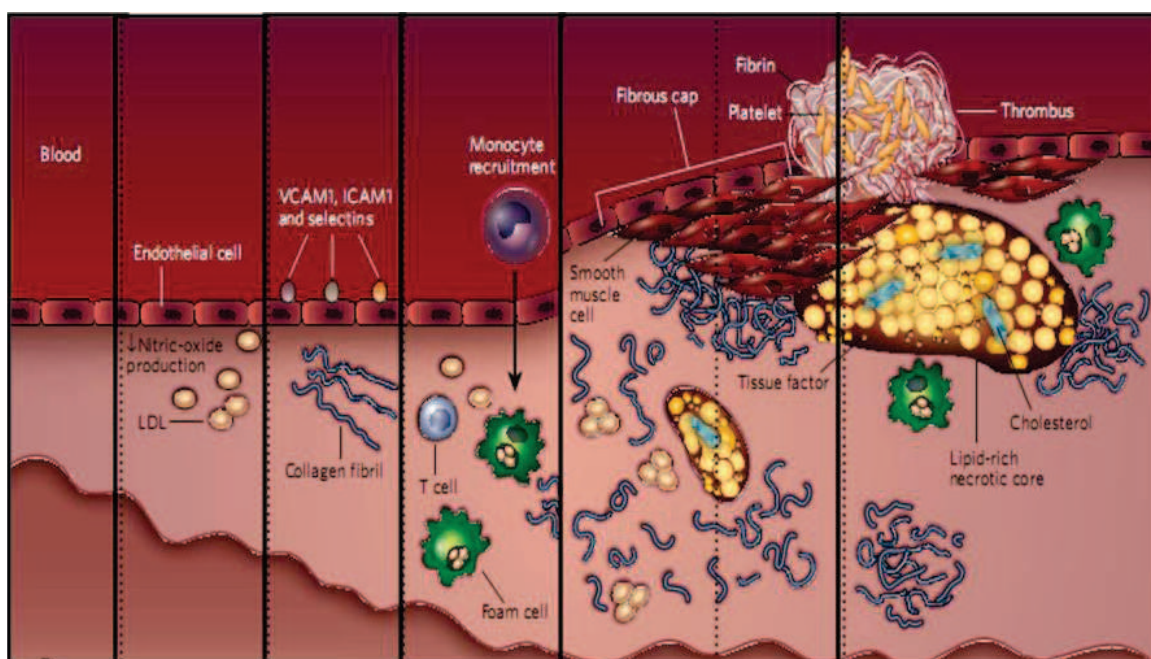


Figura 3 – Composição da placa aterosclerótica, ruptura e formação de trombo. Adaptado de Sanz e Fayad, 2008.

1.6. CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES

As lesões podem ser:

1. Estrias gordurosas: lesões planas, de coloração amarelada, sob a forma de faixas com elevado teor de gordura, são as lesões mais precoces da doença, podendo ser observadas nas primeiras décadas de vida.

2. Placas fibrosas ou fibrolipídicas: formações de consistência aumentada, elevadas na superfície íntima, diminuem parcialmente a luz do vaso.
3. Lesões complicadas: determinadas por distúrbios (hemorragia, ulceração, trombose, calcificação) na placa fibrosa, podendo ser responsável por importantes manifestações clínicas, como por exemplo, interromper o fluxo sanguíneo para diversos órgãos (GIANNINI, 2007).

A *American Heart Association* classifica as lesões ateroscleróticas em seis tipos. A lesão inicial começa com as células espumosas isoladas (pontos gordurosos), passando pelo estágio de estrias gordurosas, ateromas e fibroateromas até as lesões complicadas.

A figura 04 apresenta os mecanismos de crescimento no decorrer de décadas e as correlações clínicas. Do tipo I ao tipo IV o crescimento ocorre principalmente pelo acúmulo de lipídeos. As setas entre os tipos V e VI indicam o aumento da espessura das lesões quando há a formação de trombos na superfície da lesão. A lesão tipo IV pode evoluir para tipo VI com o surgimento do evento trombótico. A lesão tipo VI é caracterizada pela ruptura da placa levando a formação do trombo ou hemorragia na parede vascular, por exemplo. Entretanto a lesão tipo VI também pode retornar com ao tipo V com a cicatrização do trombo. Os vários trombos formados no mesmo local, porém em fases de vida diferentes, podem ser responsáveis pela oclusão gradual das artérias de médio calibre (STARY et al., 1995).

Nomenclatura e principal aspecto histológico	Seqüências na progressão	Principal mecanismo de crescimento	Início mais precoce	Correlação clínica
Lesão tipo I (inicial) Macrófago isolado Células espumosas	I	Crescimento principalmente por acúmulo de lipídios	A partir da primeira década	Clinicamente silenciosa
Lesão tipo II (estria gordurosa) Acúmulo de lipídios principalmente intracelular	II		A partir da terceira década	
Lesão tipo III (intermediária) Alterações do tipo II e pequenos reservatórios extracelulares de lipídios	III			
Lesão tipo IV (ateroma) Alteração do tipo II e núcleo de lipídio extracelular	IV	Aumento acelerado do músculo liso e colágeno	A partir da quarta década	Clinicamente silenciosa ou manifesta
Lesão tipo V (fibroateroma) Centro de lipídio e camada fibrótica, ou múltiplos núcleos de lipídios e camadas fibróticas, ou principalmente calcificada ou principalmente fibrótica	V			
Lesão tipo IV (complicada) Defeito de superfície, hematoma-hemorragia,	VI			

Figura 4 – Classificação das lesões ateroscleróticas humanas de acordo com a *American Heart Association*. Os algarismos romanos indicam as características histológicas dos seis tipos de lesões. As setas indicam a seqüência nas alterações morfológicas. Modificado de Stary et al, 1995.

1.7. CAMUNDONGO APOE *KNOCKOUT* (APOE KO)

A apoE é sintetizada principalmente no fígado e cérebro. É um constituinte da superfície de lipoproteínas, principalmente VLDL, HDL e quilomícrons. (DAVIGNON et al., 1999). Também pode ser sintetizada por monócitos e macrófagos, apresentando efeitos locais na homeostase do colesterol e nas reações inflamatórias que ocorrem nas artérias ateroscleróticas. (MEIR e LEITERSDORF, 2004). Além disso, a apoE inibe a agregação plaquetária, exerce efeitos antiproliferativos, contribui para o efluxo de colesterol das células nas lesões ateroscleróticas e possui propriedades antioxidantes (DAVIGNON et al., 1999).

O camundongo *knockout* para a apolipoproteína E foi desenvolvido para representar um modelo de estudo da aterosclerose. Em 1992 dois laboratórios produziram simultaneamente o modelo de hipercolesterolemia. O gene que codifica a

apolipoproteína E foi inativado nas células tronco embrionárias de um camundongo saudável. Em seguida essas células foram inseridas em blastômeros de camundongos C57. (PLUMP et al., 1992; PIEDRAHITA et al., 1992)

A principal função da apoE é retirar as lipoproteínas VLDL e IDL do plasma via receptor de LDL. Em camundongos deficientes no gene que codifica a apoE, ocorre o desenvolvimento prematuro e espontâneo de graves lesões ateroscleróticas.

Quando esses animais são alimentados com dieta comercial normocolesterolêmica a colesterolemia total é maior que 500 mg/dL, constituindo principalmente de VLDL e frações de quilomícrons remanescentes. Com a dieta hipercolesterolêmica, esse animal apresenta colesterolemia total em torno de 1000 a 2000 mg/dL.

As lesões encontradas nesse modelo animal experimental apresentam um caráter bastante similar com as observadas em seres humanos. Não é observado nesse modelo murino de aterosclerose rupturas de placas com conseqüente formação de trombo, esse animal normalmente apresenta lesões ateroscleróticas estáveis. Com o uso de dieta comercial, a presença de células espumosas é vista com aproximadamente 10 semanas de idade, lesões intermediárias, contendo células espumosas e células musculares lisas, são observadas com 15 semanas e placas fibrosas aparecem nos animais com 20 semanas de idade. O uso de dieta hipercolesterolêmica promove a aceleração do processo aterosclerótico nos camundongos (MEIR et al., 2004)

2. INTRODUÇÃO AS CÉLULAS MONONUCLEARES

A fração de células mononucleares corresponde às células-tronco (mesenquimais e hematopoiéticas), células progenitoras e células maduras do sangue (linfócitos e monócitos).

2.1. CÉLULAS-TRONCO

Células-tronco são células primordiais que apresentam grande potencial de auto-renovação e de diferenciação em, pelo menos, um tipo celular especializado e funcional.

Para definir uma célula-tronco devem-se considerar alguns critérios:

1. Deve se automultiplicar por meio de divisões celulares subseqüentes, um pré-requisito para sustentar uma determinada população celular.
2. As células-filhas derivadas de uma única célula-tronco devem se diferenciar em mais de um tipo celular.
3. Capacidade de repopular funcionalmente o tecido da qual se originou quando transplantada num receptor com alguma lesão.
4. Devem contribuir para a diferenciação da progênie *in vivo* mesmo na ausência de lesão tecidual (ZAGO E COVAS, 2006).

Apesar da grande diversidade celular encontrada em tecidos adultos, todas derivam de uma única célula-ovo, após a fecundação do óvulo pelo espermatozóide. Essa célula possui a capacidade de formar todos os tecidos do indivíduo adulto. A célula-ovo sofre mitose e forma várias outras células que progressivamente se tornam mais especializadas, restringindo sua capacidade de diferenciação. Entretanto, no adulto existem reservas de células indiferenciadas, as células-tronco (ZAGO E COVAS, 2006).

As células-tronco diferem de outras células, pois são indiferenciadas e não-especializadas, conseguindo se multiplicar por longos períodos mantendo-se indiferenciadas, ou seja, produzindo células idênticas a célula mãe. Além disso, as células-tronco são capazes de fazer divisão assimétrica, produzindo duas células filhas, uma é idêntica a célula mãe, indiferenciada, e a outra se diferencia conforme a necessidade do tecido (ZAGO E COVAS, 2006).

As células-tronco são classificadas quanto a potencialidade, que significa a sua capacidade de gerar tipos celulares, em totipotentes (células que podem se diferenciar em qualquer tecido do organismo humano, correspondem às células das

primeiras divisões celulares, após fecundação), pluripotentes (células que conseguem se diferenciar em quase todos os tecidos humanos, exceto anexos placentários) e multipotentes (células capazes de se diferenciar em muitos tipos celulares).

As células-tronco também podem ser classificadas quanto a origem em embrionárias e adultas. A célula-tronco embrionária é a célula pluripotente, capaz de originar todos os tecidos de um indivíduo adulto. É aquela da massa interna do blastocisto de um embrião nos primeiros estágios de divisão. A célula-tronco adulta é a célula obtida de tecidos após a fase embrionária. É uma célula indiferenciada que está presente em tecidos especializados. Possuem a característica de auto-renovação, originando cópias idênticas. Essas células conseguem se dividir em células progenitoras e posteriormente se diferenciar em células maduras especializadas. Podem ser encontradas na medula óssea, sangue, córnea, retina, cérebro, pâncreas, entre outros. Até o momento não está claramente elucidado as vantagens do uso terapêutico de um tipo celular em detrimento do outro (NIH, 2001).

2.1.1. MESENQUIMAIS

A medula óssea contém uma população rara de células tronco capaz de originar células do tecido conjuntivo e células do estroma medular, são as células-tronco mesenquimais. Essa fração corresponde a cerca de 0,001% a 0,01% de todas as células nucleadas da medula óssea (ZAGO E COVAS, 2006).

A característica fundamental dessas células em cultura é a sua diferenciação em osso, cartilagem e gordura. Mas estudos mostram que outros tecidos já foram obtidos a partir da célula-tronco mesenquimal, como a observação de miócitos e a diferenciação neural descrita por diversos autores (BOBIS et al., 2006).

As células-tronco mesenquimais parecem ser importantes na terapia de doenças cardiovasculares. Vários estudos mostram o benefício da terapia celular nessas patologias, como o estudo de Orlic e colaboradores em 2001 que demonstrou a

capacidade de recuperação de 68% da área infartada no coração de camundongos após injeção de células mononucleares.

O interesse nesse tipo celular está relacionando com uma propriedade importante dessas células: quando infundidas via intravenosa, são capazes de migrar especificamente para locais de injúria. Esta característica de procurar o local da lesão foi demonstrada em estudos de fratura óssea, infarto do miocárdio, injúria cerebral isquêmica (BARRY e MURPHY, 2004).

2.1.2. HEMATOPOIÉTICAS

As células-tronco hematopoiéticas são capazes de se diferenciar em todos os tipos de células sanguíneas, sendo responsáveis pela manutenção e proteção do organismo. Este processo é conhecido como hematopoese, inicia-se nas células tronco hematopoiéticas, que por meio da auto-renovação originam células filhas idênticas a célula mãe e as células progenitoras (NIH, 2001).

É uma população de células multipotentes muito rara, correspondendo a aproximadamente 0,05% a 0,5% do total de células da medula óssea e essa fração é ainda menor no sangue periférico. Em um indivíduo normal, a quantidade de células maduras no sangue é mantida dentro de limites estreitos e, em resposta a emergências como hemorragias ou infecções, a hematopoese é acelerada a fim de compensar a perda. São produzidos bilhões de novas células sanguíneas por dia em adultos devido ao curto período de vida dessas células (ZAGO E COVAS, 2006).

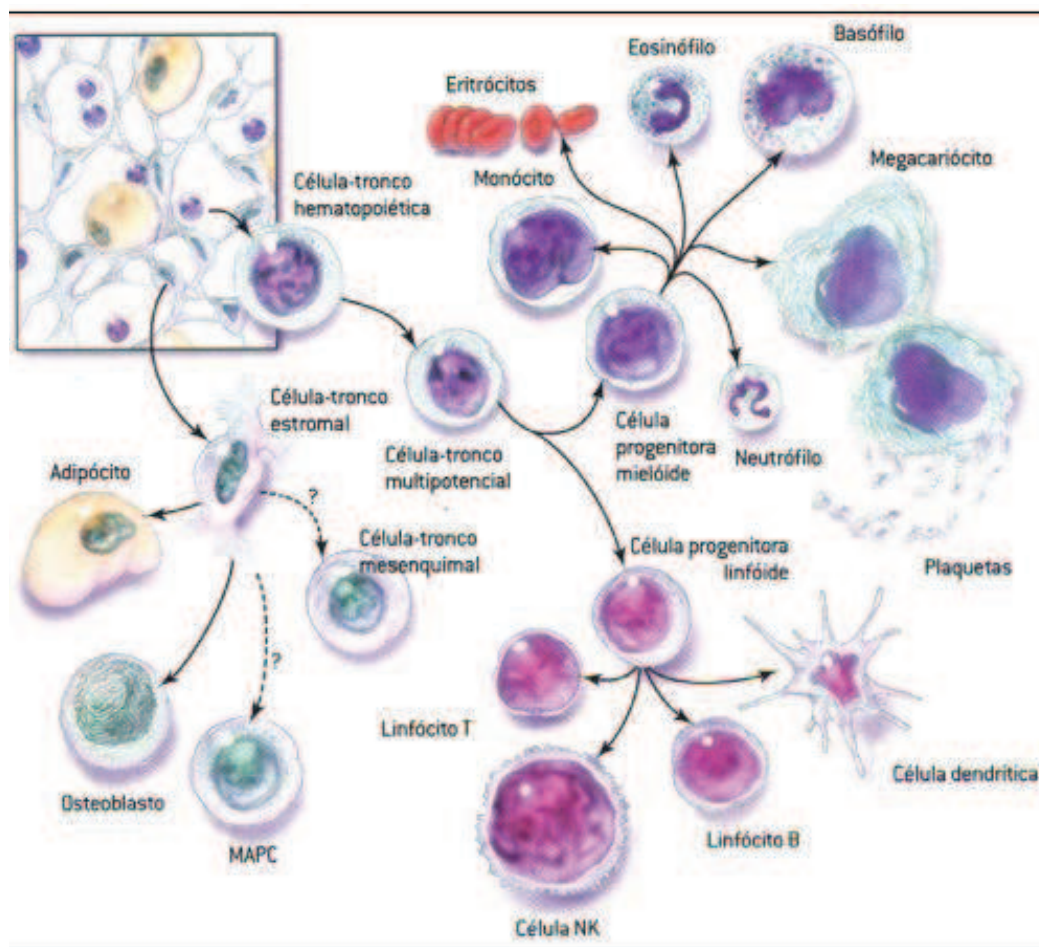


Figura 5 – Esquema de células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais. No canto superior esquerdo, o quadrado ilustra as populações celulares da medula óssea. Células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais acompanhadas de suas linhagens celulares. Modificado de Revista *Scientific American Brasil*, 2006.

