

**UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE EM CÉLULAS-TRONCO  
HEMATOPOIÉTICAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS**

**SARA LOPES CESCHIM**

**VILA VELHA**  
**JUNHO / 2015**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE EM CÉLULAS-TRONCO  
HEMATOPOIÉTICAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS**

**SARA LOPES CESCHIM**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha,  
como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau  
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**VILA VELHA**  
**JUNHO / 2015**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C421a Ceschim, Sara Lopes.

Análise de genotoxicidade em células-tronco hematopoiéticas da medula óssea de camundongos / Sara Lopes Ceschim. – 2015.

61 f.: il.

Orientador: Bianca Prandi Campagnaro

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Vila Velha, 2015.

Inclui bibliografias.

1. Células-tronco. 2. Células - Envelhecimento. 3. Estresse oxidativo. I. Campagnaro, Bianca Prandi. II. Universidade Vila Velha.  
III. Título.

CDD 611.018

**SARA LOPES CESCHIM**

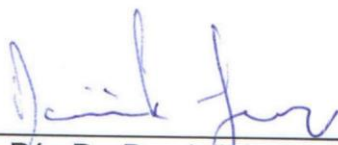
**ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE EM CÉLULAS-TRONCO  
HEMATOPOIÉTICAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra<sup>a</sup>. Bianca Prandi Campagnaro

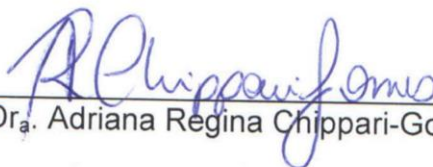
Aprovada em 30 de Junho de 2015,

Banca Examinadora



---

Prof. Pós Dr. Dominik Lenz, UUV



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Regina Chippari-Gomes, UUV



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bianca Prandi Campagnaro, UUV  
Orientadora

## **AGRADECIMENTOS**

Mais uma etapa concluída na minha vida e não poderia deixar de agradecer quem realmente me apoiou e presenciou de perto esta minha conquista:

Primeiramente, obrigada senhor pela força nos momentos difíceis e por me permitir chegar até aqui.

À minha família, pela compreensão e apoio. Em especial ao meu marido Rodrigo, pelo incentivo em todas as minhas decisões. Obrigada pela paciência, pela amizade e por ser esse companheiro maravilhoso que Deus colocou na minha vida.

Ao Dr Jules White que foi o primeiro a me incentivar e acreditar que seria possível, sendo o responsável por boa parte desta conquista.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Bianca Prandi Campagnaro pelos ensinamentos.

À todos do laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular da UFES que de alguma forma me ajudou e contribuiu para realização desta pesquisa.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO.....	vi
ABSTRACT .....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Envelhecimento.....	1
1.2 Células-tronco .....	2
1.2.1 Medula óssea .....	5
1.2.2 Célula-tronco hematopoiética .....	6
1.3 Espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo .....	8
1.4 Fragmentação do DNA X ensaio cometa .....	10
2 JUSTIFICATIVA.....	13
3 OBJETIVOS.....	14
4 METODOLOGIA .....	15
4.1 Animais .....	15
4.2 Grupos experimentais .....	15
4.3 Obtenção das amostras .....	15
4.3.1 Isolamento das células mononucleares da medula óssea.....	16
4.4 Cultura de células-tronco .....	17
4.5 Identificação das células-tronco hematopoiéticas.....	18
4.6 Medidas do ânion superóxido .....	19
4.7 Ensaio cometa alcalino .....	20
4.7.1 Preparo das lâminas .....	20
4.7.2 Lise e desenovelamento .....	20
4.7.3 Eletroforese .....	21
4.7.4 Neutralização e secagem .....	21
4.7.5 Coloração e análise .....	21
4.8 Análise estatística .....	23
5 RESULTADOS .....	24
5.1 Determinação dos níveis de $\cdot\text{O}_2^-$ .....	24
5.2 Avaliação dos níveis de fragmentação do DNA pelo ensaio cometa.....	25

5.3	Correlação dos níveis de EROS e fragmentação do DNA.....	26
6	DISCUSSÃO.....	28
7	CONCLUSÃO.....	33
8	REFERÊNCIAS.....	34

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Algumas células-tronco e seus respectivos nichos estão listados na tabela. Os componentes do nicho que são derivados das células-tronco estão marcados com asterisco (*); os pontos de interrogação (?) indicam candidatos a componentes do nicho cujo papel regulador ainda precisa ser demonstrado; K6: queratina 6; céls. T reg: células T reguladoras. (Adaptada de HSU, FUCHS, 2012).....	4
Figura 2 - Características gerais de ossos longos, mostrando a cavidade medular e tecido ósseo esponjoso onde se encontra a medula óssea (Applegate, 2012).....	5
Figura 3 - As principais linhagens de células hematopoiéticas. Células sanguíneas maduras são mostradas à direita. CFU, unidade formadora de colônia; GM - granulócitos e monócitos; L - linfócitos; ML - mielóide e linfoide; B - baço (CARLSON, 2014). .....	6
Figura 4 - Imagens típica de cometas representando diferentes níveis de danos no DNA de células de rins de camundongos, tratadas com brometo de etídeo: A) sem danos – ausência de DNA na cauda; B) e C) níveis crescentes de danos; D) maior nível de danos (Adaptado de DIAS et al., 2014). .....	11
Figura 5 - Resultados avaliando diversos parâmetros dos cometas fornecidos pelo programa Casp. Destaque para os parâmetros: porcentagem de DNA na cauda (Tail DNA) e momento da cauda (TM), utilizados neste estudo (esquerda). Imagem do programa Casp mostrando três cometas que foram analisados (direita). .....	22
Figura 6 - Determinação da mediana da intensidade de fluorescência (MFI) decorrente da oxidação do DHE pelo $\cdot O_2^-$ . (*) indica diferença significativa entre os grupos. Nota: Valores expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ vs. jovens (Teste t de Student).....	24
Figura 7 - Parâmetro Tail Dna %, que indica danos no DNA das células. (*) indica diferença significativa entre os grupos. Nota: Valores expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ vs. jovens (Teste t de Student).....	25
Figura 8 - Parâmetro Tail Moment, indica danos no DNA das células. (*) indica diferença significativa entre os grupos. Nota: Valores expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ vs. jovens (Teste t de Student).....	26
Figura 9 - Correlação entre quantidade de EROS e fragmentação no DNA nos camundongos de 2 meses de idade, $r=0,99$ . .....	27
Figura 10 - Correlação entre EROS e fragmentação no DNA nos camundongos de 24 meses de idade, $r=0,96$ .....	27



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das células-tronco quanto à potencialidade .....	3
Tabela 2 - Grupos experimentais .....	15

## LISTA DE ABREVIATURAS

APC - alofococianina

ATP - trifosfato de adenosina

B - baço

BD - Becton, Dickinson and Company

CD - cluster de diferenciação

CEUA - comitê de ética no uso de animais experimentais

CFU - unidade formadora de colônia

CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono

CTNBio - comissão técnica nacional de biossegurança

C57BL/6 - linhagem de camundongo C57 black/6

DHE - dihidroetítideo

DMEM - meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucléico

EDTA - ácido etilenodiaminatetracético

EPM - erro padrão da média

EROS - espécies reativas de oxigênio

*et al.*: *et ali* - e colaboradores

EUA - Estados Unidos da América

FACS - separador celular ativado por fluorescência (*fluorescence activated cell sorter*)

FITC - isotiocianato de fluoresceína

G - gauge

GM - granulócitos e monócitos

HClO - ácido hipocloroso

HNE - 4-hidroxinonenal

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio

IBGE - instituto brasileiro de geografia e estatística

Ig – imunoglobulina

IMMP2L - camundongos *knockout* para o gene IMMP2L

K6 - queratina 6

Kg - quilograma

LMP - agarose de baixo ponto de fusão (*low melting point agarose*)

L - linfócitos

M - molar

mA - miliampere

MACS - separação celular magneticamente ativada (*magnetic activated cell sorter*)

MFI - mediana da intensidade de fluorescência

ML - mielóide e linfóide

ml - mililitro

mm - milímetro

mg - miligrama

µg – micrograma

µl - microlitro

µm – micrômetro

mtDNA - DNA mitocondrial

NaCl - cloreto de sódio

nm – nanômetro

NAD(P)H - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NMP - agarose de ponto de fusão normal (*normal melting point agarose*)

•NO – óxido nítrico

O<sub>2</sub> - oxigênio molecular

•O<sub>2</sub><sup>-</sup> - ânion superóxido

•OH – radical hidroxila

O<sub>3</sub> - ozônio

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> - oxigênio singlet

p - significância estatística

P.A - pró-análise

PBS - solução salina de fosfato tamponada (*phosphate buffered saline*)

PE - ficoeritrina

PE-Cy7 - conjunto de corantes de cianina e ficoeritrina

R - coeficiente de correlação

rpm - rotações por minuto

SFB - soro fetal bovino

SH - grupo tiol

SOD1 e SOD2 - superóxido dismutase 1 e 2

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

UVV - Universidade Vila Velha

V - volts

8-oxo-G - 8-oxoguanine

## RESUMO

CESCHIM, Sara Lopes, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, junho de 2015. **Análise de genotoxicidade em células-tronco hematopoiéticas da medula óssea de camundongos.** Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra<sup>a</sup>. Bianca Prandi Campagnaro.

A utilização de células-tronco em terapias vem crescendo exponencialmente nos últimos anos devido suas características de auto-renovação. No entanto, estudos relatam que com o envelhecimento estas células podem sofrer alterações nas suas funções devido ao estresse oxidativo, provocado pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS), e desencadear efeitos genotóxicos severos. Com o intuito de contribuir para identificação do mecanismo do envelhecimento, em células-tronco, e permitir que estas células sejam utilizadas futuramente na prevenção e tratamento de doenças crônicas e degenerativas em idosos através do transplante autólogo, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do envelhecimento sobre a produção citoplasmática de EROS, por citometria de fluxo, e consequente fragmentação no DNA, pelo ensaio cometa. Para isso, foram utilizadas células-tronco hematopoiéticas da medula óssea de camundongos de 2 e 24 meses de idade da linhagem C57BL/6 divididos em grupo jovem ( $n = 6$ ) e idoso ( $n = 4$ ). Primeiramente as células-tronco hematopoiéticas foram isoladas pela técnica de citometria de fluxo e os níveis de ânion superóxido ( $\cdot O_2^-$ ) foram mensurados pela mediana da intensidade de fluorescência (MFI), após oxidação do dihidroetídio (DHE). Já para avaliação dos danos ao DNA, os cometas formados foram visualizados por microscopia de fluorescência, através da coloração com brometo de etídio, e analisados por um sistema de imagem avaliando os seguintes parâmetros: porcentagem de DNA na cauda (*Tail DNA %*) e o momento da cauda (*Tail Moment*). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM e analisados pelo Teste *t* de *Student*. Os resultados obtidos mostraram que os animais do grupo idoso apresentaram maior produção de  $\cdot O_2^-$  quando comparados aos animais do grupo jovem (Jovem:  $1561 \pm 138$  vs. Idoso:  $3089 \pm 263$ , MFI). A análise de genotoxicidade revelou que os animais do grupo idoso apresentaram níveis maiores, dos dois parâmetros, quando comparados aos animais do grupo jovem (Jovem:  $3.9 \pm 0.8\%$  vs. Idoso:  $32.2 \pm 2.5\%$ , *Tail DNA %*) e (Jovem:  $0.7 \pm 0.2$  vs. Idoso:  $37.5 \pm 2.8$ , *Tail moment*). Esses resultados sugerem que o envelhecimento aumenta a produção de EROS e consequentemente há formação de danos no DNA de células-tronco, podendo comprometer suas funções.

Palavras-chave: envelhecimento, ânion superóxido, estresse oxidativo, danos ao DNA, ensaio cometa

## ABSTRACT

CESCHIM, Sara Lopes, M.Sc., University Vila Velha – ES, June de 2015. **Genotoxicity analysis of hematopoietic stem cells from bone marrow of mice.** Advisor: Prof<sup>a</sup>. Dra<sup>a</sup>. Bianca Prandi Campagnaro.