2.2. CÉLULAS PROGENITORAS

Células progenitoras estão presentes em tecidos fetais ou adultos e são células parcialmente especializadas, dividindo-se em células diferenciadas. Quando uma célula-tronco se divide, uma das duas novas células geradas é muitas vezes uma outra célula-tronco capaz de se autoreplicar novamente. Em contrapartida, quando uma célula progenitora se divide, esta célula pode formar mais progenitoras ou pode formar duas células especializadas. As células progenitoras podem substituir células

que estão danificadas ou mortas, sendo capazes de manter a integridade e as funções de um tecido (NIH, 2001).

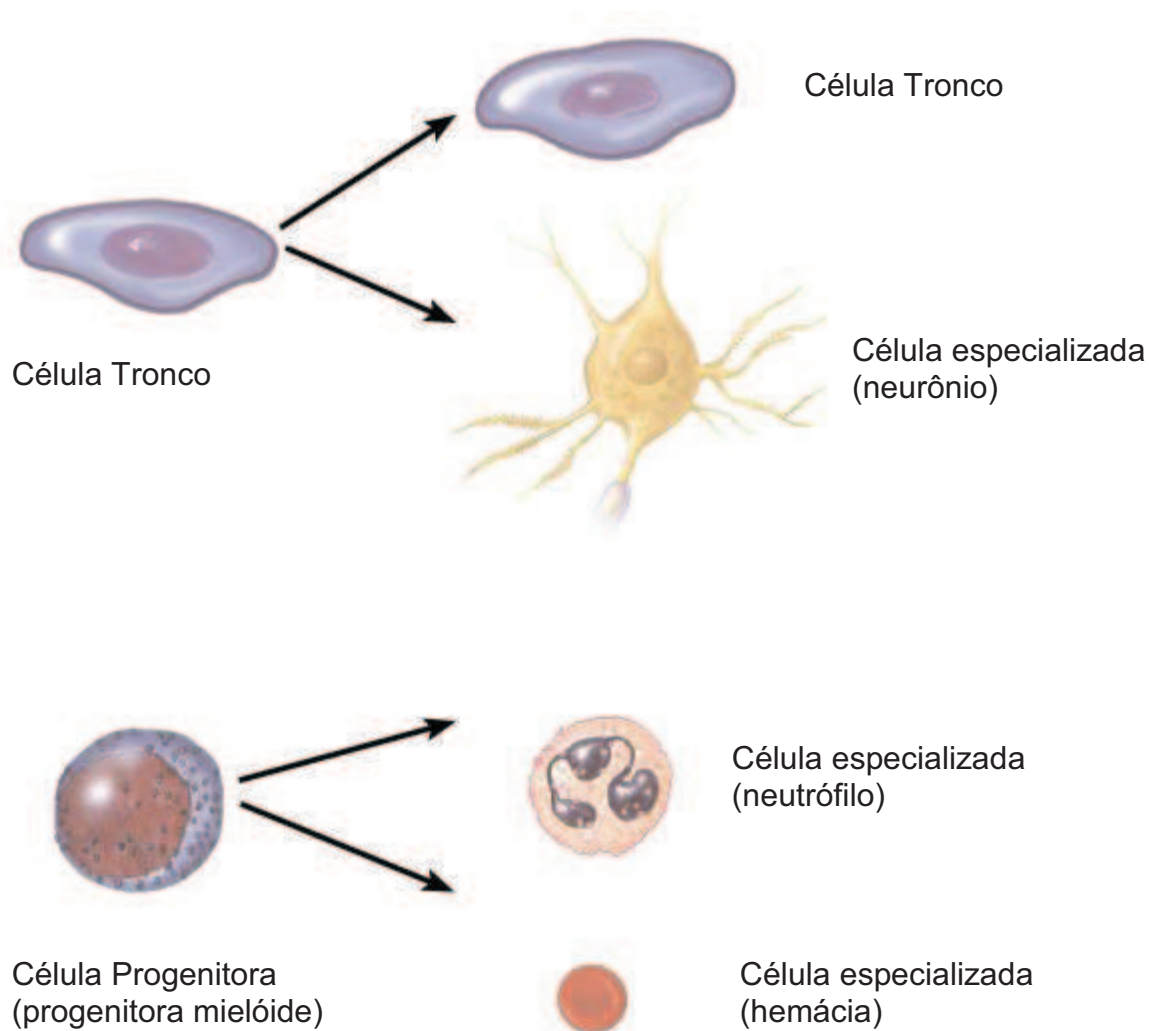


Figura 6 – Distinção entre célula-tronco e célula progenitora Modificado de NIH, 2001.

2.2.1. CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS

As células progenitoras endoteliais participam da vasculogênese e arteriogênese, sendo assim são funcionalmente importantes no reparo vascular. Estratégias terapêuticas promissoras são baseadas no conceito de que as CPEs podem se diferenciar em células semelhantes às endoteliais. Desde 1997, quando as CPEs foram descritas, vários estudos demonstraram sua participação no reparo de vasos danificados (Asahara et al., 1997; Kong et al., 2004). Sabe-se que fatores de risco

para doenças cardiovasculares como tabagismo, diabetes, hipertensão, hiperlipidemia contribuem para a redução do número e funcionalidade das CPEs (Hill et al., 2003).

Os mecanismos potenciais para as CPEs induzirem a angiogênese incluem um aumento do fornecimento das células endoteliais (CE) pela proliferação e diferenciação das CPEs ou em um aumento no fornecimento de fatores de crescimento para ativar CEs residentes maduras.

As CPEs expressão diversas proteínas, portanto podem ser caracterizadas por alguns antígenos específicos. Os dois principais marcadores das CPEs são: 1) receptor do fator de crescimento vascular endotelial (Flk-1) e 2) antígeno de célula tronco hematopoiética (CD 133) (CORBEIL et al., 1998; PURPURA et al., 2008).

2.3. CÉLULAS MADURAS DO SANGUE

As células maduras do sangue são divididas em duas linhagens: linfóide (linfócitos) e mielóide (eritrócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e megacariócitos). Abaixo um descritivo das principais características dessas células.

Linfócitos: são as principais células defensoras de nosso corpo. Existem os linfócitos T e os linfócitos B. Linfócitos T: atuam na imunidade mediada por células e na regulação da síntese de anticorpos. Linfócitos B: atuam na imunidade humoral, sintetizam anticorpos e os secreta após sua diferenciação em plasmócitos.

Hemácias: são células anucleadas em forma de disco bicôncavo. Sua principal função é o transporte de oxigênio e gás carbônico.

Monócitos: são encontrados no sangue e quando vão para os tecidos, se transformam em macrófagos. Os macrófagos fagocitam agentes agressores e iniciam a resposta imune como células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T.

Basófilos: estão envolvidos em reações alérgicas de hipersensibilidade imediata e por isso são muito poucos no sangue periférico.

Eosinófilos: modulam reações de hipersensibilidade.

Neutrófilos: é ativo na defesa do organismo contra infecções através da motilidade, fagocitose, quimiotaxia, e digestão de microorganismos (SOUZA e ELIAS, 2005).

Quando a fração de células mononucleares é isolada através de um gradiente de densidade, é possível observar a presença de linfócitos e monócitos. Discute-se na literatura qual terapia possui maior potencial terapêutico: o *pool* de células da fração CMN ou populações celulares específicas.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos da terapia com células mononucleares sobre as lesões ateroscleróticas em camundongos apoE KO.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar possíveis alterações de colesterol plasmático nos grupos estudados;
- Estudar por meio de histologia as lesões ateromatosas no arco aórtico dos camundongos experimentais;
- Pesquisar o possível remodelamento vascular pela análise morfométrica vascular;
- Localizar as células mononucleares por meio da coloração *X-Gal* no arco aórtico dos animais que receberam a terapia celular;
- Avaliar a migração de células progenitoras endoteliais através da imunohistoquímica no arco aórtico;
- Analisar a influência da terapia sobre a produção de ânions superóxido e expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS).

Metodologia

4. METODOLOGIA

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos fêmeas knockout para a apolipoproteína E (apoE KO, figura 7) e aos 4 meses de idade esses animais eram divididos em dois grupos: 1) apoE KO: grupo controle (n=8) e 2) apoE KO-CMN: grupo que recebeu a terapia com células mononucleares (CMN) (n=8). Os animais transgênicos para a enzima β -galactosidase (*lacZ*) com até 4 meses de idade foram utilizados como doadores de CMN. Todos os animais foram provenientes do biotério do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular (LTCC), do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais apoE KO (6 meses de idade) foram submetidos a dieta hipercolesterolêmica (1.25% de colesterol - DIETA AIN93G) por 4 meses e submetidos a condições de ambiente com controle claro/escuro num ciclo de 12 horas, bem como controle de temperatura (22°C) e umidade (70%). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – EMESCAM (CEUA 003/2008).

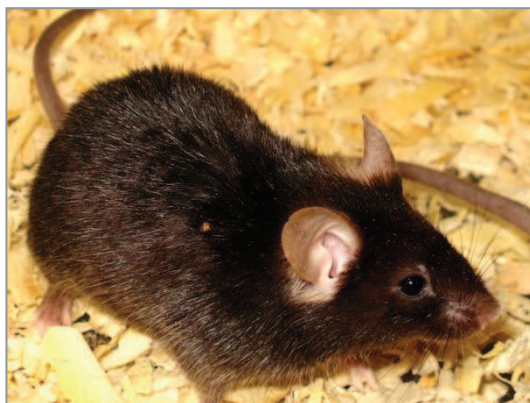


Figura 7 – Animais isogênicos apoE KO e LacZ.

4.2. ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO BAÇO

Para o isolamento, foram utilizados animais *lacZ* como doadores de CMN. Os animais eram eutanasiados com injeção intraperitoneal de tiopental sódico

(100mg/kg). Todo o material era previamente autoclavado para evitar a contaminação das células. O animal era higienizado com álcool 70% e com auxílio de uma tesoura e pinça o baço era removido (Figura 8A) e colocado em placa de Petri com gelo.

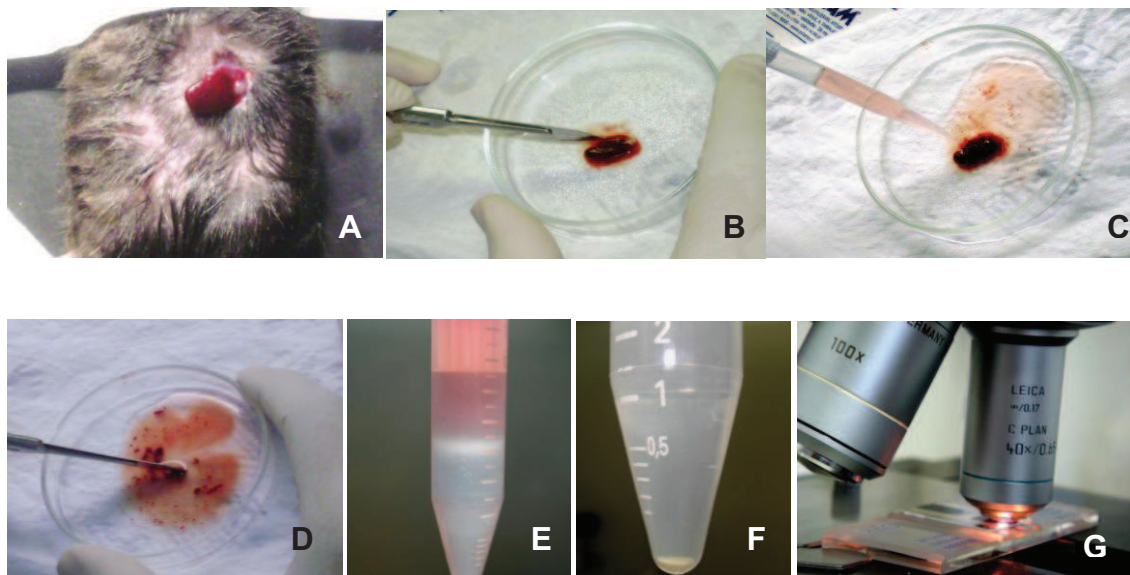


Figura 8 - Isolamento das células mononucleares. A: Remoção do baço do animal *lacZ*. B: Maceração do baço. C: Adição de DMEM para nutrir as células. D: Homogeneização do órgão. E: Nuvem de células mononucleares isolada pelo gradiente de densidade. F: Células mononucleares. G: Contagem das células mononucleares em câmara de Neubauer no microscópio.

Com o auxílio de um bisturi o órgão foi macerado (Figura 8B), posteriormente adicionou-se meio de cultura DMEM (GIBCO) para nutrir as células até o próximo passo do experimento (Figura 8C). O material foi homogeneizado e colocado em um tubo Falcon (BD) em um volume de 5ml (células + meio de cultura)(Figura 8D). Em seguida foi feita centrifugação (Equipamento – Eppendorf 5702) por 10 minutos a 1200rpm (rotações por minuto).

Desprezamos o sobrenadante e ressuspendemos o precipitado de células em 4ml de meio de cultura DMEM. Em outro tubo Falcon adicionou-se 4ml de gradiente de densidade Histopaque 1083® (SIGMA ALDRICH), que consiste em uma solução com densidade de 1,083 g/mL, específico para células de ratos e camundongos.

A solução com 4mL de células com meio de cultura foram pipetados e colocados no outro tubo pela parede sobre o gradiente de densidade Histopaque com cuidado para não misturar as duas fases. O tubo contendo 4mL de células + 4mL de Histopaque, totalizando um volume final de 8ml, foi levado para centrifuga (Eppendorf 5702) com rotor swing-bucket, sem freio, por 30 minutos a 1500rpm.

Durante a centrifugação, os eritrócitos e leucócitos granulócitos atravessam a fase orgânica, que corresponde ao gradiente de densidade Histopaque, e sedimentam-se no fundo do tubo. A “nuvem” de células mononucleares encontra-se na interface entre as duas soluções (Figura 8E). Na fase superior, fase aquosa, encontra-se as plaquetas e proteínas plasmáticas.

O anel de células mononucleares formado entre o meio de cultura e o gradiente de densidade foi imediata e delicadamente recolhido com uma pipeta de vidro. O material aspirado foi colocado em um novo tubo Falcon. Como o gradiente de densidade Histopaque é altamente tóxico para as células, é necessário fazer lavagens seriadas a fim de eliminar possíveis resíduos remanescentes desse gradiente. Logo, centrifugamos as células por 10 minutos a 1200 rpm com uma solução salina tamponada (*Phosphate Buffer Solution* – PBS 10%) para lavar o excesso de gradiente. Essa lavagem é repetida três vezes para garantir a remoção completa do gradiente de densidade (Figura 7F). A última etapa desse protocolo consiste em remover o excesso de PBS após a última lavagem e ressuspender as células em 1ml de meio de cultura DMEM.

4.3. QUANTIFICAÇÃO EM CÂMARA DE NEUBAUER

A contagem das células mononucleares em câmara de Neubauer, também conhecida como hemocitômetro, é um método manual tradicional que permite estimar o número de células por mililitros da suspensão. A câmara de Neubauer é um tipo especial de lâmina de microscópio composta por duas câmaras de contagens separadas por uma depressão transversal. Cada câmara contém uma superfície espelhada quadriculada de dimensão 3x3 mm.

A região quadriculada é dividida em nove quadrantes, cada qual de dimensão 1x1 mm. Os quadrantes utilizados para a contagem são os quatro externos. Quando cobertos por uma lamínula específica da câmara, cada quadrante confere um volume de $0,1 \text{ mm}^3$, ou $1 \times 10^4 \text{ ml}$. A contagem total do número de células é realizada nos quatro quadrantes das duas câmaras de contagem. Foram feitas duas contagens e a média do número de células foi calculado (Figura 8G).

Cálculo para a contagem das células:

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

4.4. INFUSÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES

Com o número de células estabelecido através da câmara de Neubauer após o protocolo de isolamento, ressuspendeu-se 10^6 células em $100 \mu\text{l}$ de meio de cultura DMEM. O animal foi colocado em um contentor por poucos minutos (Figura 9A).

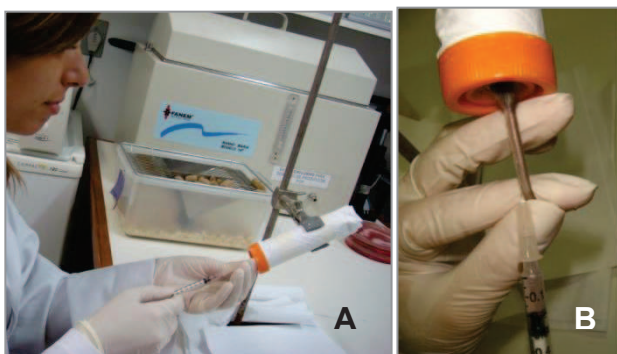


Figura 9 - Administração das células mononucleares. A: Animal no contentor com a cauda exposta. B: Infusão das CMN através da veia caudal.

O grupo apoE KO-CMN recebeu 10^6 células em $100 \mu\text{l}$ de meio de cultura. As infusões foram feitas lentamente através da veia caudal do animal com uma agulha tamanho 30G. Foram realizadas 8 infusões, células + meio de cultura, por semana alternando-se semanalmente as veias laterais caudais. O grupo que não recebeu as injeções, apoE KO, serviu como grupo controle. Nós incluímos ainda um grupo apoE

KO de 6 meses de idade que recebeu apenas o meio de cultura DMEM, para verificar a interferência do veículo nos resultados.

4.5. DOSAGEM DE COLESTEROL PLASMÁTICO

Aos 6 meses de idade os animais apoE KO eram eutanasiados com sobredose de anestésico tiopental sódico (100mg/kg i.p.), nesse momento o sangue era coletado através de punção intracardíaca para posterior análise bioquímica. O sangue total coletado era centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos. As dosagens de colesterol total em soro de camundongos foram realizadas pelo método enzimático colorimétrico utilizando “kit” da BIOCLIN. O colesterol total foi determinado após a hidrólise enzimática e oxidação das amostras do soro. O indicador quinoneimina é formado a partir do peróxido de hidrogênio e 4- aminofenazona na presença do fenol e peroxidase, obtendo-se assim uma coloração rosa em intensidade proporcional à quantidade de colesterol da amostra. Todas as amostras foram lidas num espectrofotômetro (Biospectro SP-220) a 500 nm.

4.6. ANÁLISE HISTOLÓGICA DA LESÃO ATEROMATOSA

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (100 mg/kg, ip), e posteriormente realizou-se uma incisão torácica de forma que o coração estivesse com livre acesso para realização da perfusão no animal. 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%) ambos com pressão controlada igual à pressão arterial média do animal. Uma solução simples para fazer a perfusão do animal com pressão controlada por força da gravidade, por meio da pressão hidrostática determinada pela altura da coluna líquida (1,36 cm H₂O = 1 mmHg), com uso do frasco de Mariotti associado a um equipo. A perfusão sob pressão controlada preserva o formato das artérias, evitando também possíveis rupturas e degradação das placas ateromatosas. Ao término da perfusão a artéria aorta foi removida dos animais e

estocada em recipiente plástico contendo solução fixadora de PBS (0,1 M, pH 7,4) com 10% de paraformaldeído 4%, até o momento da preparação histológica.

As secções foram coradas com Oil- Red-O, conferindo uma cor vermelho-alaranjada aos lipídios presentes. Após a retirada do excesso de tecido conjuntivo perivascular do arco aórtico, fez-se com um bisturi a secção transversa do arco aórtico, que foi emblocado em gelatina incolor (Dr. Oetker, Brasil) a 30% e posteriormente congelados. O bloco de gelatina contendo o segmento da aorta foi posicionado para que se obtivessem cortes transversos com 12 μm de espessura em um criostato (Jung CM 1800 – Leica,) a -16°C .



Figura 10 - Criostato Jung CM 1800 – Leica, pertencente ao Departamento de Patologia do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo. Em detalhe, o bloco de gelatina posicionado pronto para a obtenção de cortes transversos da aorta.

Os cortes teciduais foram corados com Oil-Red-O (Sigma-Aldrich) para detecção de lipídios neutros. A solução de estoque foi preparada contendo 300 mg de Oil-Red-O em 100 ml de 2-propanol ou isopropanol (Reagentes Analíticos, Dinâmica), e a solução para corar contendo 24 ml de Oil-Red-O do estoque e 16 ml de água destilada misturados por 10 minutos, centrifugados e filtrados. As lâminas contendo os cortes foram posicionadas a uma altura de cerca de 2 mm da superfície de um recipiente fechado, para evitar a evaporação do solvente, de forma a se criar então uma interface líquida (solução de Oil-Red-O) entre o vidro da lâmina e do recipiente. Este posicionamento permite que precipitados cristalinos formados se depositem

no fundo do recipiente, e não na lâmina, sendo esta formação de p recípidos do corante um grande inconveniente dessa coloração. Também, para minimizar esse problema a solução de Oil-Red-O para coloração foi centrifugada por um período de 10 minutos a 4000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415D). Os cortes ficaram em contato com o corante por 12 minutos, e posteriormente também foram lavados em água corrente por 12 minutos.

Após o período de secagem das lâminas, os cortes foram fotografados utilizando a objetiva de 4x de um microscópio trinocular (Olympus AX70) acoplado a uma câmera digital (VK-C150, Hitachi, Japão) e as imagens foram analisadas em programas de imagem específicos (Leica EWS 2100 e ImageJ).

4.7. MORFOMETRIA

Os cortes histológicos foram analisados no Image J (domínio público – *National Institute of Health, USA*), a área de secção transversa vascular (A_{STV}) e a área de secção transversa luminal (A_{STL}) foram calculadas. O remodelamento vascular foi obtido dividindo cada A_{STV} pela média de A_{STV} do animal selvagem C57BL/6J. A ausência do remodelamento era caracterizada quando o valor da divisão entre as áreas era de 0.95 a 1.05, foi considerado remodelamento negativo quando o valor era inferior a 0.95 ou remodelamento positivo quando superior a 1.05 (GLAGOV et al., 2002).

4.8. LOCALIZAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES

Para localizar as células dos doadores *lacZ* que foram infundidas nos camundongos apoE KO-CMN fornecemos o substrato da enzima (X-gal) superexpressa pelos animais *LacZ*, a β -galactosidase. Para isso foi retirada a aorta torácica dos animais apoE KO e apoE KO-CMN. A aorta foi aberta longitudinalmente a fim de expor a camada íntima do vaso, permitindo o contato com a solução X-gal (NaCl 150mM, MgCl₂ 2mM, K₃ 5mM, K₄ 5mM, Ácido Cítrico 40mM, Na₂HPO₄ 12mM e 1mg/ml de X-gal solubilizado em DMSO).



Figura 11 - Abertura longitudinal da aorta torácica.

Quando as células dos animais *lacZ* são expostas a essa solução, a enzima β -galactosidase cliva seu substrato, a molécula X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo), formando um produto azul. A aorta torácica foi incubada na solução de X-gal e colocada na estufa a 37°C por aproximadamente 3 horas. Em seguida, a peça foi lavada duas vezes em PBS.

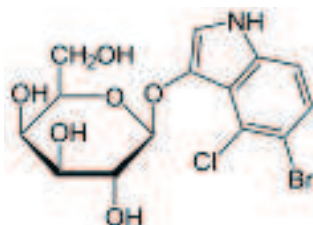


Figura 12 - Molécula 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo.

4.9. MEDIDA DE ÂNIONS SUPERÓXIDO

O corante fluorescente hidroetidina (HE) foi utilizado para avaliar a produção de ânions superóxido *in situ*. A HE é livremente permeável às células e na presença de O_2^- é oxidada a brometo de etídio (EtBr), onde é preso por interagir com o DNA (Rothe & Valet, 1990). O EtBr é excitado em 488 nm com um espectro de 610 nm. Decorridos sete dias após a infusão das CMN, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (100 mg/kg, ip.), e posteriormente realizou-se uma incisão torácica

de forma que o coração estivesse com livre acesso para realização da perfusão no animal. Para execução da perfusão fez-se uma incisão no átrio direito e em seqüência infundiu-se 50 ml de solução de KREBS-HEPES (HEPES 9,4 mM; NaCl 132 mM; glicose 5 mM; KCl 4 mM; MgCl₂ 0,49 mM; CaCl₂ 1mM; pH 7,4 à 37°C) no ventrículo esquerdo, com pressão controlada igual à pressão arterial média do animal. Cortes de aortas congelados em Tissue Tek, em uma espessura de 10 µm, foram acondicionados em lâminas de vidro superfrost Plus®, e secos por 2 horas à 37°C, após a criotomia. Em seguida estes cortes não fixados foram incubados com uma solução de dihidroetidina 2 µM (diluído em tampão HEPES). Após serem recobertos por uma lamínula, as lâminas de vidro foram acondicionadas em uma câmara umedecida, protegida da luz, e então incubadas, à 37°C, por 30 minutos. As imagens deste ensaio foram obtidas em um microscópio invertido de fluorescência (Nikon, modelo Eclipse Ti). Os parâmetros estabelecidos para o laser utilizados foram idênticos entre os grupos pesquisados. Para captura das imagens foi utilizada a objetiva de 20x e programa específico para análise de emissão de fluorescência (NIS Elements, Nikon).

4.10. IMUNOHISTOQUÍMICA

Os cortes da aorta colocados em lâminas gelatinizadas foram secas com secador e fixadas com acetona a – 20°C por 5 minutos sob agitação lenta. As lâminas secaram em temperatura ambiente por 30 minutos. Lavamos as lâminas com PBS e colocamos na estufa a 37°C por 10 minutos. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário na concentração 1:50. Os anticorpos primários utilizados foram: eNOS – NO sintase endotelial (BD Pharmingen); Flk-1 – receptor do fator de crescimento vascular endotelial (Abcam); CD133 – antígeno de célula tronco hematopoiética. Após lavagem para remoção do excesso do anticorpo primário, foi utilizado um “kit” Vectastain ABC Elit para detecção colorimétrica com DAB ou NovaRED (Vector Laboratories).

4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Foi aplicado o teste *t* de Student foi utilizado para amostras independentes. Análise de variância de 1 via (ANOVA), seguida do teste *post hoc* de Tukey foi utilizado quando apropriado. O *software* PRISMA (versão 5) foi usado para análise estatística e obtenção dos gráficos. As diferenças foram consideradas significantes quando * $p < 0,05$ ou ** $p < 0,01$.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. DOSAGEM DE COLESTEROL PLASMÁTICO

Após o período de oito semanas foi coletado o sangue dos animais apoE KO para medida bioquímica de colesterol total. Os valores de colesterol não apresentaram variação entre os grupos controle (1176 ± 213 mg/dL) e os animais ateroscleróticos que receberam as infusões de células mononucleares (1241 ± 167 mg/dL), de acordo com a figura 13. As medidas de colesterol total também foram realizadas no grupo apoE KO que recebeu apenas o veículo (DMEM) e no grupo apoE KO-4meses. Os valores obtidos (não apresentados na figura abaixo) não foram diferentes dos valores médios encontrados nos principais grupos do estudo (apoE KO e apoE KO-CMN).

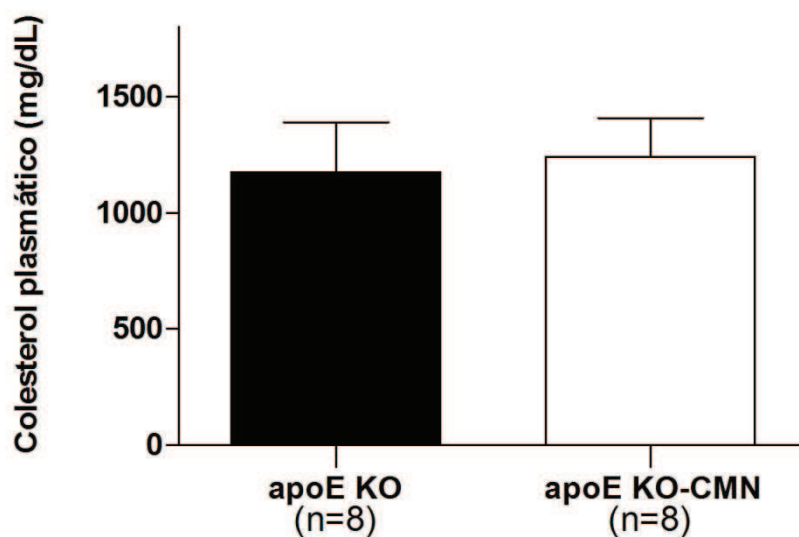


Figura 13 - Análise de colesterol plasmático dos grupos apoE KO e apoE KO-CMN. Dados apresentados como média \pm EPM.

5.2. ÁREA DE DEPOSIÇÃO LIPÍDICA

Os cortes histológicos do arco aórtico foram submetidos à coloração com Oil-Red-O que cora lipídeos neutros. O grupo de animais ateroscleróticos que recebeu as oito infusões endovenosas com células mononucleares, apoE KO-CMN, apresentou uma redução da lesão aterosclerótica. Uma grande deposição lipídica foi observada nos arcos aórticos dos animais apoE KO (grupo controle) e nos animais apoE KO que receberam apenas o veículo ($0.117 \pm 0,016 \text{ mm}^2$ e $0.109 \pm 0,012 \text{ mm}^2$, respectivamente). Em contraste, a área de deposição lipídica foi reduzida em aproximadamente 45% ($p < 0.01$) dos animais apoE KO-CMN de mesma idade (6 meses). O valor encontrado para o grupo apoE KO-CMN foi estatisticamente similar ao resultado observado no grupo apoE KO-4meses ($0.051 \pm 0,004$ vs. $0.049 \pm 0.005 \text{ mm}^2$, respectivamente).