In the last decades, stem cells therapy emerged as an alternative to conventional treatment due to its particular characteristics. However, stem cells of intensely regenerative organs and tissues are more susceptible to the cellular damage caused by both intrinsic and extrinsic stressors. Although the response to this process in hematopoietic stem cells (HSC) is crucial, the mechanisms by which hematopoietic homeostasis is sustained are not completely understood. The genes involved in genomic integrity and transcriptional regulation are downregulated in aged cells as a consequence of the accumulation of reactive oxygen species (ROS), which could trigger genotoxicity. In order to determine aging effects on hematopoietic stem cells functionality, in this study, we assessed ROS production and DNA damage, in young and aged (2-, and 24-month-old, respectively) C57BL/6 mice. First, mice were euthanized and the femurs and tibias were removed. The marrow cavities were flushed out and the cell suspension were placed in culture with DMEM supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. To enrich the hematopoietic progenitor cell fraction, lineage committed cells were depleted using the Mouse Hematopoietic Stem Cell Enrichment Set (BD) and the Lin<sup>-</sup> cells were stained with monoclonal antibodies conjugated to different fluorochromes (CD90 (APC), CD133 (PE), SCA1 (FITC) e CD117 (PE-Cy7)). ROS analysis was performed by flow cytometry. Dihydroethidium (DHE, 160 µM) were added to the cell suspension (10<sup>6</sup> cells) and incubated at 37°C for 30 min in the dark to estimate the intracellular •O<sub>2</sub><sup>-</sup> concentration. The cells were then washed, resuspended in PBS and analyzed by flow cytometry (FACSCanto II). The data were acquired using the FACSDiva software (BD) and overlay histograms were analyzed using FCS Express software trial (De Novo). The cells were excited at 488 nm; DHE fluorescence was detected using a 585/42 bandpass filter. The data are expressed as the median fluorescence intensity (MFI). DNA damage was assessed using the alkaline comet assay. In brief, histological slides were pre-coated with 1.5% normal melting point agarose in PBS in a water-bath at 65°C. Subsequently, 40 µL of the cell suspension was embedded in 100 µL of 0.5% low melting point agarose in PBS at 37°C and spread on agarose-precoated slides using coverslips. Then, the slides were placed in an electrophoresis chamber filled with freshly prepared alkaline buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) for 20 min at 4°C, and electrophoresed at 300 mA and 20 V for 30 min. Subsequently, the slides were neutralized with a 0.4 M Tris buffer (pH 7.5) for 5 min, washed with cold distilled water and allowed to dry at room temperature overnight. Migration of the DNA fragments towards the anode creates a comet 'tail' as visualized by staining with ethidium bromide (20 µg/mL, Sigma-Aldrich). Immediately afterwards, images were obtained at a magnification of 200x using a fluorescence optical microscope (Nikon Eclipse Ti, Melville, NY, USA) equipped with excitation (510-550 nm) and barrier (590 nm) filters. The coded images were acquired using a CCD camera (Nikon) and analyzed using the CASP program (public domain). Data are presented as mean ± SEM. Student's *t* test were performed using Graphpad prism 6 software to establish statistical significance between experimental groups at the *p* <0 .05 (\*) level. Aged HSCs showed an increase in intracellular •O<sub>2</sub><sup>-</sup> (3089 ± 263, MFI) compared with young cells (1561 ± 138, MFI). In addition to increased ROS production, we observed

augmented DNA damage in aged mice determined by tail DNA % (Young:  $3.9 \pm 0.8\%$  vs. Aged:  $32.2 \pm 2.5\%$ ) and tail moment (Young:  $0.7 \pm 0.2$  vs. Aged:  $37.5 \pm 2.8$ ) compared with young mice. These data suggest that this condition affects HSC homeostasis and contributes to increased DNA damage which leads to the premature exhaustion of self-renewal in these cells. In addition, aging impairs the functionality and quality of HSCs and that these age-associated alterations may affect the efficacy of aged HSC recovery and transplantation.

Key words: ageing, superoxide anion, oxidative stress, DNA damage, comet assay

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Envelhecimento

O envelhecimento é um processo biológico que acomete a todos de forma lenta e progressiva proporcionando mudanças fisiológicas (GAZIT et al., 2008). Essas mudanças afetam a capacidade de adaptação do indivíduo ao meio ambiente através de limitações físicas e psicológicas contribuindo para o surgimento de doenças crônicas que interferem na qualidade de vida do idoso (HAYFLICK, 2007; SILVA, FERRARI, 2011).

Nos últimos anos, através de estudos demográficos, foi possível observar um aumento progressivo da expectativa de vida da população de terceira idade que pode ser justificado pela queda da taxa de fecundidade e mortalidade (EWERS et al., 2008; SILVA, FERRARI, 2011). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE 2010) os idosos representam aproximadamente 8,6% da população brasileira, cerca de 15 milhões de pessoas. A estimativa para os próximos 20 anos é de que esta amostragem ultrapasse os 30 milhões, equivalente a 13 % da população.

Devido ao aumento da expectativa de vida há um crescente interesse em retardar ou reverter os efeitos deletérios provocados pelo envelhecimento (VAN ZANT, LIANG, 2003). Sendo assim, pesquisas são realizadas com o objetivo de estabelecer terapias eficazes contra doenças crônicas e degenerativas ou mesmo minimizar os danos em células e tecidos, com o intuito de melhorar a qualidade de vida do idoso (GEIGER et al., 2014).

As células-tronco são constantemente utilizadas em estudos devido suas características de auto-renovação e diferenciação em vários tipos celulares, contribuindo para manutenção da homeostase dos tecidos ao longo da vida (ERGEN, GOODELL, 2010). No entanto, no envelhecimento, observa-se um comprometimento da atividade funcional dessas células (GEIGER, RUDOLPH, 2009) e danos ao DNA (VIJG, DOLLÉ, 2002) o que acarreta em diminuição da homeostase e do reparo tecidual (SUDO et al., 2000; VAN ZANT, LIANG, 2003) e conseqüente crescimento desordenado das células (DENDULURI, ERSHLER, 2004), prejudicando seu uso em terapias para idosos.

Uma das hipóteses para justificar o declínio das funções orgânicas e danos celulares no envelhecimento foi proposta por Harman na década de 50 e ficou conhecida como teoria dos radicais livres (HARMAN, 1956). Esta teoria destaca que



os danos acumulativos às macromoléculas celulares através da produção de radicais livres é o principal determinante do tempo de vida do organismo (HARMAN, 1956; KREGEL, ZHANG, 2007). Altos níveis de radicais livres, principalmente os derivados do oxigênio, promovem danos ao DNA e alterações na expressão gênica (GAVA, ZANONI, 2005; SILVA, FERRARI, 2011) que comprometem as funções das células proporcionando o aparecimento de doenças degenerativas e até mesmo a morte (HAYFLICK, 2007).

A senescência celular é um processo biológico que também contribui para o envelhecimento do organismo, pois as células perdem a capacidade de se dividir depois de um número finito de divisões celulares (HAYFLICK, MOORHEAD, 1961) e, além disso, as células senescentes estão associadas com elevado nível de radicais livres e danos oxidativos às macromoléculas (PASSOS et al., 2007). Em indivíduos idosos há evidência de acúmulo de células senescentes (DIMRI et al., 1995; TEIXEIRA, GUARIENTO, 2010) o que afeta a fisiologia do organismo tornando-o mais suscetível aos efeitos deletérios do envelhecimento (BALCOMBE, SINCLAIR, 2001).

Contudo, mesmo com uma definição já bem estabelecida sobre as consequências do envelhecimento nas células e tecidos este continua a ser um dos fenômenos biológicos com vários aspectos relevantes que ainda precisam ser esclarecidos. Esta dificuldade ocorre devido a sua natureza complexa bem com a ausência de distinção entre seus efeitos normais daqueles que se manifestam em consequência de doenças associadas à idade (KREGEL, ZHANG, 2007; FREITAS, DE MAGALHÃES, 2011).

Identificar e reverter os efeitos do envelhecimento, principalmente nas células-tronco, tornou-se um grande desafio. Pesquisas na área da medicina regenerativa buscam criar condições ideais para o reparo, regeneração e/ou substituição de tecidos lesados, fornecendo uma melhor qualidade de vida em idosos (BOROJEVIC, 2008).

## *1.2 Células-tronco*

As células-tronco são células indiferenciadas com características de auto-renovação e diferenciação prolongada ou ilimitada em pelo menos um tipo de célula adulta com propriedades morfológicas e funcionais especializadas tais como: células musculares, nervosas, epiteliais, pancreáticas e sanguíneas (HALL, WATT, 1989; HERZOG et al., 2003; MOSAAD, 2014), estas particularidades permitem que sejam

utilizadas em terapias para diversas doenças ainda sem tratamento eficaz, com o intuito de prevenir a progressão e conseqüentemente reverter processos patológicos por meio da regeneração de tecidos danificados (SCHWINDT et al., 2005).

As células-tronco podem ser classificadas de acordo com seu tecido de origem e sua potencialidade (plasticidade), ou seja, o potencial de se diferenciar em um ou mais tipos específicos de células maduras sob condições apropriadas (LAJTHA, 1979; HERZOG et al., 2003). A classificação quanto à potencialidade das células-tronco (Tabela 1) foi descrita em ordem decrescente como: totipotentes, pluripotentes e multipotentes (LAJTHA, 1979; NETTO, DESSEM, 2006).

**Tabela 1.** Classificação das células-tronco quanto à potencialidade.

CLASSIFICAÇÃO	DESCRIÇÃO
Totipotentes	Capacidade de originar todas as células de um organismo adulto incluindo os tecidos embrionários. Ex. zigoto, até a fase de 8 células ou início da mórula
Pluripotentes	Capacidade de se diferenciar em qualquer uma das camadas germinativas. Ex. células-tronco embrionária
Multipotentes	Capacidade de gerar um número limitado de células especializadas, geralmente com especificidade para uma das camadas germinativas. Ex. células-tronco adultas

Quanto à sua origem, as células-tronco podem ser classificadas em embrionárias ou adultas. As células-tronco embrionárias são obtidas a partir de um embrião nos estágios iniciais de desenvolvimento, ou seja, o blastocisto (entre 4 ou 5 dias após a fecundação) (NETTO, DESSEM, 2006; BUEHR et al., 2008).

À medida que o embrião se desenvolve, as células-tronco do interior do blastocisto se diferenciam nas três camadas germinativas: endoderma, mesoderma e

ectoderma, precursoras de todos os tecidos e órgãos adultos (NETTO, DESSEM, 2006; BUEHR et al., 2008; SEONG et al., 2010). Porém, sua utilização em pesquisas é dificultada por questões éticas e religiosas, e pelo alto risco de formação de teratomas e rejeição imunológica nos tecidos, devido sua intensa capacidade de proliferação e diferenciação (SWIJNENBURG et al., 2005; WINKLER et al., 2005). Essa falta de compreensão dos efeitos pós-terapêutico, com células-tronco embrionárias, gera questionamentos para sua utilização na área médica (BOROJEVIC, 2008).

Já as células-tronco adultas apresentam menor potencialidade quando comparadas as células-tronco embrionárias (NHI, 2001; NETTO, DESSEM, 2006; HSU, FUCHS, 2012) e habitam locais anatômicos específicos denominados nichos, responsáveis pelo comportamento dessas células que influenciam sua proliferação e também ajudam a manter o seu estado indiferenciado (HSU, FUCHS, 2012). Podem ser encontradas na maioria dos tecidos de todo o organismo (Figura 1), tais como o cérebro, polpa dentaria, placenta, cordão umbilical, medula óssea, músculo esquelético, fígado e pâncreas (NHI, 2001; HSU, FUCHS, 2012).



O diagrama mostra um corpo humano com pontos de amostragem para: Folículo capilar (cabeça), Polpa de dente (boca), Músculo orbicular do lábio (lábio), Sistema hematopoiético (tórax), Epiderme interfolicular (pele), Medula óssea (costela) e Músculo esquelético (perna). À direita, uma tabela resume as informações.

Tipo Celular	Localização das células-tronco	Componentes do nicho
Folículo capilar	Bulbo	Bulbo K6 <sup>+</sup> , papila dermal, pré-adipócitos, gordura subcutânea
Polpa de dente	Polpa de dente	Dentina, câmara pulpar, ligamento periodontal, osso
Músculo	Músculo orbicular do lábio	Miofibras* (?)
Sistema hematopoiético	Medula óssea	Macrófagos, céls. T reg, osteoblastos, adipócitos, glia
Epiderme interfolicular	Camada basal da epiderme	Fibroblastos dermais
Músculo esquelético	Entre a membrana basal e as fibras musculares	Miofibras* (?)

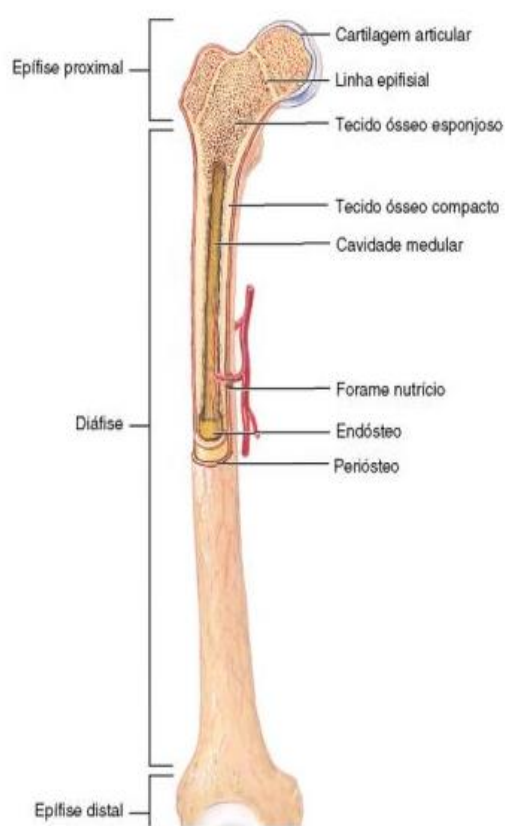
**Figura 1.** Algumas células-tronco e seus respectivos nichos estão listados na tabela. Os componentes do nicho que são derivados das células-tronco estão marcados com asterisco (\*); os pontos de interrogação (?) indicam candidatos a componentes do nicho cujo papel regulador ainda precisa ser demonstrado; K6: queratina 6; céls. T reg: células T reguladoras. (Adaptada de HSU, FUCHS, 2012).

A utilização de células-tronco adultas em terapias vem se tornando foco de pesquisas devido suas características de reparo e regeneração (GLOTZBACH et al.,

2011) de tecidos lesados por trauma, doenças degenerativas ou senescência (BOROJEVIC, 2008).

### 1.2.1 Medula óssea

A medula óssea, principal fonte de células-tronco adultas, é um tecido gelatinoso, altamente vascularizado, encontrado principalmente na substância esponjosa e na cavidade medular dos ossos longos (Figura 2), partes das vértebras, esterno, costelas, crânios, escápulas, pelve (MARTINI et al., 2009; APPLGATE, 2012).