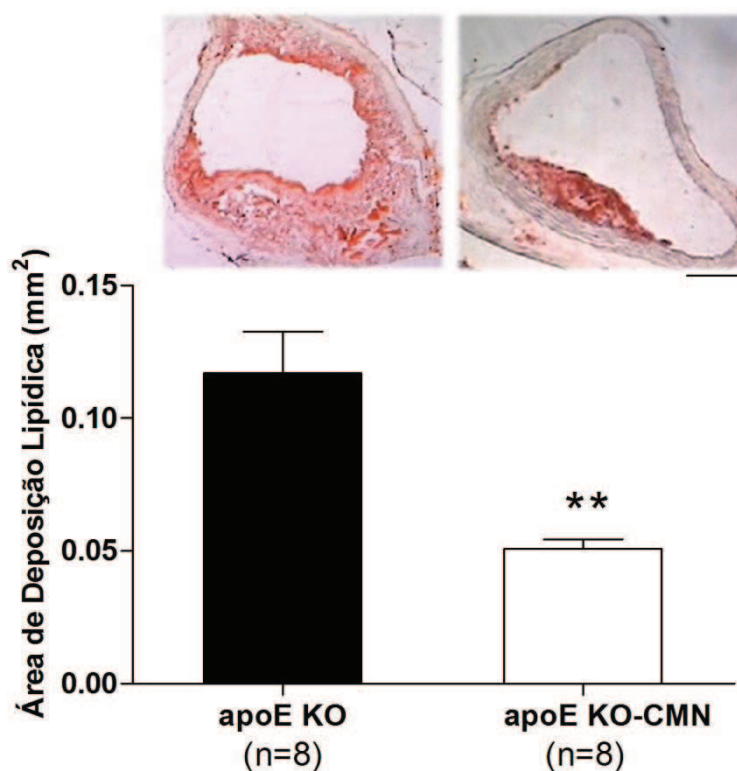


Figura 14 – Efeito da terapia com CMN sobre a deposição lipídica em aortas de camundongos apoE KO. Na parte superior da figura: fotografias típicas do arco aórtico comprando a aorta do apoE KO e a aorta do apoE KO-CMN. (Oil-Red-O, x4, Barra: 100 μ m). O gráfico mostra a área de deposição lipídica dos animais apoE KO e apoE KO-CMN. Os valores estão expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ quando comparado ao apoE KO (Teste *t* de Student).

5.3. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

A figura abaixo resume os dados obtidos através da análise morfométrica da área de secção transversa das aortas e o remodelamento vascular dos animais apoE KO e apoE KO-CMN, utilizando o animal selvagem C57 como valor de referência. A área de lúmen foi estatisticamente similar em todos os grupos analisados. No entanto, a área externa do vaso estava aumentada no grupo controle apoE KO quando comparado ao grupo C57. Dado normalizado com a administração das células mononucleares. Observou-se um remodelamento positivo (\square 1.05) no grupo apoE KO que foi prevenido com a terapia celular.

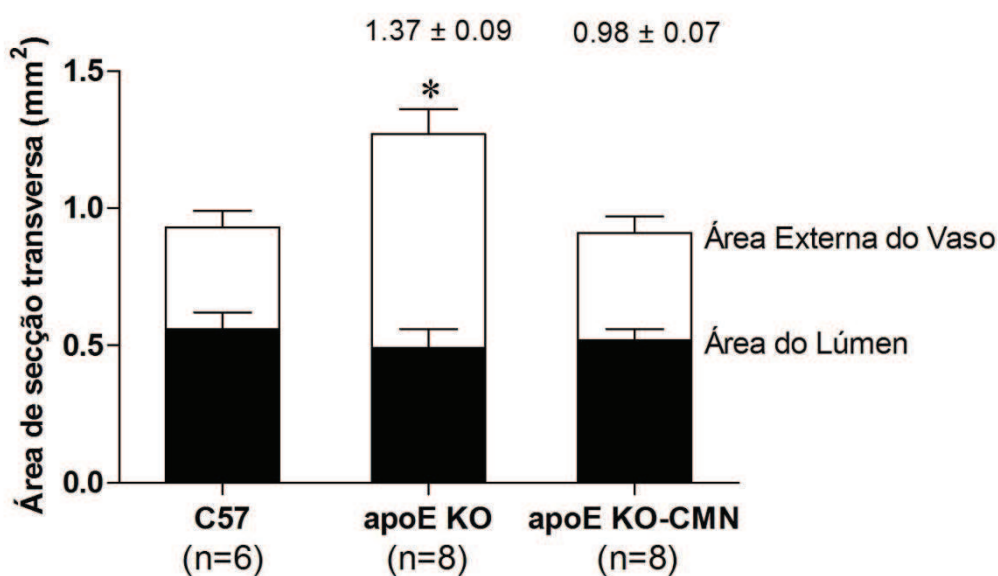


Figura 15 – Efeito da terapia com CMN sobre as áreas de secção transversa vascular e luminal. Valores expressos como média \pm EPM. Os números sobre as barras mostram os valores de remodelamento usando o grupo C57 como referência.

5.4. LOCALIZAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES COM X-GAL

A artéria aorta torácica foi removida ao final do protocolo experimental e submetida a coloração com solução X-gal. Os grupos foram submetidos ao mesmo período de incubação (aproximadamente 3 horas). A figura abaixo mostra típicos da coloração realizada em face com X-gal. Os animais do grupo apoE KO-CMN, grupo que recebeu as células mononucleares dos animais *lacZ*, apresentaram coloração azulada, indicando as células β -gal positivas. Nenhuma marcação foi encontrada no grupo controle apoE KO.

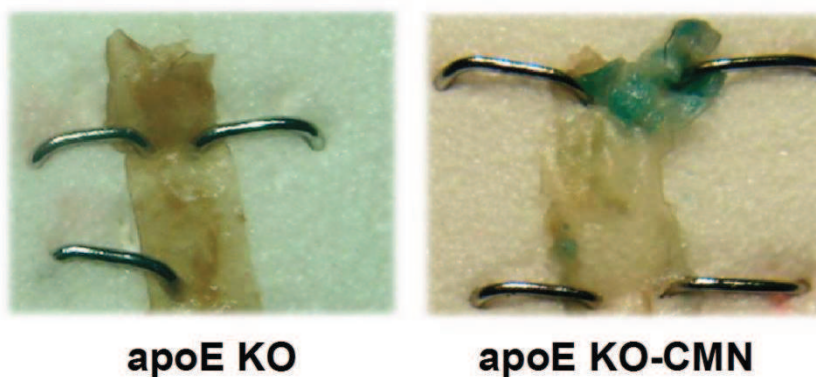


Figura 16 - Fotos representativas da reação *en face* mostrando as células β -gal positivas (em azul) derivadas dos animais *lacZ* na aorta do animal apoE KO-CMN. Em comparação, ausência de coloração observada na aorta do apoE KO.

5.5. DETECÇÃO DE ANIONS SUPERÓXIDO

Foi realizado o ensaio com hidroetidina para a detecção de ânions superóxido. É possível observar uma intensa fluorescência na foto típica da aorta do grupo apoE KO, mas não no grupo apoE KO-CMN. Na média, as aortas dos animais apoE KO-CMN exibiram aproximadamente 60% menos fluorescência que os animais apoE KO. Esse dado infere uma menor produção de ânions superóxido no grupo que recebeu a terapia com células mononucleares.

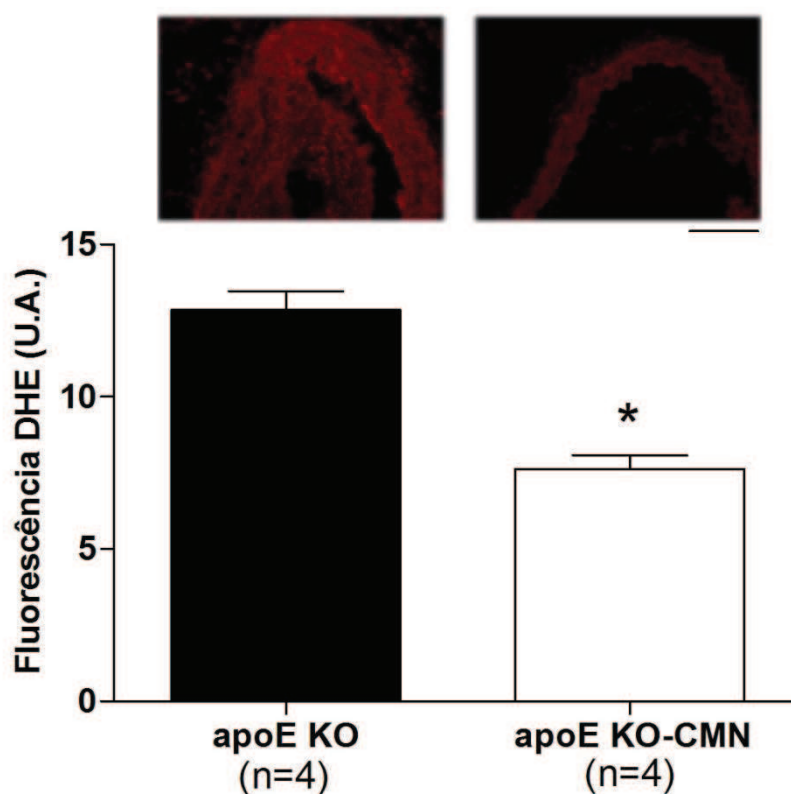


Figura 17 – Efeito da terapia com CMN sobre a produção de ânions superóxido em aortas de animais apoE KO. Na parte superior da figura, observa-se uma intensa fluorescência na aorta do apoE KO quando comparado ao apoE KO-CMN (x20, Barra: 50µm). O gráfico mostra a fluorescência em unidades arbitrárias (U.A.) comparando os grupos apoE KO e apoE KO-CMN. Os dados estão expressos em média \pm EPM. (* $p < 0.05$ comparado ao apoE KO, teste t de Student).

5.6. IMUNOHISTOQUÍMICA

Foi avaliada a expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) através da imunohistoquímica qualitativa. O grupo apoE KO-CMN apresentou uma expressão aumentada de eNOS quando comparado ao grupo apoE KO.

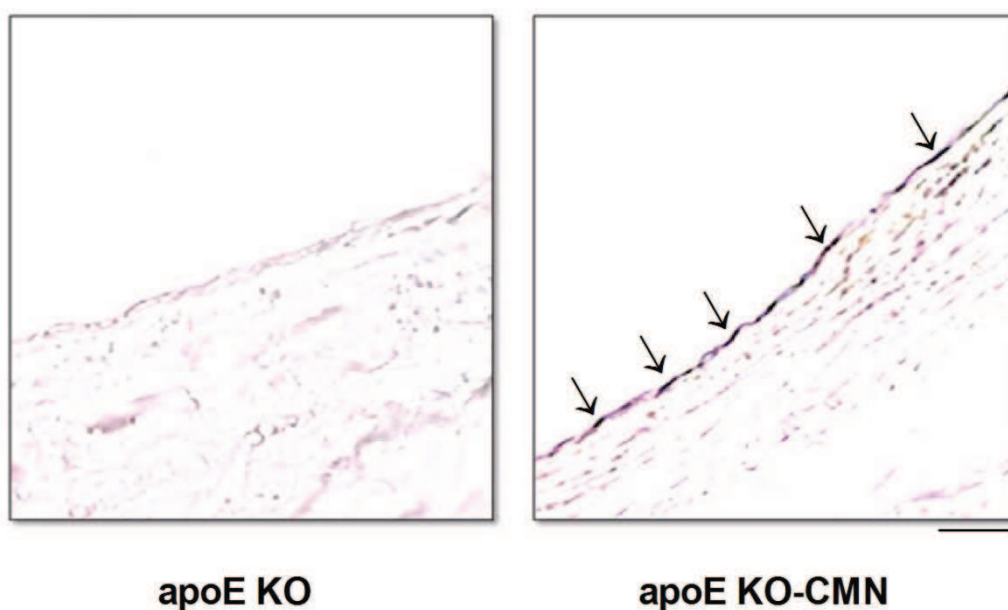


Figura 18 – Efeito da terapia com CMN sobre a expressão da eNOS em aortas de animais apoE KO. Fotografias representativas revelam a imunoreação positiva (precipitado marrom, apontado pelas setas) para eNOS no endotélio do animal apoE KO-CMN comparado ao animal apoE KO. (Coloração com DAB, x20. Barra: 50µm).

Adicionalmente, confirmou-se a migração (*homing*) de células progenitoras endoteliais por imunohistoquímica para Flk-1 e CD 133, ambos marcadores para CPEs, que revelou uma intensa marcação na aorta dos animais apoE KO-CMN comparados ao grupo apoE KO.

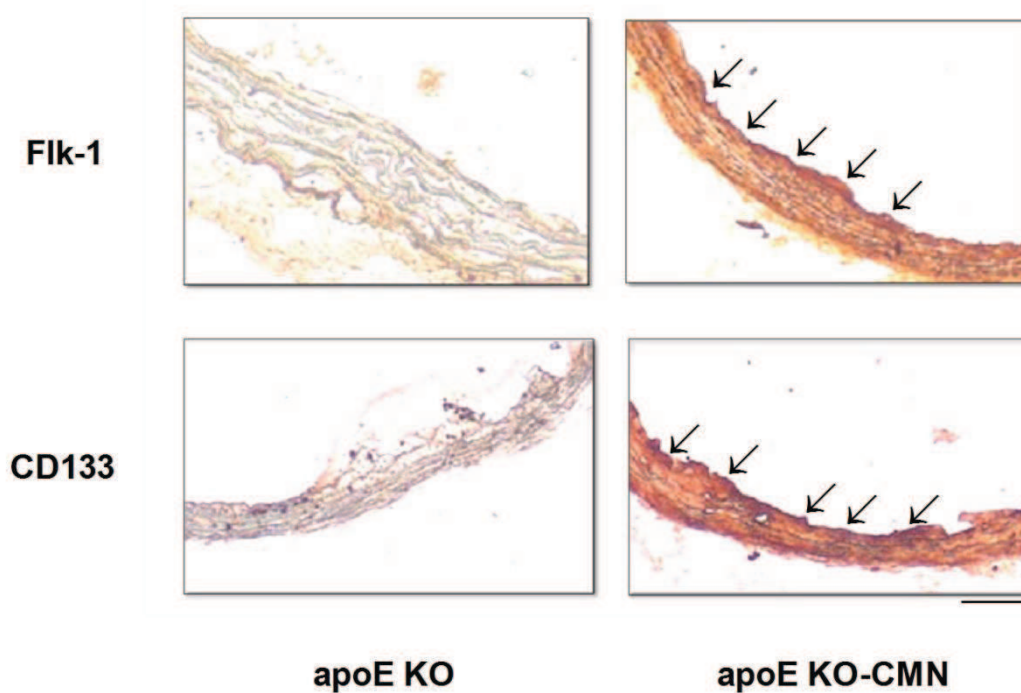


Figura 19 – Homing das CPEs após terapia com CMN. Fotografias típicas da imunohistoquímica realizada para os marcadores de CPE (Flk-1: receptor do fator de crescimento vascular endotelial e CD 133: antígeno de célula-tronco hematopoiética). O grupo apoE KO-CMN apresentou uma intensa marcação (precipitado vermelho) (x20, Barra: 50 μ m).

Discussão

6. DISCUSSÃO

A aterosclerose, uma doença crônico-degenerativa que atinge a parede de artérias de médio e grande calibre, especialmente presente nas sociedades ocidentais, é a maior causa das doenças cardiovasculares (SCOTT, 2004). Alguns pesquisadores têm estudado o efeito da terapia celular (RAUSCHER et al., 2003; CHADE et al., 2009; KIM et al., 2011) na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares. Assim, este trabalho objetivou avaliar os efeitos da terapia celular sobre as lesões ateroscleróticas em camundongos apoE KO.

Os resultados desse estudo mostraram que oito semanas de terapia com células mononucleares resultou na atenuação das lesões ateroscleróticas de aortas em camundongos apoE KO através do *homing* de CPE, acompanhado de redução na produção de ânions superóxido e aumento da expressão de eNOS.

As células-tronco e progenitoras, subpopulações das células mononucleares, possuem características únicas que as tornam ideais para propostas terapêuticas. Essas células são indiferenciadas, não-especializadas e podem se dividir simétrica e assimetricamente durante longos períodos. Devido a essas propriedades, surge o interesse dos pesquisadores em usar essas células como ferramenta de tratamento. Como exemplo, Shintani e colaboradores em 2001 mostraram a formação de vasos colaterais, aumento da densidade capilar e melhora da perfusão após transplante de células tronco derivadas da medula óssea em um modelo de doença arterial periférica realizado em coelhos. Mas os estudos transcendem os modelos experimentais, como o trabalho desenvolvido por Perin e colaboradores em 2003 que observaram melhora da função contrátil e aumento da fração de ejeção em pacientes submetidos a angioplastia que receberam a infusão intracardíaca de células-tronco.

No presente estudo nós observamos que as células mononucleares possuem propriedades ateroprotetoras no modelo murino de aterosclerose, o camundongo apoE KO, mesmo em condições de hipercolesterolemia. Cabe salientar que o camundongo apoE-KO é um modelo interessante para o estudo da aterosclerose, uma vez que esse modelo murino desenvolve espontaneamente lesões

ateroscleróticas, semelhante ao que ocorre em humanos. No entanto, é sabido que os camundongos fêmeas desenvolvem aterosclerose mais tardiamente quando comparado aos machos. Os camundongos apoE-KO machos apresentam maior desenvolvimento de placa aterosclerótica entre a décima quarta e vigésima primeira semana de vida. Diferente das fêmeas que apenas a partir da vigésima primeira até a trigésima segunda semana de idade desenvolvem uma grande área de placa (NELSON et al, 2007).

O desenvolvimento da aterosclerose foi acelerado pela dieta hipercolesterolêmica, no entanto, o tratamento contínuo com células mononucleares derivadas de animais *lacZ* jovens causou uma intensa atenuação da lesão aterosclerótica, sem alterar os níveis de colesterol plasmático. A dieta acelera o desenvolvimento da aterosclerose nesses animais, mas a terapia celular não influencia os níveis de colesterol plasmático. Todos os grupos apresentaram colesterolemia acima de 1000 mg/dL. Como observado no trabalho de Nakashima e cols., em que o colesterol dos camundongos apoE KO com dieta normocolesterolêmica tiveram uma média de 600mg/dL, enquanto que os animais que foram alimentados com dieta hipercolesterolêmica variaram de 1085 a 4402 mg/dL. A variação nos níveis de colesterol entre os animais foi grande, mas sempre acima dos valores encontrados em animais expostos a dieta normocolesterolêmica (NAKASHIMA et al., 1994). Na literatura os estudos que utilizam animais apoE KO e tratam a aterosclerose com células mononucleares não apontam mudanças na colesterolemia, apesar dos protocolos experimentais serem divergentes (RAUSHER et al., 2003; STREHLOW et al., 2003; WASSMANN et al., 2006).

Nossos resultados mostraram que a terapia com células mononucleares foi capaz de reduzir aproximadamente 45% das lesões ateroscleróticas dos animais apoE KO-CMN. De acordo com os nossos resultados estão os estudos realizados em aortas e carótidas de animais apoE KO tratados com células mononucleares (RAUSCHER et al., 2003; NELSON et al., 2007; WERNER et al., 2002).

No estudo de Rauscher e cols. camundongos apoE-KO fêmeas com dieta hipercolesterolêmica (1,25% de colesterol) receberam frações hematopoiéticas e mesenquimais derivadas da medula óssea de camundongos apoE-KO machos. Os

camundongos receptores com 14 semanas de idade após receberem 6 infusões celulares (1×10^6) demonstraram uma diminuição da lesão aterosclerótica nas análises histológicas e *en face*. Com a análise do Oil-Red-O, foi observado deposição lipídica significativamente menor nos animais tratados com células da medula óssea. Nesse estudo foi possível identificar vários tipos celulares, indicando que possivelmente diversas células estão envolvidas no reparo vascular.

Já o grupo de Nelson e colaboradores (2007) observou a habilidade ateroprotetora das células mononucleares da medula óssea apenas quando as células de animais fêmeas eram administradas a camundongos apoE-KO machos. Os camundongos fêmeas que receberam as células mononucleares de machos não apresentaram redução de placa (NELSON et al., 2007). Ao fim do término do protocolo os animais possuíam 21 semanas. Neste trabalho as fêmeas não apresentam redução de área de placa provavelmente devido ao início precoce da terapia, a intervenção é anterior ao curso da aterosclerose quando comparado ao macho. Os animais apoE-KO fêmeas apresentam maior desenvolvimento da aterosclerose entre a 21^a semana e 32^a semana, e o tratamento se iniciou na 15^a semana de vida com 2 infusões por semana durante 4 semanas, terminando com animais com 20 semanas de idade. Diferentemente do nosso trabalho em que a intervenção terapêutica iniciou quando os animais possuíam 17 semanas, os camundongos apoE-KO recebem 8 infusões (1 infusão/semana), terminando então com animais de 25 semanas. Provavelmente, apenas algumas semanas de diferença sejam necessárias para se observar redução de área de placa.

Interessantemente, Werner e cols. mostraram em seu estudo que a redução de neointima após injúria vascular foi mais importante com a transfusão endovenosa de células mononucleares derivadas do baço do que as células progenitoras endoteliais obtidas após a cultura da fração mononuclear derivada do baço (WERNER et al., 2003). Demonstrando que ainda não está totalmente claro como as células progenitoras endoteliais e as células mononucleares contribuem nesse modelo animal de aterosclerose. Permanece a dúvida de que uma maior oferta de diferentes tipos celulares e fatores seja mais importante que o uso de populações celulares isoladas para retardar o processo aterosclerótico.

Estudos mostram que a terapia com células mononucleares pode reduzir cerca de 40% da área de placa no modelo murino de aterosclerose apoE KO, enquanto um recente estudo demonstrou que a rosuvastatina reduz cerca de 7% (NISSEN et al., 2006). Esse dado indica a grande importância de estudar mais detalhadamente o efeito das células mononucleares no desenvolvimento da aterosclerose.

Discordantes com o nosso trabalho estão de Wassmann et al. (2006) que não observou redução da placa aterosclerótica quando transfundiu células mononucleares de animais machos em camundongos também machos com 17 semanas de idade em 3 infusões (2×10^7 células) em dias consecutivos. Entretanto houve melhora da função endotelial. Após 45 dias da transfusão das células mononucleares provenientes do baço, observou-se melhora na vasodilatação dependente do endotélio (WASSMANN et al., 2006).

Resultados opostos aos nossos foram encontrados por Silvestre et al. em 2003 que demonstrou o aumento da lesão aterosclerótica em animais apoE KO submetidos a ligadura da artéria femoral. Esses animais receberam a infusão de 10^6 CMN no momento da indução da isquemia. Outro estudo conduzido por George e colaboradores em 2005 mostrou que a transferência de células progenitoras endoteliais ou células mononucleares aumenta o processo aterosclerótico em camundongos apoE KO machos.

Essa discrepância de resultados pode ser oriunda de diferentes protocolos experimentais aplicados nesses estudos. Interferências incluem número de infusões, duração do tratamento, idade e o sexo dos animais doadores de CMN.

Outro parâmetro avaliado foi o remodelamento vascular. O remodelamento positivo é um importante fenômeno adaptativo às mudanças hemodinâmicas da aterosclerose com o objetivo de contrapor-se à diminuição luminal que comprometeria as artérias de grande calibre, através de um reajuste de diâmetro com aumento da espessura da parede vascular (GLAGOV et al., 1987; LANGILLE, 1996). Nesse estudo, foi encontrado um remodelamento positivo em aortas de animais controle apoE KO corroborando essa mudança morfológica adaptativa. Esse dado está em acordo com estudos prévios (LUTGENS et al., 2001; NOGUEIRA et

al., 2007; PEREIRA et al., 2010), que também observaram o remodelamento positivo em animais apoE KO. Um dado inovador do nosso trabalho revela que os animais que receberam a terapia com CMN, grupo apoE KO-CMN, não apresentaram remodelamento positivo. Possivelmente, uma consequência direta da atenuação do processo aterosclerótico proporcionado pela terapia celular.

Após observarmos alguns resultados positivos nos animais submetidos a terapia com CMN, tratamos de investigar por quais mecanismos essas células atuariam, uma vez que a colesterolemia não foi alterada. Ou seja, a atenuação do processo aterosclerótico não ocorre devido à cessação do estímulo inflamatório (hipercolesterolemia). A primeira análise realizada foi através do ensaio *en face* por X-gal das aortas de animais apoE KO. Como observado na figura 16 a coloração azulada revela a presença de células derivadas das CMN doadoras (células do animal *lacZ*) em áreas de lesão aterosclerótica, indicando que o efeito terapêutico das CMN são a nível da parede arterial, como descrito por outros (HU et al., 2002; RAUSCHER et al., 2003; FOTEINOS et al., 2008). Esse ensaio nos permite hipotetizar que as CMN são atraídas para o local da lesão, podendo estimular células residentes ou se transdiferenciar em células-alvo para regeneração do tecido lesionado.

Para investigar os possíveis mecanismos pelos quais essas células poderiam mediar localmente a redução da aterosclerose nos animais apoE KO, avaliamos a migração de células progenitoras endoteliais através da imunohistoquímica no arco aórtico e analisamos a influência da terapia sobre o estresse oxidativo.

É sabido que o número de células progenitoras endoteliais circulantes é inversamente proporcional ao risco de doenças cardiovasculares (SCHMIDT-LUCKE et al., 2010), sugerindo que aumentar o número de CPEe poderia ser uma terapia interessante no tratamento da aterosclerose (RAUSCHER et al., 2003; STREHLOW et al., 2003). As células progenitoras endoteliais contribuem para a angiogênese e possuem potencial terapêutico para revascularizar áreas isquêmicas. Experimentos em animais mostraram que as CPE promovem reendotelização de vasos com injúria, contribuindo com a redução da formação de neointima, confirmando o efeito protetor dessas células. Sabe-se que o número de CPEs circulantes é inversamente

proporcional ao risco de doenças cardiovasculares. Aumentando o número de CPEs circulantes por estatinas, estrógeno, G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*), exercício físico ou transfusão de células acelera a reendotelização e inibe a formação de neointima após injúria vascular (ROBERTS et al., 2005)

Vários fatores aumentam o número de células progenitoras endoteliais circulantes, como estatinas e estrógenos. Estrógenos aumentam a sobrevivência das células progenitoras endoteliais, ampliando a circulação dos níveis dessas células, facilitando o seu efeito benéfico nos locais de dano vascular. O estudo de Strehlow e cols. mostra que o estrogênio acelera a reendotelização e reduz a formação de neointima. Apesar de não estar completamente elucidado como estrógenos e estatinas influenciam na produção, mobilização e adesão das CPEs; é sabido que o aumento dessas células está relacionado com a liberação de óxido nítrico, o que reduz a apoptose de CPEs (STREHLOW et al., 2003).

Existem evidências que o processo aterosclerótico iniciado pela morte de células endoteliais em áreas específicas resulta na sua posterior substituição por células progenitoras endoteliais e que a reparação celular proporcionada pelas CPEs parece ser importante para a integridade e função vascular (XU, 2006). Wassman e colaboradores observaram que o tratamento com CMN derivadas de baço aumenta a atividade da NOS vascular e restaura o relaxamento dependente do endotélio de aortas de animais apoE KO. Este efeito pode ser explicado pela migração de células progenitoras endoteliais para o local da lesão, resultado observado no presente estudo (Figura 19).

Baseando-se na literatura (PATTSCHAN et al., 2006), utilizamos o baço como fonte de CPEs, células contidas na fração de CMN. Nossa hipótese era que as células progenitoras endoteliais estivessem envolvidas com o efeito benéfico que encontramos ao administrar células mononucleares em camundongos apoE KO. Descobriu-se através da imunohistoquímica para Flk-1 e CD133 um *homing* de CPEs para as aortas dos animais apoE KO que eram tratados com células mononucleares. Como mostrado na figura xx, a aorta de um animal apoE KO-CMN apresentou uma intensa expressão dos marcadores para CPEs, indicando que na presença de CPEs, a parede do vaso é capaz de acelerar a reendotelização e inibir

a formação de neointima. Esse mecanismo de ação também foi descrito por Umemura e Higashi em 2008.

A terapia celular parece ser uma ferramenta promissora para a restauração da função endotelial e prevenção do desenvolvimento de aterosclerose. É possível pensar que a associação de terapias celulares e farmacológicas promova um efeito sinérgico. Como discutido na revisão recentemente publicada de Meyrelles e colaboradores (2011), em que nossos dados são citados apontando o transplante de CMN como uma importante alternativa terapêutica nesse modelo murino de hipercolesterolemia e aterosclerose.

A migração de CPEs detectada pela imunohistoquímica em aortas de animais apoE KO-MNC nos levou a hipotetizar que essas células poderiam estar influenciando a produção de NO.

O NO é um gás incolor e estável, moderadamente solúvel em água e sua meia vida varia de 4 a 6 segundos no plasma e 10 a 60 segundos nos tecidos (WENNMALM, 1994). A síntese do NO ocorre pela ação da enzima NO sintase, que catalisa a reação de oxidação de um dos nitrogênios do aminoácido L-arginina, convertendo-o em L-citrulina. A NO sintase tem várias isoformas sintetizadas em diferentes tecidos e são agrupadas em duas categorias: a NO sintase constitutiva (cNOS), dependente de íons cálcio (Ca^{++}) e de calmodulina, e a NO sintase induzível (iNOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas, é independente dos níveis de cálcio intracelular. Acredita-se que a iNOS pode ser produzida por qualquer célula do organismo, desde que se tenha um estímulo apropriado. A NO sintase constitutiva está presente nos neurônios, NOS neuronal (nNOS) e no endotélio, a NO sintase endotelial (eNOS), sendo que o NO produzido pelas células endoteliais tem grande importância no processo de relaxamento vascular (CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002).

Atualmente sabe-se que o NO proveniente da eNOS é fundamental para a proteção dos vasos sanguíneos, uma vez que ele mantém o tônus vascular, regula a pressão sanguínea, previne a agregação plaquetária, inibe a adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio e tem efeito antiproliferativo das células da camada muscular

do vaso. A disfunção endotelial mais importante é a alteração do relaxamento vascular devido à redução da biodisponibilidade do NO (DUSSE et al., 2003).

Estudos clínicos e experimentais de aterosclerose, incluindo aqueles que utilizam o modelo apoE KO, defendem a idéia que o excesso de EROs e/ou a diminuição da habilidade antioxidante são as principais causas da aterogênese (KAWASHIMA, 2004; KUNITOMO, 2007). Além disso, a integridade da produção eNOS/NO na vasculatura é fundamental para a manutenção da função endotelial, o NO produzido pelas células endoteliais vasculares possui um poderoso efeito vasodilatador e devido a este fato tem sido proposto que o mesmo possua propriedades antiateroscleróticas (DAVIGNON e GANZ, 2004).