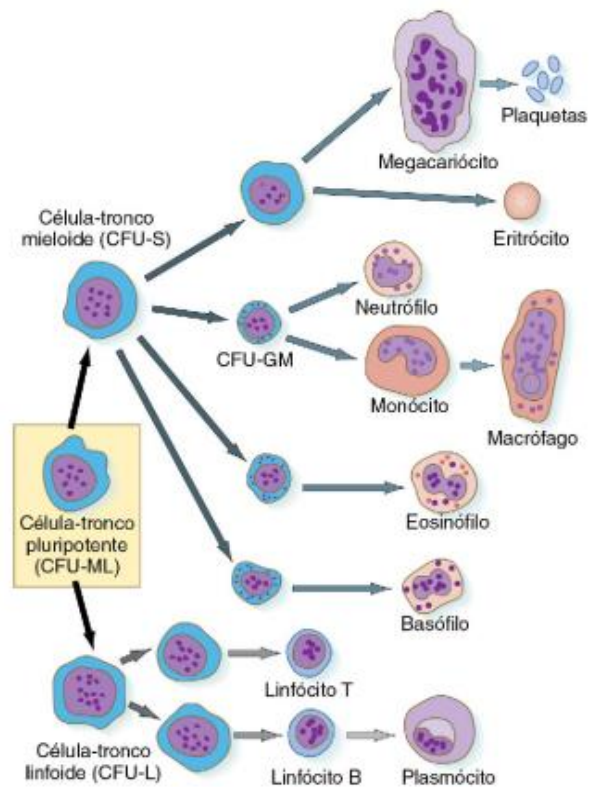


**Figura 2.** Características gerais de ossos longos, mostrando a cavidade medular e tecido ósseo esponjoso onde se encontra a medula óssea (Applegate, 2012).

Além de ser o órgão mais comumente utilizado como fonte de células-troncos, é na medula que ocorre o processo de hematopoiese e formação óssea na maioria dos vertebrados. As células-tronco adultas também podem ser classificadas quanto ao tipo em: células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais, esta última encontrada no sistema celular estromal e capaz de originar células dos tecidos ósseo, cartilaginoso e adiposo (KOPP et al., 2005; ANTHONY, LINK, 2014).

### 1.2.2 Célula-tronco hematopoiética

As células sanguíneas maduras são originadas durante a hematopoiese (processo de renovação celular do sangue) e formadas a partir de várias células com funções especializadas (Figura 3) as quais se originam de uma população rara de células, as chamadas células-tronco hematopoiéticas (GEIGER, RUDOLPH, 2009). As primeiras células que compõem o sistema hematopoiético originam duas linhagens: mielóide e linfóide. A linhagem mielóide é precursora de hemácias, monócitos, células dendríticas mielóides, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e células precursoras de mastócitos. Já a linhagem linfóide, por sua vez, origina os linfócitos T, linfócitos B, células NK, e células dendríticas linfóides (TRIGG, 2004; CARLSON, 2014).



**Figura 3.** As principais linhagens de células hematopoiéticas. Células sanguíneas maduras são mostradas à direita. CFU, unidade formadora de colônia; GM - granulócitos e monócitos; L - linfócitos; ML - mielóide e linfóide; B - baço (CARLSON, 2014).

As células-tronco hematopoiéticas são formadas durante o desenvolvimento embrionário e sua produção inicia-se no fígado fetal e continua na medula óssea (BRYDER et al., 2006; GOLUB, CUMANO, 2013). A medula óssea é o principal órgão de produção dessas células, mas também podem ser encontradas circulando no sangue periférico e no cordão umbilical (D. HO, PUNZEL, 2003; TRIGG, 2004; CHOTINANTAKUL, LEEANANSAKSIRI, 2012).

Em um indivíduo, normalmente são formadas por dia cerca de um trilhão de células do sangue na medula óssea, devido ao curto período de vida dessas células. No entanto, as células-tronco hematopoiéticas com propriedades de auto-renovação e diferenciação ao longo da vida constituem uma população de células multipotentes muito rara, correspondendo a aproximadamente 1 em cada 100.000 do total das células na medula e menos ainda no sangue periférico (MOSAAD, 2014).

Além de raras, as células-tronco hematopoiéticas são também altamente heterogêneas, o que dificulta sua identificação (MOSAAD, 2014). Para identificar e isolar essas células é necessário conhecer seus antígenos de superfície os quais são proteínas que podem ser utilizadas como marcadores de populações celulares e que permitem sua seleção (NHI, 2001). Entretanto, as células-tronco hematopoiéticas não possuem um marcador específico, por isso, uma combinação de anticorpos é utilizada para detectar a presença (marcadores positivos) ou ausência (marcadores negativos) de determinados antígenos de superfície que permitem a identificação e quantificação destas células (NHI, 2001; KEKARAINEN et al., 2006).

Os antígenos de superfície mais comumente utilizados para identificação de células-tronco hematopoiéticas são: CD34<sup>+</sup> (MUND et al., 2012), CD38<sup>-</sup> (MUND et al., 2012), CD133<sup>+</sup> (KEKARAINEN et al., 2006), Thy<sup>-1</sup><sub>low</sub> (KIEL et al., 2005), Lin<sup>-</sup> (HERZOG et al., 2003), CD90<sup>+</sup> (CHOTINANTAKUL, LEEANANSAKSIRI, 2012), Sca1<sup>+</sup> (KIEL et al., 2005) e CD117<sup>+</sup> (CHITTETI et al., 2010). Estes antígenos quando ligados a anticorpos conjugados a moléculas de fluorocromos permitem a caracterização das células por citometria de fluxo (NHI, 2001; CHOTINANTAKUL, LEEANANSAKSIRI, 2012).

A identificação de células-tronco é importante para que possam ser utilizadas em terapias específicas. Com o intuito de ampliar a utilização de células-tronco hematopoiéticas em vários outros tratamentos e com isso reverter processos patológicos, pesquisas vem sendo realizadas com objetivo de desenvolver métodos

capazes de identificar e isolar essas células mais facilmente (GOLUB, CUMANO, 2013).

Com a descoberta da plasticidade das células-tronco hematopoiéticas, ou seja, da capacidade de se diferenciar não somente em células sanguíneas, mas também em outros tipos de células especializadas tais como: adipócitos (SERA, et al., 2009), cardiomiócitos (POZZBON et al., 2010), células endoteliais (ELKHAFIT et al., 2011), fibroblastos/miofibroblastos (EBIHARA et al., 2006), células do fígado (NHI, 2006), rins (NHI, 2006) e pancreáticas (MINAMIGUCHI et al., 2008), estudos sugerem a possibilidade do seu uso na regeneração de diferentes órgãos e tecidos (CHOTINANTAKUL, LEEANANSAKSIRI, 2012).

Além disso, outra importante característica das células-tronco hematopoiéticas, é a capacidade de se auto-renovar, permitindo a manutenção da homeostase do organismo (INSINGA et al., 2014). No entanto, danos cumulativos às células-tronco podem afetar de forma permanente o sistema hematopoiético comprometendo as funções das células-tronco hematopoiéticas (FUCHS et al., 2004), possibilitando a incidência de doenças hematológicas (ATTEMA et al., 2009; BALASUBRAMANIAN, LONGO, 2013).

O envelhecimento é um dos fatores responsáveis por alterações nas funções das células-tronco (VAN ZANT, LIANG, 2003; ATTEMA et al., 2009; GEIGER et al., 2014). Este processo está associado a lesões celulares devido principalmente ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) o que pode comprometer sua aplicação terapêutica (KREGEL, ZHANG, 2007).

### *1.3 Espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo*

A teoria dos radicais livres, descrita por Harman na década de 50, afirma que fatores genéticos, ambientais e o acúmulo de radicais livres estão envolvidos no processo de envelhecimento promovendo alterações deletérias em células e tecidos, o que aumenta o risco de doenças crônicas e até mesmo a morte (HARMAN, 1956; KREGEL, ZHANG, 2007).

No entanto, o acúmulo de radicais livres nas células é o principal determinante do envelhecimento. Essas moléculas são altamente reativas, pois são compostas por elétrons desemparelhados, e por isso podem participar de reações indesejáveis resultando em danos celulares (KREGEL, ZHANG, 2007). Existem moléculas que agem como radicais livres, porém não possuem elétrons

desemparelhados na sua estrutura, como por exemplo: peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HClO$ ), ozônio ( $O_3$ ) e oxigênio singlet ( $^1O_2$ ) portanto, são menos reativas, mais estáveis e apresentam uma meia vida mais longa quando comparadas aos radicais (PARAVICINI, TOUYZ, 2008).

Os radicais livres derivados do oxigênio representam a classe mais importante nos seres vivos e originam as EROS (HARMAN, 1981; VALKO et al., 2007). Fazem parte desse grupo os radicais livres: ânion superóxido ( $\cdot O_2^-$ ), radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) e óxido nítrico ( $\cdot NO$ ) (KREGEL, ZHANG, 2007).

As EROS são formadas continuamente como subprodutos do metabolismo aeróbico normal, mas também podem ser produzidas sob condições patológicas ou de forma exógena, a partir de fatores externos (BERRA et al., 2006; KREGEL, ZHANG, 2007; NAKA et al., 2008). Um dos principais locais endógenos para produção de EROS é a mitocôndria (KOWALTOWSKI et al., 2009). Entretanto, outros exemplos de fontes intracelulares incluem reações envolvendo citocromo P-450, enzimas NAD(P)H oxidase e xantina-oxidase (GROEMPING, RITTINGER, 2005). Já as fontes exógenas que originam as EROS incluem a radiação, agentes patogênicos, exposição à luz ultravioleta e a xenobióticos (KREGEL, ZHANG, 2007).

Níveis intracelulares adequados de EROS desempenham um papel vital na regulação de processos fisiológicos como a sinalização celular e a expressão gênica (BERRA et al., 2006). No entanto, a produção excessiva dessas moléculas ou inadequação de agentes antioxidantes desencadeiam um desequilíbrio prejudicial ao organismo (NAKA et al., 2008; JONES et al., 2014). Em um ambiente fisiológico, esse desequilíbrio entre a produção e eliminação de EROS, é definido como estresse oxidativo que contribui para o acúmulo de danos oxidativos aos constituintes celulares e se não forem reparados podem ser irreversíveis (KREGEL, ZHANG, 2007).

Os antioxidantes são compostos responsáveis pela eliminação ou inibição da formação de EROS e são constituídos por enzimas como catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e superóxido dismutase (SOD); proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes (íons ferro e cobre) como por ex., as transferrinas, ferritinas, metalotioneínas e haptoglobinas; moléculas de baixo peso molecular que possuem a capacidade de captar EROS via auto-oxidação, como por ex., glutathione e aquelas que possuem grupo tiol (SH); ou vitaminas como  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C) e  $\beta$ -caroteno (Vitamina A), disponíveis na dieta (BERRA et al., 2006; UTTARA et al., 2009).



Níveis elevados de EROS podem induzir alterações nas funções celulares, condições patológicas, estimular o envelhecimento, apoptose e desencadear danos às macromoléculas, como lipídios, proteínas e DNA (HAGEN, 2003; KREGEL, ZHANG, 2007; UTTARA et al., 2009). Danos que afetam a molécula de DNA podem contribuir para o aparecimento de doenças crônicas e degenerativas (KREGEL, ZHANG, 2007; SILVA, FERRARI, 2011) como o câncer, diabetes, artrite reumatoide e doenças cardiovasculares (KREGEL, ZHANG, 2007).

Quando o tipo e a quantidade de danos, provocados pelas EROS, superam a capacidade de reparo das células, os mecanismos básicos e essenciais para regulação do ciclo celular são afetados, desencadeando efeitos genotóxicos severos (BERRA et al., 2006; SILVA, FERRARI, 2011) que podem ser mensurados por métodos que avaliam a fragmentação do DNA nas células (JONES et al., 2014).

#### *1.4 Fragmentação do DNA X ensaio cometa*

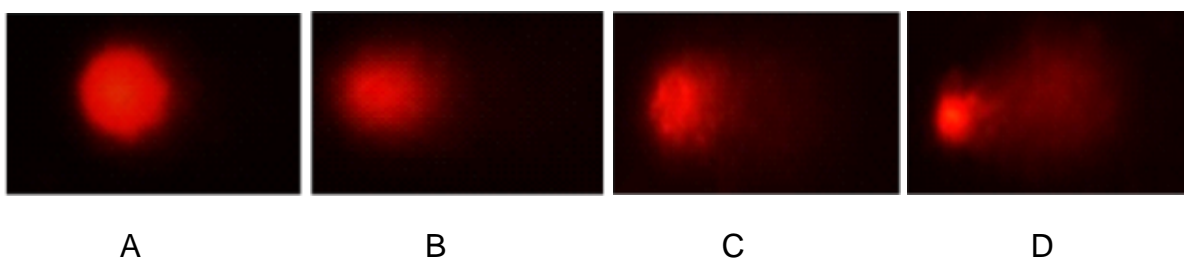
O DNA é responsável por importantes funções no organismo como a de armazenamento e transmissão de informações genéticas (INSINGA et al., 2014). Por isso, o acúmulo de danos à molécula de DNA pode desencadear falha na transcrição, interrupção do ciclo celular e apoptose (VIJG, DOLLÉ, 2002) e como consequência ocasionar disfunção celular e envelhecimento precoce do organismo por defeitos em genes de reparo (VIJG, DOLLÉ, 2002; FREITAS, DE MAGALHÃES, 2011). No entanto, os danos no DNA se acumulam com a idade em diferentes tecidos, contribuindo para incidência de inúmeras doenças crônicas. Portanto, a hipótese de que o acúmulo de danos ao DNA é a principal causa de envelhecimento vem sendo cada vez mais estudada (FREITAS, DE MAGALHÃES, 2011).

A fragmentação do DNA pode ser detectada utilizando-se o ensaio cometa ou “eletroforese em gel de célula única”, descrito pela primeira vez em 1984 por dois pesquisadores suecos, Ostling e Johanson. Poucos anos depois, Singh et al., (1988), fizeram algumas adaptações no método e introduziram uma versão do ensaio utilizando um pH alcalino (pH>13) com o objetivo de aumentar a velocidade de migração do DNA danificado (KARLSSON et al., 2015). Na prática, algumas modificações podem ser realizadas visando atingir uma excelência do método, mas, o protocolo inicial se manteve praticamente inalterado desde que foi descrito (KARBASCHI, COOKE, 2014).

Devido a sua simplicidade, sensibilidade, versatilidade, rapidez e economia o teste do cometa tornou-se, nas últimas décadas, um método padrão para o estudo da formação e reparo de danos no DNA, sendo utilizado como marcadores em testes de genotoxicidade em células individuais (COLLINS, 2004; KARBASCHI, COOKE, 2014). Os danos mais detectados no DNA são quebras nas fitas (simples ou dupla), danos álcali-lábeis e crosslinks (SINGH et al., 1988), bem como danos oxidativos provocados por EROS (COLLINS, 2014; KARLSSON et al., 2015).

Basicamente, para realização do ensaio cometa, células isoladas são incorporadas em gel de agarose, lisadas e submetidas à eletroforese a um pH elevado (COLLINS, 2014). Na solução de lise ocorre a remoção dos conteúdos celulares com exceção do material nuclear, já na solução de eletroforese ocorre a espiralização do DNA nos pontos de quebra da fita permitindo que os danos sejam revelados (YENDLE et al., 1997; COLLINS et al., 1997; KLAUDE et al., 1996).

À medida que a frequência de quebra de DNA aumenta, o mesmo acontece com a fração do DNA que se prolonga em direção ao anodo, formando a cauda do cometa que pode ser visualizado utilizando microscopia de fluorescência, após coloração com corante específico (Figura 4) (LORENZO et al., 2013; COLLINS, 2014). Quanto maior a cauda do cometa maior quantidade de DNA danificado (LORENZO et al., 2013).



**Figura 4.** Imagens típica de cometas representando diferentes níveis de danos no DNA de células de rins de camundongos, tratadas com brometo de etídeo: A) sem danos – ausência de DNA na cauda; B) e C) níveis crescentes de danos; D) maior nível de danos (Adaptado de DIAS et al., 2014).

Os cometas obtidos são medidos por programas de captura e análise de imagens capazes de avaliar diversos parâmetros com o intuito de mensurar a fragmentação de DNA (LOWELL; OMORI, 2008). Parâmetros como o momento da cauda (*Tail Moment*) e porcentagem de DNA na cauda (*Tail DNA%*) são utilizados para quantificação desses danos (LORENZO et al., 2013).

Portanto, através do ensaio cometa é possível avaliar os efeitos do envelhecimento em células-tronco por meio da quantificação dos danos na molécula de DNA devido ao acúmulo de EROS (AFANAS'EV, 2013) e, conseqüentemente, para que possíveis terapias possam ser desenvolvidas visando alternativas aos tratamentos convencionais, proporcionando uma melhor qualidade de vida ao idoso.

## 2 JUSTIFICATIVA

Com o avanço das pesquisas em terapia celular o potencial terapêutico das células-tronco vem sendo cada vez mais avaliado devido suas características de prevenir a progressão e conseqüentemente reverter processos patológicos por meio do reparo e regeneração de tecidos danificados. No entanto, ao longo da vida as células do organismo humano, inclusive as células-tronco, estão susceptíveis aos danos celulares provocados pelo processo de envelhecimento.

Os mecanismos moleculares para o desenvolvimento precoce do envelhecimento ainda não foram totalmente identificados. Entretanto, estudos relacionam o acúmulo de EROS e conseqüentes danos no DNA ao envelhecimento. Identificar e reverter os efeitos do envelhecimento, principalmente nas células-tronco, tornou-se um grande desafio. Apesar do enorme avanço nas pesquisas os resultados obtidos ainda são contraditórios sendo necessários mais estudos para avaliar o potencial destas células quando retiradas do indivíduo idoso para sua própria utilização.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 *Objetivo geral*

Avaliar os efeitos do envelhecimento sobre a genotoxicidade de células-tronco hematopoiéticas da medula óssea de camundongos idosos, comparando-os com camundongos jovens.

#### 3.2 *Objetivos específicos*

Avaliar os efeitos do envelhecimento em células-tronco hematopoiéticas isoladas da medula óssea de camundongos de 2 e 24 meses de idade, através da:

- Produção citoplasmática de EROS, por citometria de fluxo.
- Fragmentação do DNA, pelo ensaio cometa alcalino.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos e isogênicos da linhagem C57BL/6 de 2 e 24 meses de idade, provenientes do biotério do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular, pertencente ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Estes animais foram mantidos em gaiolas individuais até atingirem a idade de 2 e 24 meses. Neste período foram alimentados com água filtrada e ração *ad libitum*, mantidos sob temperatura controlada de 22°C, umidade relativa do ar a 70% e ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais Experimentais (CEUA) da Universidade Vila Velha (UVV) com o número de registro 262/2013

### 4.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais (Tabela 2):

**Tabela 2 – Grupos experimentais**

<b>Grupos</b>	<b>Animais</b>	<b>Idade</b>	<b>n</b>
Jovem	C57	2 meses	6
Idoso	C57	24 meses	4

### 4.3 Obtenção das amostras

Os animais foram eutanasiados com uma dose letal intraperitoneal do anestésico tiopental sódico (40mg/Kg) e em seguida, levados para a câmara de fluxo laminar e higienizados com álcool a 70%.

#### 4.3.1 Isolamento das células mononucleares da medula óssea

Neste estudo, foram utilizadas células-tronco hematopoiéticas isoladas da medula óssea dos camundongos para análise dos efeitos genotóxicos do envelhecimento. No entanto, primeiramente foi necessário o isolamento da população de células mononucleares da medula constituída basicamente por células-tronco, linfócitos e monócitos.

Após higienização dos camundongos eutanasiados foi realizada uma incisão nos membros inferiores, com o auxílio de uma tesoura, para remoção da pele e dos tecidos que recobriam os fêmures e tíbias. Uma dissecção foi feita, com auxílio de uma pinça, para retirar todo o tecido excedente deixando apenas os ossos.

Com a separação da tíbia do fêmur, os ossos foram colocados em uma placa de Petri com meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM - SIGMA) e em seguida um corte nas suas extremidades foi realizado com uma tesoura, para exposição do canal medular. A retirada da medula óssea foi com o auxílio de uma seringa de 1 ml e uma agulha (26G), aspirando 1 ml do meio DMEM e injetando dentro da cavidade medular, procedimento conhecido como flushing. Esta suspensão formada (contendo meio de cultura DMEM e medula óssea) foi transferida para um tubo Falcon 14 ml (BD) esterilizado, este processo foi repetido até a total remoção da medula (CAMPAGNARO et al., 2013).

Por fim, acrescentou-se meio DMEM até um volume de 10 ml no tubo, a suspensão foi homogeneizada e centrifugada (centrífuga Eppendorf 5702) por 10 minutos a 1200 rotações por minuto (rpm). Após esta centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado no fundo do tubo ressuspendido em 4 ml de meio DMEM, esta solução foi filtrada vagarosamente (filtro - 70µm) e transferida para um novo tubo Falcon (CAMPAGNARO et al., 2013).

Em outro tubo foram colocados 4 ml do gradiente de densidade Histopaque 1083® (SIGMA ALDRICH), específico para separação de células mononucleares de ratos e camundongos. Os 4 ml filtrados da centrifugação anterior foram então depositados lentamente sobre o gradiente de densidade com auxílio de uma pipeta para não misturar as duas fases. Foi realizada então, uma segunda centrifugação por 30 minutos a 1500 rpm com este novo tubo contendo os 4 ml de células + 4 ml de Histopaque 1083® (CAMPAGNARO et al., 2013).

Após esta segunda centrifugação foi possível observar a formação de várias camadas no tubo, indicando a presença das células mononucleares,

granulócitos, plaquetas e eritrócitos. Os eritrócitos, leucócitos e granulócitos, após centrifugação, se sedimentam no fundo do tubo e na parte superior (fase aquosa) estão presentes as plaquetas e proteínas plasmáticas. A camada constituída pela parte turva indica a localização das células mononucleares, que foi retirada com auxílio de uma pipeta Pasteur e transferida para um novo tubo Falcon. Para total remoção de resíduos do Histopaque 1083® nestas células, foram realizadas três centrifugações por 10 minutos a 1200 rpm cada, com uma solução tampão fosfato salina (PBS – 10%). Por fim, após a última lavagem, todo o PBS foi retirado e as células ressuspendidas em 1 ml de meio de cultura DMEM (CAMPAGNARO et al., 2013).

#### *4.4 Cultura de células-tronco*

As células mononucleares da medula óssea foram preparadas para cultura seguindo o protocolo de Kawasaki-Oyama et al., (2008) com adaptações. Assim, o cultivo foi realizado em placas com 6 poços, sendo 2 poços para cada animal, com uma concentração de  $2 \times 10^6$  células/ml. As células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos, ressuspendidas em 3,5 ml de DMEM e suplementadas com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 1% de penicilina (100U/ml) e 1% de estreptomicina (100µg/ml), em seguida, incubadas à 37°C em atmosfera úmida, contendo CO<sub>2</sub> a 5,0%. A primeira troca de meio foi realizada com 3 a 4 dias após o início do cultivo, retirando-se 4 ml do meio acondicionado e substituindo-se por 4 ml de meio fresco. Nesta etapa foi possível identificar as células-tronco mesenquimais pois ficavam aderidas ao frasco e quando as células em cultivo alcançavam confluência de aproximadamente 80% o sobrenadante, contendo teoricamente células-tronco hematopoiéticas, era retirado e centrifugado a 1200rpm por 10 minutos. No entanto, devido a heterogeneidade das células-tronco hematopoiéticas as amostras foram submetidas às técnicas de micro-esferas magnéticas e citometria de fluxo para identificação total dessas células.



#### 4.5 Identificação das células-tronco hematopoiéticas

Para identificação das células-tronco hematopoiéticas duas técnicas distintas, mas que se complementam, foram realizadas neste estudo. Primeiramente, através da utilização de anticorpos conjugados à micro-esferas magnéticas (MACS: *magnetic activated cell sorting*) foi possível o isolamento das linhagens mielóides e linfóides (células Lin) provavelmente contidas na suspensão de células isoladas da medula óssea. Seguindo o protocolo de Kerarainen et al., (2006) 50 µl do coquetel de anticorpos de células Lin (Lineage Cocktail BD® - CD3, CD11, CD45R/B220, LY-6G, Ly-6C e TER119) e 50 µl de MACS foram adicionados na solução de células-tronco hematopoiéticas por 15 minutos à temperatura ambiente. Esta seleção imunomagnética permite que células que possuem marcadores específicos da linhagem linfóide e mielóide sejam separadas das células-tronco hematopoiéticas. Pela ausência de marcadores da linhagem linfóide e mielóide, as células-tronco hematopoiéticas são classificadas como células Lin<sup>-</sup> (HERZOG et al., 2003).

Cerca de 90% de purificação das células-tronco hematopoiéticas pode ser obtido pela técnica MACS (KEKARAINEN et al., 2006). No entanto, neste estudo, a suspensão de células-tronco hematopoiéticas Lin<sup>-</sup> foi também submetida ao protocolo de identificação celular ativada por fluorescência (FACS: *fluorescence activated cell sorting*), através do citômetro de fluxo FACSCANTO II (Becton Dickinson).

Seguido o protocolo descrito por Masuya et al., (2003) com adaptações, uma nova recontagem foi realizada na suspensão de células, selecionadas anteriormente, para que se obtivesse a concentração final de  $1 \times 10^6$  células/ml, necessária para marcação com anticorpos. Para cada animal foram utilizados 2 tubos de polipropileno, sendo um tubo para a amostra de interesse e o outro o controle de isotipo. Para identificação das células-tronco hematopoiéticas foram utilizados 50 µl da suspensão de células e 5 µl de cada anticorpo monoclonal conjugados aos seus respectivos fluorocomas: CD90 (APC), CD133 (PE), SCA1 (FITC) e CD117 (PE-Cy7). Já no outro tubo, foram utilizados 50 µl da suspensão de células e 5 µl de cada anticorpo isotipo, ou seja, um anticorpo de mesma classe da imunoglobulina (Ig) do anticorpo alvo, conjugado com os mesmos fluorocomas mas que não é específico aos sítios antigênicos da amostra em análise. Com isso, é possível evitar a interferência de falsa positividade nos resultados, eliminando a fluorescência inespecífica e

permitindo a padronização do método evidenciando somente os eventos reais (ROEDERER, 2004).