Como a dosagem de NO requer técnicas sofisticadas, uma avaliação indireta do NO pode ser feita pela avaliação da expressão da enzima NO sintase. Em nosso estudo foi avaliado através de imunohistoquímica a expressão da NO sintase endotelial. Como ilustrado na figura 15, é possível observar uma intensa expressão da eNOS em aortas de animais apoE KO-CMN. Além disso, constatamos que a produção de ânions superóxido estava diminuída nos animais submetidos a terapia.

As espécies reativas de oxigênio (ROS), devido à sua alta reatividade química podem atuar modificando os componentes celulares como lipídios, ácidos nucleicos, proteínas e carboidratos. Além disto, estas espécies reativas de oxigênio podem comprometer a função mitocondrial, levando a alterações morfológicas. Estas alterações são provocadas devido à formação do ânion superóxido a partir da redução do oxigênio pela transferência de um único elétron, ou da formação de peróxido de hidrogênio pela transferência de dois elétrons ou, ainda, pela formação do radical hidroxil (OH) e o oxigênio “*singlet*” (Cadenas, 1995).

É sabido que o aumento dos níveis de EROs afeta a mobilização, função e viabilidade das células progenitoras endoteliais seja por ação direta ou por redução da atividade da eNOS e biodisponibilidade do NO (DIMMELER, 1999). Como observamos que a terapia com CMN em animais apoE KO reduz a produção de $O_2^{\cdot-}$ e concomitantemente ocorre um *upregulation* da eNOS. Logo, o presente estudo

fornece dados que nos possibilitam especular que o aumento do número de CPEs circulantes provido pela terapia com CMN incrementa a via do NO.

Enfim, a terapia celular parece ser uma forma alternativa de intervenção terapêutica de grande potencial, uma vez que observamos vários estudos que apresentaram sucesso após o tratamento com células mononucleares ou frações. Embora importantes estudos se valessem do uso de subtipos ou linhagens específicas contidas na medula, grande parte dos trabalhos experimentais e a maioria dos estudos clínicos utilizaram a fração mononuclear, formada por um conjunto de células de potencialidades e características fenotípicas distintas, contendo células progenitoras e precursoras hematopoiéticas e mesenquimais (Segers & Lee, 2008). Esse *pool* celular merece destaque por sua utilização na prática médica, pois é extraído, separado e implantado em poucas horas, sem necessidade de passagens em cultura celular. Contudo, é preciso identificar quais tipos celulares estão realmente ocasionando os efeitos benéficos e em que situação essas células se encontram para controlar e otimizar as terapias.

Os resultados contraditórios encontrados quando se investiga a aplicação de células mononucleares na aterosclerose parecem ser resultados de abordagens metodológicas diferentes, por isso é necessário ampliar os estudos nessa área a fim de se estabelecer o real papel dessas células nas doenças cardiovasculares.

Nossos dados fornecem evidências importantes do efeito positivo da terapia celular sobre a aterosclerose. Entretanto, estudos adicionais são necessários para revelar outros mecanismos envolvidos no processo aterosclerótico.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que a terapia com células mononucleares atenua as lesões ateroscleróticas em aortas de apoE KO. Nossos dados fornecem evidências de que a terapia celular possui propriedades ateroprotetoras através de mecanismos que incluem a migração de células progenitoras endoteliais, a redução na produção de ânions superóxido e aumento da expressão da enzima NO sintase endotelial.

Referências

8. REFERÊNCIAS

ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, SILVER M, VAN DER ZEE R, LI T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**.1997;275(5302):964-7.

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

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

CADENAS E. Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. In: SAMI, A. Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. New York: Capman & Hall, 1995.

CERQUEIRA NF, YOSHIDA WB. Óxido nítrico. Revisão. **Acta Cir. Brasileira**. São Paulo, v. 17, n. 6, 2002.

CHADE AR, ZHU X, LAVI R, KRIER JD, PISLARU S, SIMARI RD, NAPOLI C, LERMAN A, LERMAN LO. Endothelial progenitor cells restore renal function in chronic experimental renovascular disease. **Circulation** 2009, 119(4):547-57.

CORBEIL D, RÖPER K, WEIGMANN A, HUTTNER WB. AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family? **Blood** 1998 Apr 1;91(7):2625-6.

DAVIGNON J, COHN JS, MABILE L, BERNIER L. Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. **Clinica Chimica Acta**. Vol. 286, p. 115-143, 1999.

DAVIGNON J, GANZ P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation** 2004 Jun 15;109(23 Suppl 1):III27-32.

DIMMELER S, FLEMING I, FISSLTHALER B. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. **Nature** 1999;399:601– 605

DUSSE LMS, VIEIRA LM, CARVALHO MG. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

FOTEINOS G, HU Y, XIAO Q, METZLER B, XU Q. Rapid endothelial turnover in atherosclerosis-prone areas coincides with stem cell repair in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation** 2008 Apr 8;117(14):1856-63.

GENEST, J. Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. **J. Inherit. Metab.Dis.**, n. 26, p. 267-287, 2003.

GEORGE J, AFEK A, ABASHIDZE A, SHMILOVICH H, DEUTSCH V, KOPOLOVICH J, MILLER H, KEREN G. Transfer of endothelial progenitor and bone marrow cells influences atherosclerotic plaque size and composition in apolipoprotein E knockout mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2005 Dec;25(12):2636-41.

GIANINI SD. História Natural da Aterosclerose. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**. Vol. 35, p. 7466-7474, 2007.

GIORDANO, F.J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n.3, p. 500-508, 2005.

GLAGOV S, WEISENBERG E, ZARINS CK, STANKUNAVICIUS R, KOLETTIS GJ: Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. **N Engl J Med** 1987 May 28;316(22):1371-5.

GLAGOV S, KO C, BASSIOUNY HS, ZARINS CK: Principles of vascular remodeling.

In **Panvascular Medicine**. Edited by: Lanzer P, Topol EJ. Berlin: Springer-Verlag; 2002:232-241.

GUERRA S, OLIVEIRA J, RIBEIRO JC, DUARTE JA, MOTA J. Relação entre a atividade física regular e a agregação de fatores de risco biológico das doenças cardiovasculares em crianças e adolescentes. **Revista Brasileira da Saúde Materna e Infantil**. Vol 3, p. 9-15, 2003.

HALLIWELL, B. Antioxidants in Human Health and Disease. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 16, p. 33-50, 1996.

HERMANN J; LERMAN A. The endothelium: dysfunction and beyond. **Journal of Nuclear Cardiology** 8: 197-206. 2001.

HILL JM, ZALOS G, HALCOX JP, SCHENKE WH, WACLAWIW MA, QUYYUMI AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. **N Engl J Med**. 2003;348(7):593-600.

HU Y, MAYR M, METZLER B, ERDEL M, DAVISON F, XU Q: Both donor and recipient origins of smooth muscle cells in vein graft atherosclerotic lesions. **Circulation** 2002 Oct 4;91(7):e13-20.

IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Vol. 88, Suplemento I, 2007.

KAWASHIMA S. Malfunction of vascular control in lifestyle-related diseases: endothelial nitric oxide (NO) synthase/NO system in atherosclerosis. **J Pharmacol Sci** 2004 Dec;96(4):411-9.

KIM BJ, JIN HK, BAE JS. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve the functioning of neurotrophic factors in a mouse model of diabetic neuropathy. **Lab Anim Res** 2011 Jun;27(2):171-6.

KONG D, MELO LG, GNECCHI M, ZHANG L, MOSTOSLAVSKY G, LIEW CC, et al. Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries. **Circulation**. 2004;110(14):2039-46.

KOURY, Josely Correa; DONANGELO, Carmen Marino. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 16, n. 4, Dec. 2003 .

KUNITOMO M: Oxidative stress and atherosclerosis. **Yakugaku Zasshi** 2007 Dec;127(12):1997-2014.

LANGILLE BL: Arterial remodeling: relation to hemodynamics. **Can J Physiol Pharmacol** 1996 Jul;74(7):834-41.

LIBBY P, RIDKER PM, HANSSON GK: Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature** 2011 May 19;473(7347):317-25.

LIBBY P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature Reviews**, v. 420, p.868-74, 2002.

LUTGENS E, DE MUINCK ED, HEENEMAN S, DAEMEN MJ: Compensatory enlargement and stenosis develop in apoE(-/-) and apoE*3-Leiden transgenic mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2001 Aug;21(8):1359-65.

MEIR K, LEITERSDORF E. Atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse: a decade of progress. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. Vol.24, p.1006-1014, 2004.

MEYRELLES SS, PEOTTA VA, PEREIRA TM, VASQUEZ EC. Endothelial Dysfunction in the Apolipoprotein E-deficient Mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. **Lipids Health Dis** 2011 Nov 14;10(1):211.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informações hospitalares do DataSus. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em outubro de 2011.

NAKASHIMA Y, PLUMP AS, RAINES EW, BRESLOW JL, ROSS R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. **Arteriosclerosis and Thrombosis**. Vol.14(1), p. 133-40, 1994.

NELSON WD, ZENOVICH AG, OTT HC, STOLEN C, CARON GJ, PANOSKALTSIS-MORTARI A, BARNES SA 3RD, XIN X, TAYLOR DA. Sex-dependent attenuation of plaque growth after treatment with bone marrow mononuclear cells. **Circulation Research**. Vol.101(12), p.1319-27, 2007.

NISSEN SE, NICHOLLS SJ, SIPAHI I, LIBBY P, RAICHLIN JS, BALLANTYNE CM, DAVIGNON J, ERBEL R, FRUCHART JC, TARDIF JC, SCHOENHAGEN P, CROWE T, CAIN V, WOLSKI K, GOORMASTIC M, TUZCU EM; ASTEROID INVESTIGATORS. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. **JAMA: Journal of the American Medical Association**. Vol. 5;295(13), p. 1556-65, 2006.

NOGUEIRA BV, PEOTTA VA, MEYRELLES SS, VASQUEZ EC: Evaluation of aortic remodeling in apolipoprotein E-deficient mice and renovascular hypertensive mice. **Arch Med Res** 2007 Nov;38(8):816-21.

ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, LIMANA F, JAKONIUK I, QUAINI F, NADALGINARD B, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2001 Aug 28;98(18):10344-9.

PAOLETTI R, GOTTO AM, HAJJAR DP. Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy. **Circulation**. Vol. 109, p.III20-III26, 2004.

PATSCHAN D, KRUPINCZA K, PATSCHAN S, ZHANG Z, HAMBY C, GOLIGORSKY MS. Dynamics of mobilization and homing of endothelial progenitor cells after acute renal ischemia: modulation by ischemic preconditioning. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**. Vol. 291(1), p. 176-85, 2006.

PEREIRA TM, NOGUEIRA BV, LIMA LC, PORTO ML, ARRUDA JA, VASQUEZ EC, MEYRELLES SS: Cardiac and vascular changes in elderly atherosclerotic mice: the influence of gender. **Lipids Health Dis** 2010 Aug 19;9:87.

PIEDRAHITA JA, ZHANG SH, HAGAMAN JR, OLIVER PM, MAEDA N: Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1992 May 15;89(10):4471-5.

PLUMP AS, SMITH JD, HAYEK T, AALTO-SETALA K, WALSH A, VERSTUYFT JG, RUBIN EM, BRESLOW JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**. v.71, p.343-353, 1992.

PURPURA KA, GEORGE SH, DANG SM, CHOI K, NAGY A, ZANDSTRA PW: Soluble Flt-1 regulates Flk-1 activation to control hematopoietic and endothelial development in an oxygen-responsive manner. **Stem Cells** 2008 Nov;26(11):2832-42.

RADER, D.J.; WILSON, J.M. Gene therapy for lipid disorders. In HARBER, E. Ed.). **Molecular cardiovascular medicine**. New York: Scientific American, p. 97-114, 1995.

RAUSCHER FM, GOLDSCHMIDT-CLERMONT PJ, DAVIS BH, WANG T, GREGG D, RAMASWAMI P, PIPPEN AM, ANNEX BH, DONG C, TAYLOR DA. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. **Circulation**. Vol 108, p. 457-463, 2003.

REVISTA SCIENTIFIC AMERICAN BRASIL. Edição Especial Ciência e Saúde n. 03, 2006.

ROBERTS N, JAHANGIRI M, XU Q. Progenitor cells in vascular disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. Vol 9, p. 583-591, 2005.

ROSS R. Rous-Whipple Award Lecture: Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry. **Am J Pathol** 1993 Oct;143(4):987-1002.

SANZ J, FAYAD ZA. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. **Nature**. 2008 Feb 21;451(7181):953-7.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCHMIDT-LUCKE C, FICHTLSCHERER S, AICHER A, TSCHÖPE C, SCHULTHEISS HP, ZEIHNER AM, DIMMELER S: Quantification of circulating endothelial progenitor cells using the modified ISHAGE protocol. **PLoS One** 2010 Nov 3;5(11):e13790.

SCOTT J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. **Current Opinion in Genetics and Development**, v.14, p.271-279, 2004.

SEGERS VFM, LEE RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. **Nature** 2008; 451(7181):937-42.

SILVESTRE JS, GOJOVA A, BRUN V, POTTEAUX S, ESPOSITO B, DURIEZ M, CLERGUE M, LE RICOUSSE-ROUSSANNE S, BARATEAU V, MERVAL R, GROUX H, TOBELEM G, LEVY B, TEDGUI A, MALLAT Z: Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells in ischemic apolipoprotein E-knockout mice accelerates atherosclerosis without altering plaque composition. **Circulation** 2003 Dec 9;108(23):2839-42.

SOUZA M.H.; ELIAS D.O. Manual de Instrução Programada: Princípios de Hematologia e Hemoterapia. Segunda Edição, 2005.

STARY HC, CHANDLER AB, DINSMORE RE, FUSTER V, GLAGOV S, INSULL W, ROSENFELD ME, SCHWARTZ CJ, WAGNER WD, WISSLER RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on

Atherosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, vol. 92(5), p. 1512-31.
Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. Vol.15(9), p.1512-31, 1995.

STEM CELLS: SCIENTIFIC PROGRESS AND FUTURE RESEARCH DIRECTIONS.
National Institute of Health, 2001.

STREHLOW K, WERNER N, BERWEILER J, LINK A, DIRNAGL U, PRILLER J, LAUFS K, GHAENI L, MILOSEVIC M, BÖHM M, NICKENIG G. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. **Circulation**. Vol.107(24), p. 3059-65, 2003.

TWISK JWR, KEMPER HC, VAN MECHELEN W, POST GB. Clustering of risk factors for coronary heart disease. The longitudinal relationship with lifestyle. **Annals of Epidemiology**. v. 11, p. 157-165, 2001.

UMEMURA T, HIGASHI Y: Endothelial progenitor cells: therapeutic target for cardiovascular diseases. **J Pharmacol Sci** 2008 Sep;108(1):1-6.

XU Q. The impact of progenitor cells in atherosclerosis. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med** 2006, 3(2):94-101.

WASSMANN S, WERNER N, CZECH T, NICKENIG G. Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells **Circulation Research**. Vol 99, p. 74-83, 2006.

WENNMALM A. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. **Journal of Internal Medicine** 235:317-27. 1994.

WERNER N, JUNK S, LAUFS U, LINK A, WALENTA K, BOHM M, NICKENIG G. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. **Circulation Research** Vol. 2593(2), p.17-24, 2003.

ZAGO AM, COVAS DM. Células-Tronco – A Nova Fronteira da Medicina. Atheneu, São Paulo, Brasil, 2006.