Por fim, os dois tubos foram acomodados na geladeira por 20 minutos na ausência de luz para evitar a perda da fluorescência dos fluorocromos. Decorrido este tempo, as células foram lavadas com 2 ml de PBS para remover o excesso de anticorpo e centrifugadas a 1400 rpm por 7 minutos. Os dados foram adquiridos pelo citômetro de fluxo (FACS CANTO II) e a análise realizada com o auxílio dos *softwares* FACSDiva e Denovo. A marcação foi feita de forma pareada com os controles de isotipo e um total de 10.000 eventos foi verificado pelo aparelho.

#### *4.6 Medidas do ânion superóxido*

Para avaliação do estresse oxidativo em células-tronco hematopoiéticas, foi analisado os níveis da EROS  $\cdot\text{O}_2^-$ , através da citometria de fluxo. Este método consiste na utilização do dihidroetítideo (DHE), que por ser permeável à membrana celular, reage com o  $\cdot\text{O}_2^-$  intracelular e rapidamente é oxidado formando o etídio que se liga ao DNA resultando na amplificação do sinal da fluorescência vermelha (CAMPAGNARO et al., 2013).

Para estimar a presença de  $\cdot\text{O}_2^-$  nas células foi seguido o protocolo utilizado por Campagnaro e colaboradores (2013), onde adicionou-se 20  $\mu\text{l}$  de DHE (160  $\mu\text{M}$ ) em uma suspensão de células hematopoiéticas na concentração de  $1 \times 10^6/\text{ml}$ , descongeladas previamente e ressuspensas em 1ml de PBS. Essa suspensão foi incubada a 37°C por 30 minutos no escuro. Foi realizado previamente também, um controle positivo, onde as amostras foram incubadas com 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 5 minutos para aumentar o estresse oxidativo, enquanto que para o controle negativo, as células foram incubadas em etanol. Após os tempos estimados, as células foram lavadas, ressuspensas em PBS, mantidas em gelo e protegidas da luz até a aquisição dos dados no citômetro de fluxo. A análise dos dados foi realizada com auxílio dos *softwares* FACSDiva e Denovo, pela determinação da mediana da intensidade de fluorescência (MFI) de 10.000 células. As células foram excitadas a 488 nm e a fluorescência detectada utilizando filtro 585/42.

#### 4.7 Ensaio cometa alcalino

Foi utilizado neste estudo o método ensaio cometa alcalino ou "eletroforese em gel de célula única" para avaliar a fragmentação da molécula de DNA, baseado no trabalho original de Singh et al., (1988), com adaptações de Campagnaro et al., (2013).

O ensaio cometa envolve inúmeras etapas que incluem preparação de lâminas de microscópio embebidas em agarose, lise das membranas celulares para que haja liberação do DNA, desenovelamento da fita de DNA, eletroforese, neutralização, marcação do DNA e análise.

Todos os reagentes utilizados foram preparados a fresco e o método foi realizado em ambiente com baixa luminosidade e temperatura controlada para evitar danos ao DNA das células e evitar que o sistema reparo se inicie.

##### 4.7.1 Preparo das lâminas

Foram utilizadas duas lâminas para cada animal. Trata-se de lâminas de vidro com extremidade fosca preparadas overnight, embebidos com uma camada de gel de agarose de ponto de fusão normal (*Normal Melting Point Agarose* – NMP; GIBCO) dissolvida na concentração de 1,5% em PBS a 65°C. Após a aplicação desta primeira camada, as lâminas ficaram em temperatura ambiente e mantidas em posição horizontal, durante a noite. A primeira camada é o suporte para que ocorra a ótima adesão da segunda camada que é a mistura da agarose de baixo ponto de fusão (*Low Melting Point Agarose* – LMP; GIBCO) com as células a serem analisadas.

Após a secagem total das lâminas com a primeira camada, foram colocadas sobre elas uma mistura 40 µl da solução de células com 100 µl de agarose LMP preparada na concentração de 0,5%, dissolvida em PBS e mantida em banho maria a 37 °C. Por fim, as lamínulas foram colocadas cuidadosamente sobre as lâminas e transferidas para geladeira a 4°C por 20 minutos para polimerização da agarose.

##### 4.7.2 Lise e desenovelamento

Após solidificação da agarose, as lamínulas foram retiradas cuidadosamente e as lâminas mergulhadas em uma cuba contendo solução de lise gelada (para evitar o descolamento do gel de agarose das lâminas) e deixadas por 1

hora na geladeira a 4°C, para rompimento das membranas celulares e exposição do DNA. Esta solução de lise foi preparada anteriormente contendo, 2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10 mM Tris, 34 mM N-lauroylsarcosine de sódio, 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO em um pH 10, esses dois últimos acrescentados no momento do uso.

Com o final do tempo de 1 hora da solução de lise, as lâminas foram retiradas da geladeira e lavadas com água destilada gelada por 3 vezes e mergulhadas em uma cuba com PBS gelado para total remoção da solução.

Por fim, as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese (Bio-Rad Laboratories Headquarters) horizontal contendo solução tampão de eletroforese (1mM EDTA e 300mM de hidróxido de sódio em um pH > 13) preparada anteriormente. Foram colocadas pareadas uma com a outra em direção ao anodo (polo vermelho) e mantidas nesta cuba por 40 minutos, em ambiente escuro, com o objetivo de descondensar a molécula de DNA antes de ser submetida a corrida do ensaio cometa.

#### *4.7.3 Eletroforese*

Após o tempo determinado, com as lâminas já dispostas na posição para a corrida, a cuba foi ligada e a eletroforese transcorreu a 20V e 300mA, por um período de 30 minutos sob temperatura de 4°C e baixa luminosidade. O campo elétrico faz com que o DNA danificado carregado negativamente migre para o anodo, resultando em uma imagem que parece um cometa com uma cabeça e uma cauda. Quanto mais rupturas dos filamentos que estão presentes no DNA, maior a cauda do cometa.

#### *4.7.4 Neutralização e secagem*

Transcorridos os 30 minutos da eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e lavadas 3 vezes por 5 minutos com solução de neutralização gelada (Tris-base pH 7,5), preparada anteriormente. Em seguida, foram cobertas com etanol P.A por 5 minutos para fixação e deixadas secar a temperatura ambiente overnight.

#### *4.7.5 Coloração e análise*

Esta etapa de coloração foi realizada em ambiente escuro onde 50 µl da solução de brometo de etídio, na concentração de 20 µg/ml, foram colocados sobre as lâminas, cobertas com uma lamínula e imediatamente analisadas em microscópio óptico de fluorescência (Nikon Eclipse Ti) equipado com filtro 585 nm em aumento de

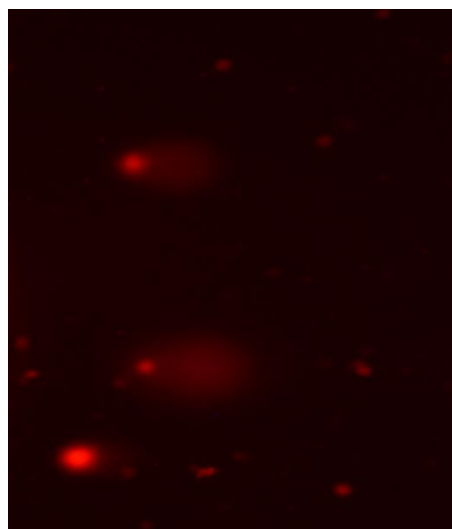
20X. As imagens foram obtidas pela câmera digital de 12.7 megapixels (Ds-Ri1; Nikon).

Foi estabelecido um número mínimo de 25 células em cada lâmina, sendo 2 lâminas por animal, totalizando 50 células. A contagem das células foi feita de maneira aleatória e qualitativa analisando o tamanho da cauda do cometa.

Os cometas obtidos foram analisados através de sistema de imagem de domínio público Casplab, disponível em [www.casp.of.pl](http://www.casp.of.pl). Dentre os diversos parâmetros fornecidos pelo programa, utilizou-se a porcentagem de DNA na cauda (*Tail DNA %*) e o momento da cauda (*Tail Moment*) para a análise de danos no DNA (Figura 5).

O *Tail Moment* é o parâmetro mais utilizado, pois quantifica a extensão do dano ao DNA e é calculado pelo produto do comprimento da cauda e da porcentagem de DNA na cauda. Já o parâmetro *Tail DNA %*, representa a extensão das rupturas das fitas de DNA e é considerado extremamente confiável por apresentar alta correlação com dados obtidos de análises visuais (KUMARAVEL et al., 2009; COLLINS, 2014).

COMETAS	L HEAD	L TAIL	L COMET	TAIL DNA	TM
1	61	80	141	43.9374	35.1499
2	27	5	32	2.73751	0.136875
3	37	13	50	18.0919	2.35195
4	43	13	56	6.34982	0.825476
5	53	4	57	1.76452	0.0705809
6	53	4	57	7.96343	0.318537
7	37	3	40	0.0222095	0.000666284
8	55	8	63	2.79448	0.223559
9	49	13	62	6.1307	0.79699
10	45	7	52	10.6566	0.74596
11	55	6	61	3.00957	0.180574
12	45	9	54	8.03273	0.722945
13	55	4	59	2.49785	0.0999141
14	43	6	49	5.52079	0.331247
15	51	7	58	4.3644	0.305508
16	53	6	59	1.26536	0.0759214
17	57	7	64	1.98816	0.139171
18	61	7	68	6.33714	0.4436
19	51	5	56	2.3038	0.11519
20	51	7	58	9.99018	0.699313
21	49	11	60	15.0086	1.65095
22	47	12	59	21.0721	2.52865
23	53	8	61	9.97322	0.797857
24	41	3	44	0.0101097	0.000303291
25	55	11	66	14.9379	1.64316



**Figura 5.** Resultados avaliando diversos parâmetros dos cometas fornecidos pelo programa Casp. Destaque para os parâmetros: porcentagem de DNA na cauda (*Tail DNA*) e momento da cauda (*TM*), utilizados neste estudo (esquerda). Imagem do programa Casp mostrando três cometas que foram analisados (direita).

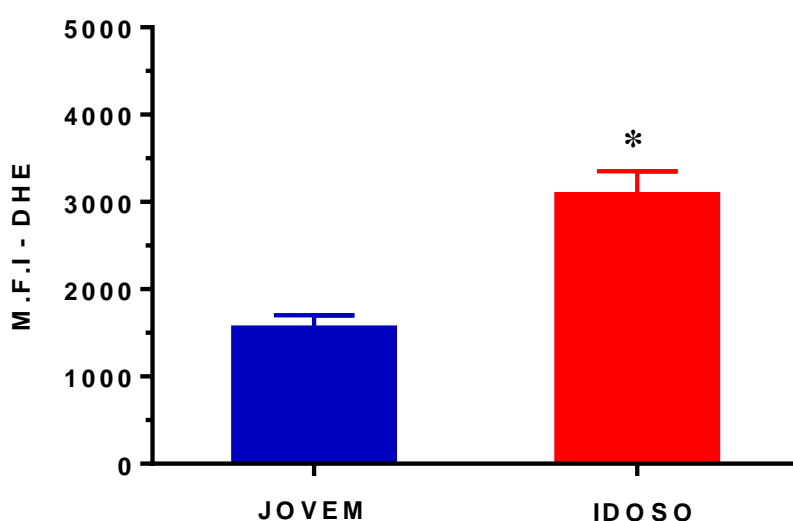
#### *4.8 Análise estatística*

Os resultados obtidos, foram expressos como média $\pm$ EPM. Os dados foram previamente analisados por meio do Teste *t* de Student para amostras independentes, utilizando o software GraphPad Prism 6.0. As diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Determinação dos níveis de $\cdot\text{O}_2^-$

Através dos resultados obtidos, utilizando-se células-tronco hematopoiéticas de camundongos da linhagem C57 com 2 meses de idade (jovens) e 24 meses de idade (idosos), foi possível observar diferença entre os grupos. A presença  $\cdot\text{O}_2^-$  foi indicada pela oxidação do DHE, avaliado por citometria de fluxo (Figura 6).



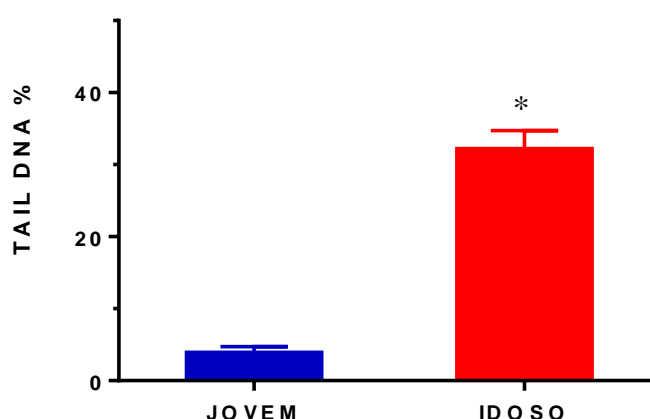
**Figura 6.** Determinação da mediana da intensidade de fluorescência (MFI) decorrente da oxidação do DHE pelo  $\cdot\text{O}_2^-$ . (\*) indica diferença significativa entre os grupos. Nota: Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs. Jovens (Teste t de Student).

Os animais do grupo idoso apresentaram maior produção citoplasmática de  $\cdot\text{O}_2^-$  quando comparado aos animais do grupo jovem (Jovem:  $1561 \pm 138$  vs. Idoso:  $3089 \pm 263$ , MFI), como pode ser observado na Figura 6.

O DHE é um corante azul fluorescente permeável à membrana das células que se acumula no citoplasma onde é oxidado pelo  $\cdot\text{O}_2^-$  resultando em fluorescência nuclear vermelha. A quantidade de  $\cdot\text{O}_2^-$  é então representada pela mediana da intensidade de fluorescência (MFI) através da ação do DHE (CAMPAGNARO et al., 2013).

## 5.2 Avaliação dos níveis de fragmentação do DNA pelo ensaio cometa

A incidência dos danos no DNA de células-tronco hematopoiéticas foi avaliada através do ensaio cometa utilizando-se dois parâmetros. O parâmetro *Tail DNA %* (Figura 7) que representa o número de fragmentos de DNA que migraram durante a eletroforese indicando a extensão das rupturas das fitas de DNA (KUMARAVEL et al., 2009).

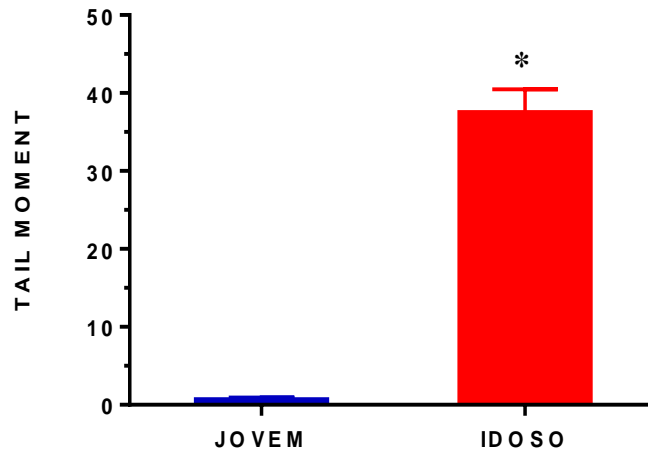


**Figura 7.** Parâmetro Tail Dna %, que indica danos no DNA das células. (\*) indica diferença significativa entre os grupos. Nota: Valores expressos como média±EPM. \*  $p < 0,05$  vs. Jovens (Teste t de Student).

Os animais do grupo idoso apresentaram níveis maiores de *Tail DNA %* quando comparado aos animais do grupo jovem (Jovem:  $3.9 \pm 0.8\%$  vs. Idoso:  $32.2 \pm 2.5\%$ , *Tail DNA %*). Esses resultados indicam maior predominância dos níveis de genotoxicidade no grupo idoso, como é possível observar na Figura 7.

O outro parâmetro utilizado, *Tail Moment* (Figura 8), quantifica a extensão do dano ao DNA e é calculado pelo produto do comprimento da cauda e da porcentagem de DNA na cauda. Avalia tanto a migração do material genético quanto a quantidade relativa de DNA na cauda, relacionando a fragmentação de DNA na cauda com a intensidade da fluorescência (KUMARAVEL et al., 2009; COLLINS, 2014).



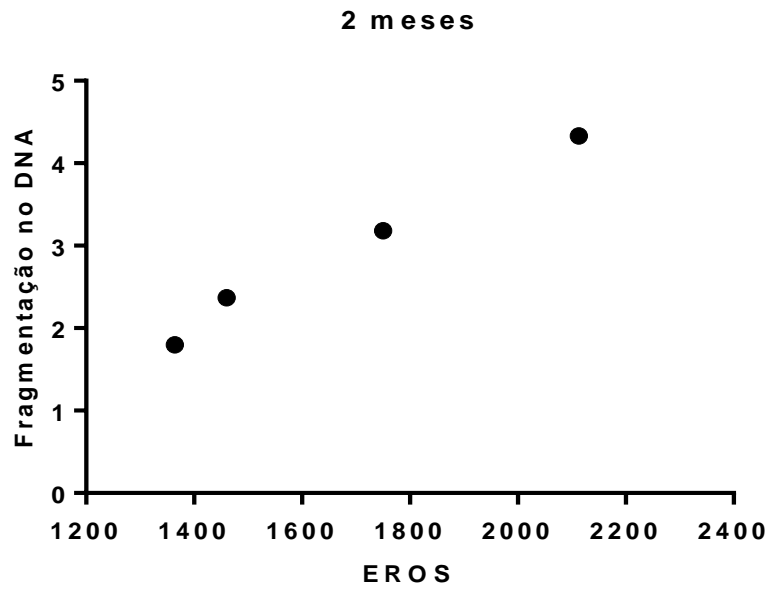


**Figura 8.** Parâmetro Tail Moment, indica danos no DNA das células. (\*) indica diferença significativa entre os grupos. Nota: Valores expressos como média±EPM. \*  $p < 0,05$  vs. Jovens (Teste t de Student).

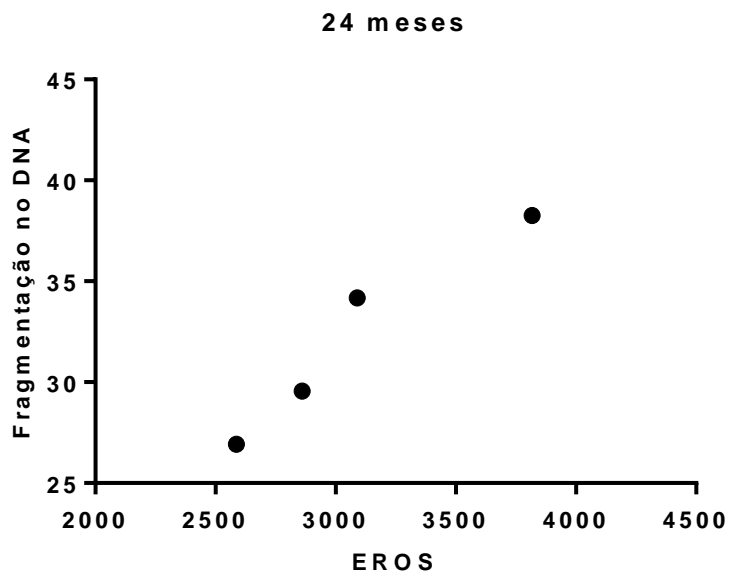
Através do parâmetro *Tail Moment*, foi possível observar que os animais do grupo idoso apresentaram maiores índices de danos no DNA quando comparado aos animais do grupo jovem (Jovem:  $0.7 \pm 0.2$  vs. Idoso:  $37.5 \pm 2.8$ , *Tail moment*), como observado na Figura 8. A partir desses resultados também foi possível avaliar a predominância dos níveis de genotoxicidade no grupo idoso.

### 5.3 Correlação dos níveis de EROS e fragmentação do DNA

Para confirmar a interdependência entre os parâmetros avaliados neste estudo, foi feita a análise de Pearson que atestou a existência de forte correlação positiva entre a produção de EROS e fragmentação do DNA, determinada pelo *Tail Moment*. As figuras 9 e 10 apresentam os resultados obtidos para os grupos jovem ( $r=0,99$ ) e idoso ( $r=0,96$ ), respectivamente.



**Figura 9.** Correlação entre quantidade de EROS e fragmentação no DNA nos camundongos de 2 meses de idade,  $r=0,99$ .



**Figura 10.** Correlação entre EROS e fragmentação no DNA nos camundongos de 24 meses de idade,  $r=0,96$ .

## 6 DISCUSSÃO

A utilização de células-tronco adultas em terapias vem sendo amplamente discutida nos últimos anos devido suas características de auto-renovação e diferenciação em vários tipos celulares (HERZOG et al., 2003) podendo regenerar tecidos danificados (pele, fígado, sangue, músculo, etc) durante processos patológicos (BOYLE et al., 2007; ROSSI et al., 2008). Contudo, as funções das células-tronco podem ser comprometidas pelo envelhecimento celular (BOYLE et al., 2007; ROSSI et al., 2008; RÜBE et al., 2011). Sendo assim, com o aumento progressivo da expectativa de vida, estudos vem sendo realizados com o intuito de avaliar os efeitos do envelhecimento em diferentes células, inclusive nas células-tronco, a fim de se estabelecer métodos com a finalidade de diminuir ou reverter os danos deste processo permitindo a utilização dessas células na prevenção e tratamento de doenças crônicas e degenerativas em idosos (SILVA, FERRARI, 2011; LIU, RANDO, 2011).

O processo de envelhecimento ainda não está totalmente compreendido, mas, já foram descritos o envolvimento de fatores genéticos (ERSHLER et al., 2006) e o acúmulo de fatores intrínsecos e extrínsecos ao longo da vida (RÜBE et al., 2011), como os responsáveis por desencadear o envelhecimento precoce contribuindo para ocorrência de doenças crônicas, diminuição da função celular e a fragmentação de macromoléculas, inclusive o DNA (ABDELMAGID et al., 2015). Dentre os fatores intrínsecos mais relevantes está o acúmulo de EROS, que possui uma correlação importante com envelhecimento (HARMAN, 1956).

A avaliação sobre a produção de EROS em células de tecidos neurais (JIANG et al., 2007), vasculares (MEYRELLES et al., 2011), hepáticos (FOLKMANN et al., 2007) cerebral e renal (GEORGE et al., 2011) e em células mononucleares (GEORGE et al., 2011; TONINI et al., 2013), pode facilmente ser obtida na literatura atual. No entanto, a correlação entre o aumento de EROS observado durante o envelhecimento, e seus genotóxicos sobre células-tronco hematopoiéticas da medula óssea, precisa ser melhor compreendida.

Portanto, devido a importantes características fisiológicas das células-tronco hematopoiéticas (GOLUB, CUMANO, 2013; MOSAAD, 2014) existe um grande interesse no estudo dessas células pela medicina regenerativa. No entanto, em situações em que há comprometimento de suas funções, como no envelhecimento,

pode ocorrer redução da sua capacidade regenerativa (ERGEN, GOODELL, 2010), prejudicando seu uso em terapias, uma vez que o transplante autólogo é a principal forma utilizada.

Neste estudo, a avaliação da produção  $\cdot\text{O}_2^-$  foi realizada por citometria de fluxo e mensurada pela amplificação da fluorescência do DHE. Os resultados demonstraram uma quantidade excessiva de  $\cdot\text{O}_2^-$ , representada pela MFI, nos camundongos do grupo idoso em relação ao jovem.

Comparando os dados obtidos com os de Tonini e colaboradores (2013) observa-se uma similaridade dos resultados, sugerindo que o envelhecimento aumenta a produção de EROS e desencadeia o estresse oxidativo. Os autores utilizaram células mononucleares da medula óssea de camundongos C57 jovens (2 meses) e idosos (18 meses) para avaliação dos níveis de  $\cdot\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  e os resultados mostraram maiores níveis dessas EROS nos camundongos idosos quando comparados ao seu grupo jovem.

Já no trabalho de George e colaboradores (2011) o objetivo foi avaliar o nível de estresse oxidativo e ação de enzimas antioxidantes em tecidos do cérebro e rim de camundongos controle e camundongos *knockout* para o gene IMMP2L, ambos com 30 meses de idade. Os camundongos IMMP2L apresentam mutações no gene localizado na membrana interna mitocondrial estimulando a produção de  $\cdot\text{O}_2^-$  pela organela (LU et al., 2008). Com isso, observou-se, um aumento do estresse oxidativo nos tecidos avaliados (cérebro e rim) dos camundongos IMMP2L pela expressão da 4-hidroxinonenal (HNE), um produto de modificação oxidativa de proteínas. Nestes animais também foi verificado o início precoce de doenças associadas ao envelhecimento (sarcopenia, perda de gordura subcutânea, cifose e ataxia) em relação ao seu grupo controle (GEORGE et al., 2011).

Outro dado relevante desse estudo foi a avaliação da expressão de enzimas antioxidantes. Segundo George et al., (2011) o aumento do estresse oxidativo durante o envelhecimento é causado principalmente pela produção aumentada de EROS e não pela diminuição da atividade de enzimas antioxidantes. Por isso, a expressão das enzimas superóxido dismutase 1 e 2 (SOD1 e SOD2) foi avaliada e constatou-se níveis elevados de ambas, no rim e cérebro, principalmente nos camundongos IMMP2L. Esses dados corroboram a descrição de Tonini et al., (2013) onde justificam que os efeitos do estresse oxidativo ocorrem devido ao desequilíbrio entre a produção excessiva de EROS e a capacidade antioxidante das

células nos camundongos idosos. George et al., (2011) avaliaram também os níveis de EROS em células mononucleares da medula óssea de camundongos IMMP2L e os resultados indicam que a produção elevada de EROS mitocondrial acelera o envelhecimento através do comprometimento da função de auto-renovação destas células, afetando a homeostase tecidual. Entretanto, as vias moleculares que levam à diminuição da capacidade de auto-renovação e diferenciação das células-tronco ainda não estão totalmente definidas e mais estudos nesta área são necessários para total compreensão desse processo (WANG et al., 2012; BEERMAN et al., 2013).

Contudo, analisando os dados de George et al., (2011) e os de Tonini et al., (2013) e comparando com os resultados obtidos neste estudo, é possível sugerir que o processo de envelhecimento por si só estimula a produção exagerada de EROS, o que pode levar a alterações na funcionalidade das células-tronco. Este fato pode ser explicado pelo declínio da função mitocondrial e, como consequência, menor fornecimento de ATP para células e uma produção exagerada de EROS, principalmente do  $\cdot O_2^-$  (SINGH et al., 1988) em processos patológicos e no envelhecimento. Uma vez que, a produção fisiológica de EROS acontece principalmente pelas mitocôndrias que também é responsável pela geração de ATP (HARMAN, 1956). Outro aspecto relevante é em relação às substâncias antioxidantes que se tornam insuficientes quando há produção elevada de EROS, o que pode justificar também maiores níveis de estresse oxidativo nos animais idosos, enquanto os animais jovens e saudáveis são capazes de manter um equilíbrio entre produção de EROS e o sistema antioxidante (TONINI et al., 2013).