Anexo

RESEARCH

Open Access

Mononuclear cell therapy attenuates atherosclerosis in apoE KO mice

Marcella L Porto¹, Leandro CF Lima¹, Thiago MC Pereira¹, Breno V Nogueira¹, Clarissa L Tonini¹, Bianca P Campagnaro¹, Silvana S Meyrelles¹ and Elisardo C Vasquez^{1,2*}

Abstract

Background: Recent studies have highlighted the potential of cell therapy for atherosclerosis. The aim of this study was to evaluate the effects of mononuclear cell (MNC) therapy on the development of atherosclerotic lesions in the apolipoprotein E knockout (apoE KO) mouse.

Methods: We investigated vascular lipid deposition, vascular remodeling, oxidative stress, and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in apoE KO mice treated with spleen MNCs isolated from *lacZ* transgenic mice (apoE KO-MNC) for 8 weeks compared to untreated control mice (apoE KO).

Results: Histological analysis of aortas showed a significant reduction in the lipid deposition area in apoE KO-MNC mice compared to apoE KO mice (0.051 ± 0.004 vs 0.117 ± 0.016 mm², respectively, $p < 0.01$). In addition, vessel morphometry revealed that MNC therapy prevented the outward (positive) remodeling in apoE KO mice that is normally observed (apoE KO-MNC: 0.98 ± 0.07 vs apoE KO: 1.37 ± 0.09), using wild-type mice (C57BL/6J) as a reference. ApoE KO-MNC mice also have reduced production of superoxide anions and increased eNOS expression compared to apoE KO mice. Finally, immunohistochemistry analysis revealed a homing of endothelial progenitor cells (EPCs) in the aortas of apoE KO-MNC mice.

Conclusion: MNC therapy attenuates the progression of atherosclerosis in the aortas of apoE KO mice. Our data provide evidence that the mechanism by which this attenuation occurs includes the homing of EPCs, a decrease in oxidative stress and an upregulation of eNOS expression.

Keywords: cell therapy, atherosclerosis, apoE KO mice, EPC

Background

Atherosclerosis is a chronic and degenerative disease of the wall of the large arteries and is a leading cause of mortality and morbidity [1,2]. Despite progress in the treatment and repair of this disease, researchers are continually challenged to develop new successful approaches. Therapy using stem/progenitor cells has emerged as an alternative to conventional treatments for atherosclerosis, as demonstrated by some positive results in experimental and clinical studies [3,4].

The apolipoprotein E knockout (apoE KO) mouse, developed two decades ago [5,6], has been used as an

experimental model of atherosclerosis because it spontaneously develops hypercholesterolemia and atherosclerosis in a reproducible manner, similar to what is observed in humans. The apoE KO mouse is a particularly useful model as it offers a unique opportunity to evaluate the mechanisms involved in the development of atherosclerosis and new therapies for treatment of this disease.

One potential therapy for atherosclerosis uses mononuclear cells (MNCs), which contain a subpopulation of endothelial progenitor cells (EPCs) [7]. However, the beneficial effects of MNC therapy on atherosclerosis are still a subject of controversy in both humans [8,9] and experimental models of atherosclerosis [10,11]. In this regard, the main objective of the current study was to evaluate the effects of MNC therapy on vascular atherosclerotic lesions in apoE KO mice and to elucidate

* Correspondence: evasquez@pq.cnpq.br

¹Laboratory of Transgenes and Cardiovascular Control, Dept. Physiological Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

the mechanisms by which MNC therapy attenuates the progression of these lesions. We hypothesized that MNC therapy attenuates the progression of vascular atherosclerosis through the homing of EPCs, reducing reactive oxygen species (ROS), and increasing the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS).

Materials and methods

Animals

ApoE KO female mice (24-week-old) were randomly divided into two groups: 1) an apoE KO control group (n = 8) and 2) an apoE KO group that received MNC therapy (apoE KO-MNC, n = 8). β -galactosidase (β -gal) (encoded by the *lacZ* gene) transgenic mice (12-week-old) were used as MNC donors. Animals were obtained from animal facilities at the Federal University of Espirito Santo. Six-month-old apoE KO mice were fed a cholesterol-rich diet (1.25% cholesterol) for 4 months and were housed separately in temperature-controlled rooms (22°C) under a 12 h light/dark cycle. All procedures were conducted in accordance with the institutional guidelines for animal research and the protocols were previously approved by the Institutional Ethics *Committee for Use of Animals (CEUA 003/2008)*.

Isolation of mononuclear cells from spleen

LacZ transgenic mice were euthanized with sodium thiopental overdose (100 mg/kg, intraperitoneal injection). The spleens were removed, homogenized, and mixed with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) to nourish the cells. The homogenate was then loaded onto a histopaque gradient. The layer containing MNCs was removed and resuspended in DMEM for future intravenous injections.

Transfer of spleen mononuclear cells

For MNC transfusions, 1×10^6 MNCs were resuspended in 100 μ L DMEM and administered by intravenous injections into the tail vein of apoE KO mice over a period of 2 months (1 injection per week for a total of 8 injections). Uninjected apoE KO mice served as a control group. We included a control group of a age matched apoE KO mice that received vehicle-only (DMEM) injections. To test the preventive effects of MNC therapy, we also administered MNC transfusions to younger (16-week-old) apoE KO mice that were fed a high-cholesterol diet for 2 months prior to the start of injections.

Measurement of plasma cholesterol levels

A blood sample (200 μ L) was collected by intracardiac puncture of each animal and the plasma total cholesterol was measured using a commercial colorimetric kit (Bioclin, Belo Horizonte, Brazil).

Histological analysis of aortic root plaque

At the end of the experiments, each mouse was euthanized with sodium thiopental overdose (100 mg/kg, intraperitoneal injection) and the left ventricle was perfused with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) followed by a 4% formaldehyde solution at a pressure of 100 mmHg. The aortic root and a portion of the ascendant aorta were embedded in OCT compound and cross-sectioned on a cryostat (Jung CM1800; Leica, Wetzlar, Germany) at a thickness of 10 μ m. For each animal, aorta cross-sections were mounted on gelatin-coated slides and stained with Oil-Red-O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to detect neutral lipids.

Morphometry

Images of the aorta were captured with a color video camera (VKC150, Hitachi, Tokyo, Japan) connected to a microscope (Olympus AX70, Olympus, Center Valley, PA, USA) and analyzed using a National Institute of Health (NIH) Image program. An examiner blinded to the experimental groups performed the image analysis to prevent any bias in the interpretation of the results. Using a 4 \times objective, the vessel cross-sectional area (V_{CSA}) and the lumen cross-sectional area were calculated. The vascular remodeling ratio was obtained by dividing each animal's V_{CSA} by the average V_{CSA} of wild-type C57BL/6J (C57) mice and each sample was scored for absence of remodeling (0.95-1.05), inward remodeling (< 0.95), or outward remodeling (> 1.05).

Localization of donor MNCs

The remaining whole aorta was opened lengthwise and stained *en face* for donor MNC localization. Aortic samples were incubated for 12 h at 37°C in freshly prepared β -gal staining solution (pH 4.0) containing 2.4 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside (X-gal, Sigma Aldrich), 4.7 mmol/L potassium ferrocyanide, 4.9 mmol/L potassium ferricyanide, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L $MgCl_2$ and 40 mmol/L citric acid.

Detection of superoxide production

Unfixed frozen sections of aorta were incubated in 2 μ mol dihydroethidium (DHE) modified Kreb's solution containing 20 mmol of HEPES for 30 min in a light-protected chamber at 37°C.

Immunohistochemistry

Cross-sections (10 μ m) were cut on a cryostat and placed on gelatin-coated slides. Sections were air-dried and then slides were fixed for 20 minutes in acetone at -20°C. Slides were incubated with the following primary antibodies overnight: eNOS, 1:50 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA); vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1), 1:50 (Abcam, Cambridge, MA, USA);

hematopoietic stem cell antigen (CD133), 1:50 (Millipore, Billerica, MA, USA). A Vectastain ABC Elit kit was used for detection, with DAB or NovaRED staining (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Statistical Analysis

Data are presented as the mean \pm SEM. Statistical analysis was performed with Student's *t*-test for independent samples. One-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey *post hoc* test for multiple comparisons, was used when appropriate. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Plasma total cholesterol levels of 24-week-old animals that were fed a high-cholesterol diet for 16 weeks was similar between apoE KO control mice and apoE KO mice that received MNC therapy for 8 weeks (1176 ± 213 vs. 1241 ± 167 mg/dL; $p > 0.05$).

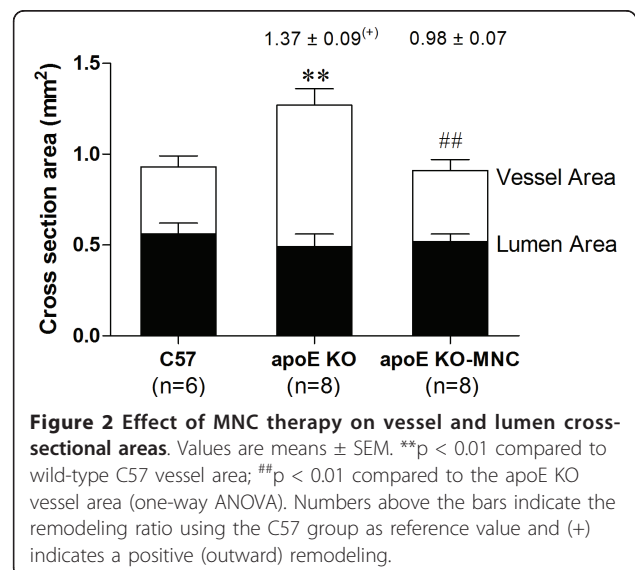
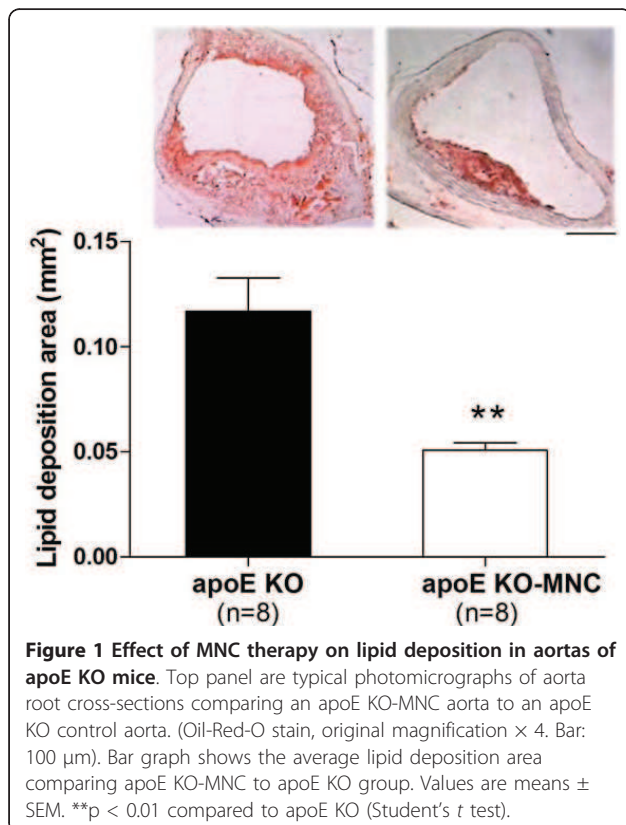
Figure 1 shows the effect of MNC therapy on vessel lipid deposition. As shown by the histological analysis of a typical aortic root cross-section, apoE KO-MNC mice demonstrated marked reduction of the atherosclerotic lesion. A large lipid deposition area was observed in the aorta roots of 24-week-old apoE KO control and vehicle-only mice (0.117 ± 0.016 mm² and 0.109 ± 0.012

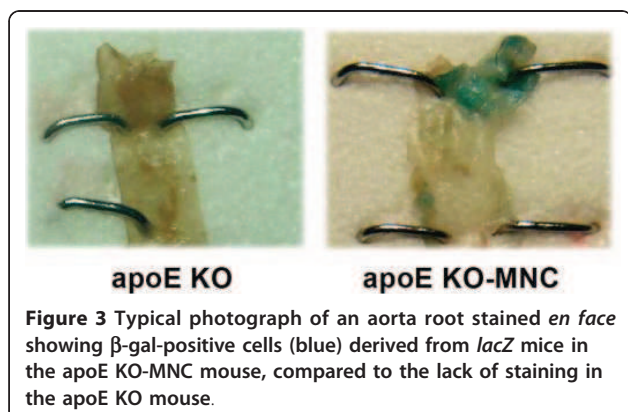
mm², respectively). In contrast, the lipid deposition area was significantly reduced in approximately 45% ($p < 0.01$) of age-matched apoE KO-MNC mice (bar graph, Figure 1). This value of apoE KO-MNC was statistically similar to that observed in 16-week-old apoE KO mice (0.051 ± 0.004 vs. 0.049 ± 0.005 mm², respectively), indicating that MNCs have atheroprotective properties.

Figure 2 summarizes data obtained from measurements of the aorta cross-sectional area and vascular remodeling in apoE KO and apoE KO-MNC mice, using wild-type C57 animals as reference values. The vessel lumen area was statistically similar in all groups analyzed. However, the vessel wall area was significantly increased in apoE KO mice (0.79 ± 0.05 mm²) compared to C57 mice (0.37 ± 0.05 mm², $p < 0.01$). This increase was subsequently normalized by MNC therapy (apoE KO-MNC: 0.39 ± 0.04 mm², $p < 0.01$). Consistent with this finding, the positive (> 1.05) vascular remodeling observed in apoE KO mice was prevented by MNC therapy (ratios of 1.37 ± 0.09 in apoE KO vs. 0.98 ± 0.07 in apoE KO-MNC).

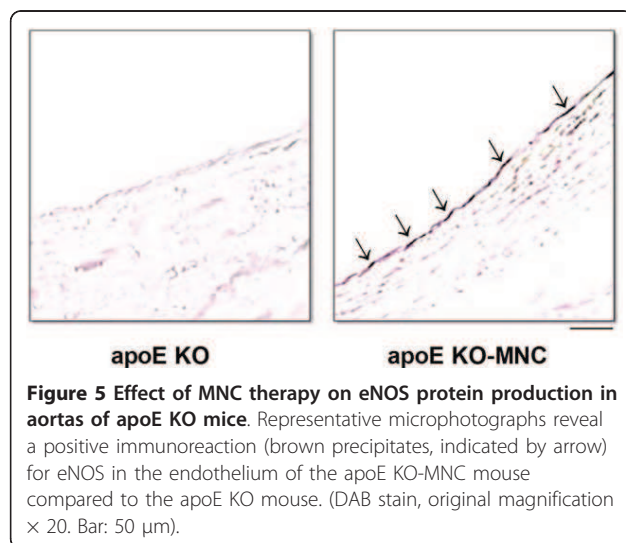
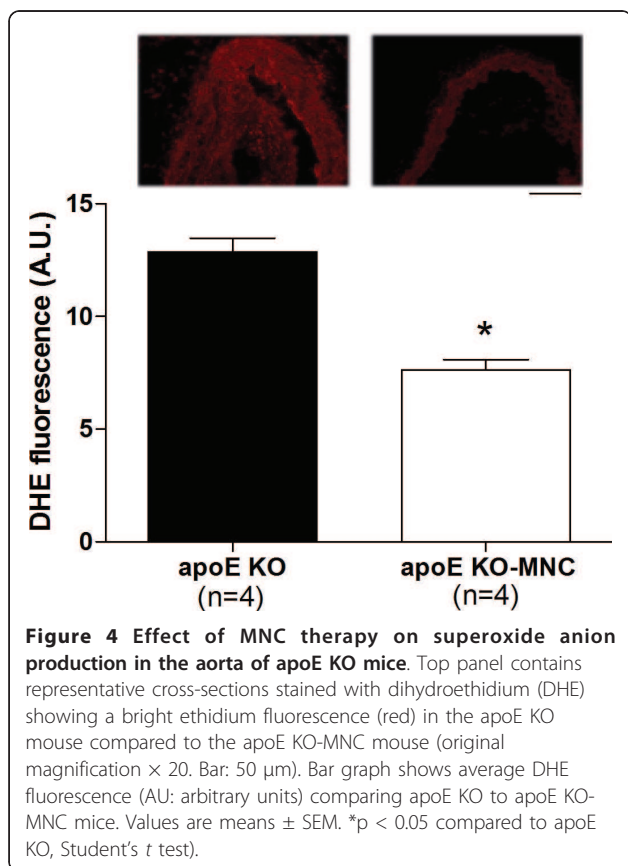
Figure 3 shows typical *en face* aortas from apoE KO and apoE KO-MNC mice that were stained with β -gal to identify donor-derived MNCs. All apoE KO animals that received MNC therapy from *lacZ* transgenic mice expressed β -gal staining in the aorta roots when compared with untreated and vehicle-only mice (data not shown), which lacked any vessel β -gal staining.