Níveis elevados de EROS têm sido considerados responsáveis por dano a diferentes macromoléculas biológicas e, conseqüentemente, ao comprometimento da manutenção da homeostase (NODA et al., 2009; YAHATA et al., 2011). O acúmulo de EROS lesa primeiramente o DNA mitocondrial (mtDNA), ocasionando codificação inadequada de proteínas e em seguida pode ocasionar danos também no DNA nuclear das células (CUI et al., 2011). Segundo Yahata et al., (2011), o acúmulo de danos no DNA de células da medula óssea podem refletir ambos os estímulos: indução de dano contínuo e deficiências do mecanismo de reparo.

Portanto, o alto nível de EROS é um agente genotóxico devido a sua capacidade de causar danos, podendo alterar informações codificadas no DNA. A genotoxicidade ocorre quando a célula é exposta a um agente genotóxico, o que pode

levar a alterações na estrutura ou no conteúdo de cromossomos ou na sequência de pares de bases do DNA (McGREGOR et al., 2000).

O DNA é responsável por importantes funções no organismo e a presença de danos em suas bases nitrogenadas e rupturas das fitas (HOEIJMAKERS, 2009) provocam mudanças na expressão gênica desencadeando processos mutagênicos e tumorais (XIE et al., 2014) e a patogenia de doenças crônicas (LIU et al., 2014). Os danos oxidativos ao DNA contribuem também para o envelhecimento, e o aumento da produção de EROS além da presença do derivado de oxidação 8-oxoguanine (8-oxo-G), são frequentemente encontrados em tecidos em processo de envelhecimento (CUI et al., 2011).

Neste estudo, a avaliação de danos no DNA em células-tronco hematopoiéticas de camundongos jovens e idosos foi realizada pelo ensaio cometa. Este método é capaz de detectar danos em células individuais estimulando a migração do DNA fragmentado para fora do núcleo em direção ao anodo, sob eletroforese alcalina. Com isso, o cometa formado apresenta na sua cabeça DNA intacto e a cauda é constituída por DNA fragmentado (COLLINS 2014).

Analisando os resultados obtidos observa-se uma quantidade significativamente maior de danos no DNA, representados pelos parâmetros *Tail DNA %* e *Tail moment*, nos camundongos do grupo idoso em comparação ao grupo jovem. Portanto, através da análise de genotoxicidade, é possível verificar que as EROS interagem com o DNA aumentando sua fragmentação durante o envelhecimento.

Esses dados corroboram os resultados de Tonini et al., (2013), que também avaliaram a fragmentação de DNA em células mononucleares da medula óssea de camundongos C57 jovens e idosos pelo ensaio cometa de forma qualitativa. A partir da quantificação da intensidade do cometa na cauda e o comprimento da migração de DNA, os níveis de fragmentação foram mensurados e os resultados mostraram maior quantidade de células com níveis elevados de danos no DNA em camundongos idosos. Já, Dalboni e colaboradores (2012) não observaram diferença na fragmentação do DNA de células sanguíneas isoladas de animais jovens (1 mês) e idosos (18 meses).

As células-tronco hematopoiéticas da medula óssea, ao sofrerem danos pelo aumento da produção de EROS mitocondrial, estão susceptíveis à oxidação de biomoléculas, apoptose e lesão de tecidos, prejudicando também o seu funcionamento normal (RÜBE et al., 2011). Além disso, danos no DNA e mudanças

na expressão gênica se acumulam especificamente em células-tronco hematopoiéticas quiescentes. Sendo assim, células-tronco hematopoiéticas danificadas ao induzir apoptose, impedem a formação de novas células progenitoras (WANG et al., 2014), o que pode justificar os resultados obtidos por Dalboni et al., (2012).

Folkmann e colaboradores (2007) avaliaram níveis de fragmentação de DNA em células do fígado, aorta e pulmão de camundongos idosos, e encontraram maior fragmentação de DNA somente no fígado. Segundo Andreassi (2003) a ação dos radicais livres é tecido-específica, ou seja, varia conforme o tecido analisado.

A relação dos níveis de EROS com o envelhecimento vem despertando o interesse de pesquisas no campo da medicina para que a terapia com células-tronco se torne uma alternativa no tratamento ou prevenção de doenças crônicas (SILVA, FERRARI, 2011). Ergen e Goodell (2010) relatam que apesar das características promissoras das células-tronco, seu uso em terapia pode estar comprometido, pois também estão sujeitas aos efeitos do envelhecimento e que mais estudos são necessários afim de permitir que as propriedades regenerativas das células-tronco sejam melhoradas, por meio do controle da produção de EROS e detecção de danos e vias de reparo no DNA para manutenção da estabilidade genômica das células.

Os dados obtidos pelo presente trabalho sugerem que a idade pode representar um fator importante a ser considerado nos protocolos que utilizam células-tronco hematopoiéticas em terapias. Estudos posteriores avaliando detalhes moleculares da relação entre células-tronco e envelhecimento poderão contribuir para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos neste processo.

## 7 CONCLUSÃO

Em conclusão, foi observado que os níveis de  $\cdot\text{O}_2^-$  foi significativamente maior nas células-tronco hematopoiéticas da medula óssea de camundongos do grupo idoso quando comparados com os do grupo jovem, através da técnica de citometria de fluxo. Já na análise de genotoxicidade, através do ensaio cometa, o grupo idoso também apresentou maiores danos no DNA.

Os resultados encontrados sugerem que o envelhecimento promove um aumento na produção de EROS que interagem com o DNA provocando a fragmentação e efeitos deletérios às funções celulares. Possivelmente, o maior nível de EROS se deve ao declínio da função mitocondrial e ao desequilíbrio do sistema antioxidante.

Entretanto, mais estudos devem ser realizados para determinação dos mecanismos responsáveis pelo processo de envelhecimento, para que futuramente as células-tronco possam ser utilizadas em terapias autólogas em pacientes idosos.



## 8 REFERÊNCIAS

- ABDELMAGID, S.M.; BARBE, M.F.; SAFADI, F.F. Role of inflammation in the aging bones. **Life Sci.**, v. 123, p. 25-34, 2015.
- AFANAS'EV, I. New nucleophilic mechanisms of ros-dependent epigenetic modifications: comparison of aging and cancer. **Aging Dis.**, v. 5, p. 52-62, 2013.
- ANDREASSI, M.G. Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. **Mutat. Res.**, v. 543, p. 67-86, 2003.
- ANTHONY, B.A.; LINK, D.C. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. **Trends Immunol.**, v. 35, p. 32-37, 2014.
- APPLEGATE, E. Anatomia e Fisiologia. 4º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012, p. 87.
- ATTEMA, J.L.; PRONK, C.J.H.; NORDDAHL, G.L.; NYGREN, J.M.; BRYDER, D. Hematopoietic stem cell ageing is uncoupled from p16<sup>INK4A</sup>-mediated senescence. **Oncogene**, v. 28, p. 2238-2243, 2009.
- BALASUBRAMANIAN, P.; LONGO, V. Aging, nutrient signaling, hematopoietic senescence, and cancer. **Crit. Rev. Oncog.**, v. 18, p. 559-571, 2013.
- BALCOMBE, N.R.; SINCLAIR, A. Ageing: definitions, mechanisms and the magnitude of the problem. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, v. 15, p. 835-849, 2001.
- BEERMAN, I.; BOCK, C.; GARRISON, B.S.; SMITH, Z.D.; GU, H.; MEISSNER, A.; ROSSI, D.J. Proliferation-dependent alterations of the DNA methylation landscape underlie hematopoietic stem cell aging. **Cell Stem Cell**, v. 12, p. 413-425, 2013.
- BERRA, C.M.; MENCK, C.F.M.; MASCIO, P.D. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quim. Nova**, v. 29, p. 1340-1344, 2006.
- BOROJEVIC, R. Terapias celulares e bioengenharia. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 78, p. 42-46, 2008.
- BOYLE, M.; WONG, C.; ROCHA, M.; JONES, D.L. Decline in self-renewal factors contributes to aging of the stem cell niche in the Drosophila testis. **Cell Stem Cell**, v. 1, p. 470-478, 2007.
- BRYDER, D.; ROSSI, D.J.; WEISSMAN, I.L. Hematopoietic stem cell: the paradigmatic tissue-specific stem cell. **Am. J. Pathol.**, v. 169, p. 338-346, 2006.
- BUEHR, M.; MEEK, S.; BLAIR, K.; YANG, J.; URE, J.; SILVA, J.; McLAY, R.; HALL, J.; YING, Q.L.; SMITH, A. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. **Cell**, v. 135, p. 1287-1298, 2008.

CAMPAGNARO, B.P.; TONINI, C.T.; NOGUEIRA, B.V.; CASARINI, D.E.; VASQUEZ, E.C.; MEYRELLES, S.S. DNA damage and augmented oxidative stress in bone marrow mononuclear cells from angiotensin-dependent hypertensive mice. **Int. J. Hypertens.**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

CARLSON, B.M. *Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento*. 5° edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014, p. 410.

CHITTETI, B.R.; CHENG, Y.H.; POTEAT, B.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, S.; GOEBEL, W.S.; CARLESSO, N.; KACENA, M.A.; SROUR, E.F. Impact of interactions of cellular components of the bone marrow microenvironment on hematopoietic stem and progenitor cell function. **Blood**, v. 115, p. 3239-3248, 2010.

CHOTINANTAKUL, K.; LEEANANSAKSIRI, W. Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways. **Bone Marrow Res.**, v. 2012, p. 1-16, 2012.

COLLINS, A.R.; DOBSON, V.L.; DUSINSKÁ, M.; KENNEDY, G.; STETINA, R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutat. Res.**, v. 375, p. 183-193, 1997.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. **Mol. Biotechnol.**, v. 26, p. 249-261, 2004.

COLLINS, A.R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1840, p.794-800, 2014.

CUI, H.; YAHUI, K.; ZHANG, H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. **J. Signal Transduct.**, v. 2012, p. 1-13, 2011.

DALBONI, S.P.; CAMPAGNARO, B.P.; TONINI, C.L.; VASQUEZ, E.C.; MEYRELLES, S.S. The concurrence of hypercholesterolemia and aging promotes DNA damage in apolipoprotein E-deficient mice. **OJBD**, v. 2, p. 51-55, 2012.

DENDULURI, N.; ERSHLER, W.B. Aging biology and cancer. **Semin. Oncol.**, v. 31, p. 137-148, 2004.

DIAS, A.T.; RODRIGUES, B.P.; PORTO, M.L.; GAVA, A.L.; BALARINI, C.M.; FREITAS, F.P.; PALOMINO, Z.; CASARINI, D.E.; CAMPAGNARO, B.P.; PEREIRA, T.M.; MEYRELLES, S.S. VASQUEZ, E.C. Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. **J. Transl. Med.**, v. 12, p. 2-11, 2014.

DIMRI, G.P.; LEET, X.; BASILE, G.; MEILEEN, A.; GLYNIS, S.; ROSKELLEY, C.; MEDRANOS, E.E.; LINSKENS, M.; RUBELJII, I.; PEREIRA-SMITHII, O.; PEACOCKET, M.; CAMPISI, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 9363-9367, 1995.

D. HO, A.; PUNZEL, M. Hematopoietic stem cells: can old cells learn new tricks? **J. Leukc. Biol.**, v. 73, p. 547-555, 2003.

- EBIHARA, Y.; MASUVA, M.; LARUE, A.C.; FLEMING, P.A.; VISCONTI, R.P.; MINAMIGUCHI, H.; DRAKE, C.J.; OGAWA, M. Hematopoietic origins of fibroblasts: II. In vitro studies of fibroblasts, CFU-F, and fibrocytes. **Exp. Hematol.**, v. 34, p. 219-229, 2006.
- ELKHAFIT, N.; EL BAZ, H.; HAMMAM, O.; HASSAN, S.; SALAH, F.; MANSOUR, W.; MANSY, S.; YEHA, H.; ZAKI, A.; MAGDY, R. CD133(+) human umbilical cord blood stem cells enhance angiogenesis in experimental chronic hepatic fibrosis. **APMIS**, v. 119, p. 66-75, 2011.
- ERGEN, A.V.; GOODELL, M.A. Mechanisms of hematopoietic stem cell aging. **Exp. Gerontol.**, v. 45, p. 286-290, 2010.
- ERSHLER, W.B.; ARTZ, A.S.; KELLER, E.T. Issues of aging and geriatric medicine: relevance to cancer treatment and hematopoietic reconstitution. **Biol. Blood Marrow Transplant.**, v. 12, p. 100-106, 2006.
- EWERS, I.; RIZZO, L.V.; KALIL FILHO, J. Imunologia e envelhecimento. **Einstein**, v. 6, S13-S20, 2008.
- FOLKMANN, J.K.; LOFT, S.; MOLLER, P. Oxidatively damaged DNA in aging dyslipidemic apoE<sup>-/-</sup> and wild-type mice. **Mutagenesis**, v. 22, p. 105-110, 2007.
- FREITAS, A.A.; DE MAGALHÃES, J.P. A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing. **Mutat. Res.**, v. 728, p. 12-22, 2011.
- FUCHS, E.; TUMBAR, T.; GUASCH, G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. **Cell**, v. 19, p. 769-778, 2004.
- GAVA, A.A.; ZANONI, J.N. Envelhecimento celular. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, v. 9, p. 41-46, 2005.
- GAZIT, R.; WEISSMAN, I.L.; ROSSI, D.J. Hematopoietic stem cells and the aging hematopoietic system. **Semin. Hematol.**, v. 45, p. 218-224, 2008.
- GEIGER, H.; RUDOLPH, K.L. Aging in the lympho-hematopoietic stem cell compartment. **Trends Immunol.**, v. 30, p. 360-365, 2009.
- GEIGER, H.; DENKINGER, M.; SCHIRMBECK, R. Hematopoietic stem cell aging. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 29, p. 86-92, 2014.
- GEORGE, S.K.; JIAO, Y.; BISHOP, C.E.; LU, B. Mitochondrial peptidase IMMP2L mutation causes early onset of age-associated disorders and impairs adult stem cell self-renewal. **Aging Cell**, v. 10, p. 584-594, 2011.
- GLOTZBACH, J.P.; WONG, V.W.; GURTNER, G.C.; LONGAKER, M.T. Regenerative medicine. **Curr. Probl. Surg.**, v. 48, p. 148-212, 2011.
- GOLUB, R.; CUMANO, A. Embryonic hematopoiesis. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 51, p. 226-231, 2013.