To investigate the mechanisms by which MNC therapy reduced atherosclerosis, we evaluated superoxide (O₂⁻) production, eNOS production, and homing of endothelial progenitor cells. As illustrated in the microphotographs in Figure 4 (top panel), a dihydroethidium oxidative assay revealed intense ethidium fluorescence





in the apoE KO mouse but not in the apoE KO-MNC mouse. On average, the aortas from apoE KO-MNC mice exhibited approximately 60% less ethidium fluorescence than untreated apoE KO mice (Figure 4, bottom panel). In addition, qualitative immunohistochemistry in aortas from apoE KO-MNC revealed increased expression of eNOS compared to untreated apoE KO mice (Figure 5). Homing of endothelial progenitor cells was confirmed by immunohistochemistry detection of Flk-1 and CD133, markers of endothelial progenitor cells, which showed a marked increase in Flk-1 and CD133

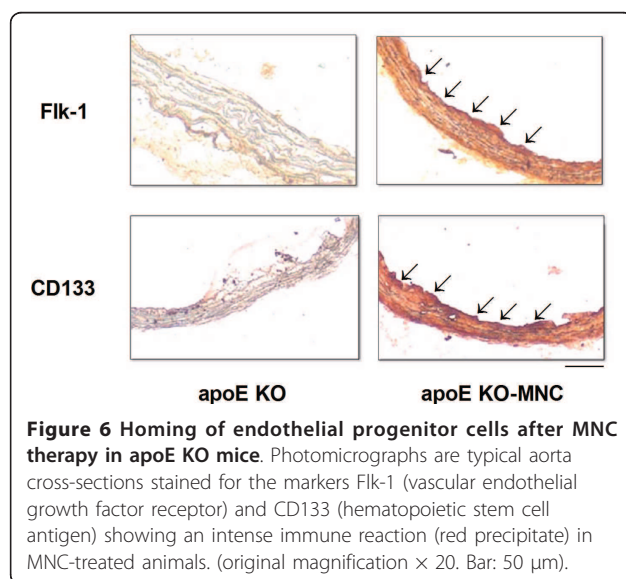


staining in the aorta endothelium of apoE KO-MNC mice compared to untreated apoE KO mice (illustrations in Figure 6).

Discussion

In the present study we observed that 8 weeks of MNC therapy resulted in the attenuation of atherosclerotic lesions in aortas from apoE KO mice through the homing of EPCs, a reduction in the production of superoxide anions and an increase in eNOS expression.

Stem/progenitor cells, a subpopulation of MNCs, have unique characteristics that make them ideal for therapeutic purposes. They are undifferentiated, unspecialized, and can divide symmetrically and asymmetrically for long periods [12-14]. In the present study we observed that MNCs have atheroprotective properties in



an apoE KO murine model of atherosclerosis, even under conditions of high total cholesterol in the plasma. The development of atherosclerosis was accelerated by a high-cholesterol diet; however, continuous treatment with MNCs derived from young *lacZ* transgenic mice caused a marked attenuation of the atherosclerotic lesion, without affecting the high total cholesterol levels in the plasma. This finding is in agreement with other studies in aortas [10,15] and carotid arteries [16] from murine models of atherosclerosis but conflicts with one study which found no significant effects from MNC therapy on atherosclerosis [17] and two studies which observed opposite results to ours [11,18]. This discrepancy could be due to the different methods used in these studies. For example, the study that found that there was no benefit from MNC therapy [17] treated the animals with fewer injections of MNCs (1 to 3 injections at similar concentrations) than did we and others [10,15] who observed a beneficial effect (6 to 8 injections). Other variable factors include the animal's age and gender.

The vascular remodeling of large arteries is considered an adaptive structural change that occurs in response to a variety of conditions, including atherosclerosis [19,20]. Our finding of a positive (outward) remodeling in aortas from apoE KO control mice corroborates this adaptive morphological change and is in agreement with previous studies [21-23]. A novel finding of this study revealed that animals that received MNC therapy (apoE KO-MNC mice) did not show vascular positive remodeling, most likely as a direct consequence of marked attenuation of the atherosclerotic process.

The X-gal *en face* analysis of aortas from apoE KO mice revealed the presence of donor MNCs (from a *lacZ* mouse) in atherosclerotic areas, indicating that the therapeutic effect of MNCs is at the level of the arterial wall, as has been described by others [10,24,25]. We then investigated the possible mechanisms by which MNCs could locally mediate the attenuation of atherosclerosis in apoE KO mice.

It is known that the number of circulating EPCs is inversely proportional to the risk of cardiovascular diseases [26], suggesting that increasing the number of circulating EPCs could be a powerful therapy in the treatment of atherosclerosis [10,27]. Based on what has been done in other studies [28], we used the spleen as a source of EPCs, which are contained within the mononuclear fraction. Our hypothesis that EPCs derived from the MNC fraction are involved in the anti-atherogenic response is based on our discovery of vascular homing of EPCs and the presence of markers Flk-1 and CD133 in aortas from apoE KO mice treated with MNCs [29,30]. As shown in Figure 6, aorta cross-sections from

apoE KO-MNC mice showed intense expression of EPC markers. This indicates that in the presence of EPCs, the vessel wall is capable of accelerating the re-endothelialization and inhibition of neointimal formation. This mechanism of action by EPCs has also been demonstrated by others [31].

Clinical and experimental studies of atherosclerosis, including those using the apoE KO mouse model, support the concept that overabundance of ROS and/or a decline in antioxidant ability plays a causal role in atherosclerosis [32,33]. Moreover, the integrity of eNOS/NO production in the vasculature is critical for normal vascular function [34]. The effects of cell therapy on ROS production have not previously been studied in experimental atherosclerosis. To address this, in the present study we tested the hypothesis that the beneficial effects of MNC includes a reduction in oxidative stress. We found that MNC therapy in apoE KO mice resulted in a marked decrease in $O_2^{\cdot -}$ production and a concomitant upregulation of eNOS in the aorta, supporting the idea that another important mechanism by which MNC therapy attenuates the progression of atherosclerosis is by relieving oxidative stress. Thus, we speculate that the increased number of circulating EPCs provided by MNC therapy upregulated the NO pathway. This finding is consistent with other studies that observed similar results in a model of experimental diabetes [35].

In conclusion, we have shown that MNC therapy attenuates atherosclerotic lesions in aortas from apoE KO mice. Our data provide evidence that the mechanisms by which MNC therapy is atheroprotective include homing of EPCs, reducing $O_2^{\cdot -}$ production and upregulating eNOS expression. Although further studies are needed to reveal additional mechanisms underlying the atherosclerotic process in this murine model, the present data provide important evidence on the beneficial effect of cell therapy on atherosclerosis.

Acknowledgements

This research was supported by the National Council for the Development of Science and Technology (CNPq) and State Agency for the Development of Science and Technology (FAPES: PRONEX 012/2009).

Author details

¹Laboratory of Transgenes and Cardiovascular Control, Dept. Physiological Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil. ²Emescam College of Health Sciences, Vitória, ES, Brazil.

Authors' contributions

MLP carried out experimental analysis and acquisition of data, analysis and interpretation of the data and drafted the manuscript. LCF carried out the experimental analysis. TMCP performed the statistics analysis and helped to draft the manuscript. BVN contributed to histology. CLT and BPC participated in the study's design and supervision and in the critical revision of the manuscript. SSM and ECV contributed to the conception, design and supervision of the study and interpretation of data. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 30 August 2011 Accepted: 6 September 2011

Published: 6 September 2011

References

- Ross R: Rous-Whipple Award Lecture: Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry. *Am J Pathol* 1993, **143**(4):987-1002.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK: Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011, **473**(7347):317-25.
- Chade AR, Zhu X, Lavi R, Krier JD, Pislaru S, Simari RD, Napoli C, Lerman A, Lerman LO: Endothelial progenitor cells restore renal function in chronic experimental renovascular disease. *Circulation* 2009, **119**(4):547-57.
- Dotsenko O: Stem/Progenitor cells, atherosclerosis and cardiovascular regeneration. *Open Cardiovasc Med J* 2010, **4**:97-104.
- Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL: Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992, **71**(2):343-53.
- Piedrahita JA, Zhang SH, Hageman JR, Oliver PM, Maeda N: Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, **89**(10):4471-5.
- Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q: Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res* 2008, **78**(3):413-21.
- van Ramshorst J, Bax JJ, Beeres SL, Dibbets-Schneider P, Roes SD, Stokkel MP, de Roos A, Fibbe WE, Zwavinga JJ, Boersma E, Schalij MJ, Atsma DE: Intramyocardial bone marrow cell injection for chronic myocardial ischemia: a randomized controlled trial. *JAMA* 2009, **301**(19):1997-2004.
- Hopp E, Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Forfang K, Edvardsen T, Smith HJ: Regional myocardial function after intracoronary bone marrow cell injection in reperfused anterior wall infarction - a cardiovascular magnetic resonance tagging study. *J Cardiovasc Magn Reson* 2011, **13**:22.
- Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, Phippen AM, Annex BH, Dong C, Taylor DA: Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation* 2003, **108**(4):457-63.
- Silvestre JS, Gojova A, Brun V, Potteaux S, Esposito B, Duriez M, Clergue M, Le Ricousse-Roussanne S, Barateau V, Merval R, Groux H, Tobelem G, Levy B, Tedgui A, Mallat Z: Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells in ischemic apolipoprotein E-knockout mice accelerates atherosclerosis without altering plaque composition. *Circulation* 2003, **108**(23):2839-42.
- Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, Takasawa Ki, Miyata T, Okano H, Hori M, Matsumoto M: Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke* 2001, **32**(8):1890-6.
- Yang Z, Di Santo S, Kalka C: Current developments in the use of stem cell for therapeutic neovascularisation: is the future therapy "cell-free"? *Swiss Med Wkly* 2010, **140**:w13130.
- Przybycien K, Kornacewicz Jach Z, Machaliński B: Stem cells in cardiologic clinical trials. *Kardiol Pol* 2011, **69**(6):601-9, Polish.
- Nelson WD, Zenovich AG, Ott HC, Stolen C, Caron GJ, Panoskaltis-Mortari A, Barnes SA, Xin X, Taylor DA: Sex-dependent attenuation of plaque growth after treatment with bone marrow mononuclear cells. *Circulation* 2007, **116**(12):1319-27.
- Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagl U, Nickenig G: Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002, **22**(10):1567-72.
- Wassmann S, Werner N, Czech T, Nickenig G: Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells. *Circulation* 2006, **114**(8):e74-83.
- George J, Afek A, Abashidze A, Shmilovich H, Deutsch V, Kopolovich J, Miller H, Keren G: Transfer of endothelial progenitor and bone marrow cells influences atherosclerotic plaque size and composition in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**(12):2636-41.
- Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Koletts GJ: Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987, **316**(22):1371-5.
- Langille BL: Arterial remodeling: relation to hemodynamics. *Can J Physiol Pharmacol* 1996, **74**(7):834-41.
- Lutgens E, de Muinck ED, Heeneman S, Daemen MJ: Compensatory enlargement and stenosis develop in apoE(-/-) and apoE*3-Leiden transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001, **21**(8):1359-65.
- Nogueira BV, Peotta VA, Meyrelles SS, Vasquez EC: Evaluation of aortic remodeling in apolipoprotein E-deficient mice and renovascular hypertensive mice. *Arch Med Res* 2007, **38**(8):816-21.
- Pereira TM, Nogueira BV, Lima LC, Porto ML, Arruda JA, Vasquez EC, Meyrelles SS: Cardiac and vascular changes in elderly atherosclerotic mice: the influence of gender. *Lipids Health Dis* 2010, **9**:87.
- Hu Y, Mayr M, Metzler B, Erdel M, Davison F, Xu Q: Both donor and recipient origins of smooth muscle cells in vein graft atherosclerotic lesions. *Circulation* 2002, **106**(7):e13-20.
- Foteinos G, Hu Y, Xiao Q, Metzler B, Xu Q: Rapid endothelial turnover in atherosclerosis-prone areas coincides with stem cell repair in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2008, **117**(14):1856-63.
- Schmidt-Lucke C, Fichtlscherer S, Aicher A, Tschöpe C, Schultheiss HP, Zeiher AM, Dimmeler S: Quantification of circulating endothelial progenitor cells using the modified ISHAGE protocol. *PLoS One* 2010, **5**(11):e13790.
- Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Böhm M, Nickenig G: Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation* 2003, **107**(24):3059-65.
- Patschan D, Krupinca K, Patschan S, Zhang Z, Hamby C, Goligorsky MS: Dynamics of mobilization and homing of endothelial progenitor cells after acute renal ischemia: modulation by ischemic preconditioning. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006, **291**(1):F176-85.
- Purpura KA, George SH, Dang SM, Choi K, Nagy A, Zandstra PW: Soluble Flt-1 regulates Flk-1 activation to control hematopoietic and endothelial development in an oxygen-responsive manner. *Stem Cells* 2008, **26**(11):2832-42.
- Corbeil D, Röper K, Weigmann A, Huttner WB: AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family? *Blood* 1998, **91**(7):2625-6.
- Umemura T, Higashi Y: Endothelial progenitor cells: therapeutic target for cardiovascular diseases. *J Pharmacol Sci* 2008, **108**(1):1-6.
- Kawashima S: Malfunction of vascular control in lifestyle-related diseases: endothelial nitric oxide (NO) synthase/NO system in atherosclerosis. *J Pharmacol Sci* 2004, **96**(4):411-9.
- Kunitomo M: Oxidative stress and atherosclerosis. *Yakugaku Zasshi* 2007, **127**(12):1997-2014.
- Davignon J, Ganz P: Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004, **109**(23 Suppl 1):II127-32.
- Sambucetti G, Morbelli S, Vanella L, Kusmic C, Marini C, Massollo M, Augeri C, Corselli M, Ghersi C, Chiavarina B, Rodella LF, L'Abbate A, Drummond G, Abraham NG, Frassonni F: Diabetes impairs the vascular recruitment of normal stem cells by oxidant damage, reversed by increases in pAMPK, heme oxygenase-1, and adiponectin. *Stem Cells* 2009, **27**(2):399-407.

doi:10.1186/1476-511X-10-155

Cite this article as: Porto et al: Mononuclear cell therapy attenuates atherosclerosis in apoE KO mice. *Lipids in Health and Disease* 2011 **10**:155.