GROEMPING, Y.; RITTINGER, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. **Biochem. J.**, v. 386, p. 401-416, 2005.

HAGEN, T.M. Oxidative stress, redox imbalance, and the aging process. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 5, p. 503–506, 2003.

HALL, P.A.; WATT, F.M. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. **Development**, v. 106, p. 619-633, 1989.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **J. Gerontol.**, v. 11, p. 298-300, 1956.

HARMAN, D. The aging process. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, p. 7124-7128, 1981.

HAYFLICK, L. Biological aging is no longer an unsolved problem. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 1100, p. 1-13, 2007.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Exp. Cell Res.**, v. 25, p. 585-621, 1961.

HERZOG, E.L.; CHAI, L.; KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, v. 102, p. 3483-3493, 2003.

HOEIJMAKERS, J.H.; DNA damage, aging, and cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 361, p. 1475-1485, 2009.

HSU, Y.C.; FUCHS, E. A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 13, p. 103-114, 2012.

INSINGA, A.; CICALESE, A.; PELICCI, P.G. DNA damage response in adult stem cells. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 52, p. 147-151, 2014.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/25072002pidoso.shtml>. Acesso em: 15 de dezembro de 2014.

JIANG, F.; JONES, G.T.; DUSTING, G.J. Failure of antioxidants to protect against angiotensin II-induced aortic rupture in aged apolipoprotein (E)-deficient mice. **Br. J. Pharmacol.**, v. 152, p. 880–890, 2007.

JONES, D.A.; PRIOR, S.L.; BARRY, J.D.; CAPLIN, S.; BAXTER, J.N.; STEPHENS, J.W. Changes in markers of oxidative stress and DNA damage in human visceral adipose tissue from subjects with obesity and type 2 diabetes. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 106, p. 627-633, 2014.

KARBASCHI, M.; COOKE, M.S. Novel method for the high-throughput processing of slides for the comet assay. **Sci. Rep.**, v. 4, p.1-6, 2014.

- KARLSSON, H.L.; BUCCHIANICO, D.S.; COLLINS, A.R.; DUSINSKA, M. Can the comet assay be used reliably to detect nanoparticle-induced genotoxicity? **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 56, p. 82-96, 2015.
- KAWASAKI-OYAMA, R.S.; BRAILE, D.M.; CALDAS, H.C.; LEAL, J.C.F.; GOLONI-BERTOLLO, E.M.; PAVARINO-BERTELLI, E.C.; ABBUD FILHO, M.; SANTOS, I. Cultivo de células mesenquimais do sangue de cordão umbilical com e sem uso do gradiente de densidade Ficoll-Paque. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, v. 23, p. 29-34, 2008.
- KEKARAINEN, T.; MANNELIN, S.; LAINE, J.; JAATINEN, T. Optimization of immunomagnetic separation for cord blood-derived hematopoietic stem cells. **BMC Cell Biol.**, v. 7, p. 30-10, 2006.
- KIEL, M.J.; YILMAZ, O.H.; IWASHITA, T.; YILMAZ, O.H.; TERHORST, C.; MORRISON, S.J. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. **Cell**, v. 121, p. 1109-1121, 2005.
- KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTROM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutat. Res.**, v. 363, p. 89-96, 1996.
- KOPP, H.G.; AVECILLA, S.T.; HOOPER, A.T.; RAFII, S. The Bone Marrow Vascular Niche: Home of HSC Differentiation and Mobilization. **Physiology**, v. 20, p. 349-356, 2005.
- KOWALTOWSKI, A.J.; SOUZA-PINTO, N.C.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 47, p. 333-343, 2009.
- KREGEL, K.C.; ZHANG, H.J. Oxidative stress in aging. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 292, R18-R36, 2007.
- KUMARAVEL, T.S.; VILHAR, B.; FAUX, S.P.; JHA, A.N. Comet assay measurements: a perspective. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 25, p. 53-64, 2009.
- LAJTHA, L.G. Stem cell concepts. **Nouv. Rev. Fr. Hematol.**, v. 21, n. 1, p. 59-65, 1979.
- LIU, L.; RANDO, T.A. Manifestations and mechanisms of stem cell aging. **J. Cell Biol.**, v. 193, p. 257-266, 2011.
- LIU, H.Y.; HUANG, C.F.; LIN, T.C.; TSAI, C.Y.; TINA CHEN, S.Y.; CHEN, W.H.; WEI, H.J.; WANG, M.F.; WILLIAMS, D.F.; DENG, W.P. Delayed animal aging through the recovery of stem cell senescence by platelet rich plasma. **Biomaterials**, v. 35, p. 9767-9776, 2014.

LORENZO, Y.; COSTA, S.; COLLINS, A.R.; AZQUETA, A. The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. **Mutagenesis**, v. 28, p. 427-432, 2013.

LOWELL, D. P.; OMORI, T. Statistical issues in the use of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, p. 171-182, 2008.

LU, B.; POIRIER, C.; GASPAR, T.; GRATZKE, C.; HARRISON, W.; BUSIJA, D.; MATZUK, M.M.; ANDERSSON, K.E.; OVERBEEK, P.A.; BISHOP, C.E. A mutation in the inner mitochondrial membrane peptidase 2-like gene (Immp2l) affects mitochondrial function and impairs fertility in mice. **Biol. Reprod.**, v. 78, p. 601-610, 2008.

McGREGOR, D.; BALLANTYNE, B.; MARS, T.; SYVERSEN, T. Carcinogenicity and genotoxic carcinogens. 2° ed. London: Macmillan Reference, 2000, p. 1099-1117.

MARTINI, F.; TIMMONS, M.; TALLITSCH, R. Anatomia Humana. 6° edição. Porto Alegre: Artmed, 2009, p. 543.

MASUYA, M.; DRAKE, C.J.; FLEMING, P.A.; REILLY, C.M.; ZENG, H.; HILL, W.D.; MARTIN-STUDDARD, A.; HESS, D.C.; OGAWA, M. Hematopoietic origin of glomerular mesangial cells. **Blood**, v. 101, p. 2215-2218, 2003.

MEYRELLES, S.S.; PEOTTA, V.A.; PEREIRA, T.M.; VASQUEZ, E.C. Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. **Lipids Health Dis.**, v. 10, 211, 2011.

MINAMIGUCHI, H.; ISHIKAWA, F.; FLEMING, P.A.; YANG, S.; DRAKE, C.J.; WINGARD, J.R.; OGAWA, M. Transplanted human cord blood cells generate amylase-producing pancreatic acinar cells in engrafted mice. **Pancreas**, v. 36, p. 30-35, 2008.

MOSAAD, Y.M. Hematopoietic stem cells: an overview. **Transfus. Apher. Sci.**, v. 51, p. 68-82, 2014.

MUND, J.A.; ESTES, M.L.; YODERT, M.C.; INGRAM JR, D.A.; CASE, J. Flow Cytometric Identification and Functional Characterization of Immature and Mature Circulating Endothelial Cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 32, p. 1045-1053, 2012.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH - NHI. **Stem cell: Scientific progress and future research directions**, 2001.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH – NHI. **Regenerative Medicine**, 2006.

NAKA, K.; MURAGUCHI, T.; HOSHII, T.; HIRAO, A. Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 10, p. 1883-1894, 2008.

NETTO, R.C.M.; DESSEN, E.M.B. Células-tronco: o que são e o que serão? **Sociedade Brasileira de Genética**. p.12-15, 2006.

NODA, S.; ICHIKAWA, H.; MIYOSHI, H. Hematopoietic stem cell aging is associated with functional decline and delayed cell cycle progression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 383, p. 210-215, 2009.

OSTLING, D.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 123, p. 291-298, 1984.

PARAVICINI, T.M.; TOUYZ, R.M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care**, v. 31, p. S170-S180, 2008.

PASSOS, J.F.; SARETZKI, G.; AHMED, S.; NELSON, G.; RICHTER, T.; PETERS, H.; WAPPLER, I.; BIRKET, M.J.; HAROLD, G.; SCHAEUBLE, K.; BIRCH-MACHIN, M.A.; KIRKWOOD, T.B.; VON ZGLINICKI, T. Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. **Plos Biol.**, v. 5, e110, 2007.

POZZBON, M.; BOLLINI, S.; IOP, L.; DE GASPARI, P.; CHIAVEGATO, A.; ROSSI, C.A.; GIULIANI, S.; FASCETTI, L.F.; ELVASSORE, N.; SARTORE, S.; DE COPPI, P. Human bone marrow-derived CD133(+) cells delivered to a collagen patch on cryoinjured rat heart promote angiogenesis and arteriogenesis. **Cell. Transplant.**, v. 19, p. 1247-1260, 2010.

ROEDERER, M. Conjugation of monoclonal antibodies, 2004. Disponível em: <http://www.drmmr.com/abcon>. Acesso em: 10 maio 2015.

ROSSI, D.J.; JAMIESON, C.H.M.; WEISSMAN, I.L. Stems cells and the pathways to aging and câncer. **Cell**, v. 132, p. 681-696, 2008.

RÜBE, C.E.; FRICKE, A.; WIDMANN, T.A.; FÜRST, T.; MADRY, H.; PFREUNDSCHUH, M.; RÜBE, C. Accumulation of DNA damage in hematopoietic stem and progenitor cells during human aging. **Plos One**, v. 6, e17487, 2011.

SCHWINDT, T.T.; BARNABÉ, G.F.; MELLO, L. Proliferar ou diferenciar? Perspectiva de destino das células tronco. **J. Bras. Neurocirurg.**, v. 16, p. 13-19, 2005.

SEONG, J.M.; KIM, B.C.; PARK, J.H.; KWON, K.; MANTALARIS, A.; HWANG, S. Stem cells in bone tissue engineering. **Biomed. Mater.**, v. 5, p. 062001, 2010.

SERA, Y.; LaRUE, A.C.; MOUSSA, O.; MEHROTRA, M.; DUNCAN, J.D.; WILLIAMS, C.R.; NISHIMOTO, E.; SCHULTE, B.A.; WATSON, P.M.; WATSON, D.K.; OGAWA, M. Hematopoietic stem cell origin of adipocytes. **Exp. Hematol.**, v. 37, p. 1108-1120, 2009.

SILVA, W.J.M.; FERRARI, C.K.B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.**, v. 14, p. 441-451, 2011.

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

SUDO, K.; EMA, H.; MORITA, Y.; NAKAUCHI, H. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. **J. Exp. Med.**, v. 192, p. 1273-1280, 2000.

SWIJNENBURG, R.J.; TANAKA, M.; VOGEL, H.; BAKER, J.; KOFIDIS, T.; GUNAWAN, F.; LEBL, D.R.; CAFFARELLI, A.D.; DE BRUIN, J.L.; FEDOSEYEVA, E.V.; ROBBINS, R.C. Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. **Circulation**, v. 112, p. 1166-1172, 2005.

TEIXEIRA, I.N.D'A.O.; GUARIENTO, M.E. Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v. 15, p. 2845-2857, 2010.

TONINI, C.L.; CAMPAGNARO, B.P.; LOURO, L.P.S.; PEREIRA, T.M.C.; VASQUEZ, E.C.; MEYRELLES, S.S. Effects of aging and hypercholesterolemia on oxidative stress and DNA damage in bone marrow mononuclear cell in apolipoprotein E-deficient mice. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, p. 3325-3342, 2013.

TRIGG, M.E. Hematopoietic Stem Cells. **Pediatrics**, v. 113, p. 1051-1057, 2004.

UTTARA, B.; SINGH, A.V.; ZAMBONI, P.; MAHAJAN, R.T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Curr. Neuropharmacol.**, v. 7, p. 65-74, 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOLI, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, p.44–84, 2007.

VAN ZANT, G.; LIANG, Y. The role of stem cells in aging. **Exp. Hematol.**, v. 31, p. 659-672, 2003.

VIJG, J.; DOLLÉ, M.E.T. Large genome rearrangements as a primary cause of aging. **Mech. Ageing. Dev.**, v. 123, p. 907-915, 2002.

WANG, J.; SUN, Q.; MORITA, Y.; JIANG, H.; GROSS, A.; LECHER, A.; HILDNER, K.; GUACHALLA, L.M.; GOMPF, A.; HARTMANN, D.; SCHAMBACH, A.; WESTEFELD, T.; DAUCH, D.; SCHREZENMEIER, H.; HOFMANN, W.K.; NAKAUCHI, H.; JU, Z.; KESTLER, H.A.; ZENDER, L.; RUDOLPH, K.L. A differentiation checkpoint limits hematopoietic stem cell self-renewal in response to DNA damage. **Cell**, v. 148, p. 1001-1014, 2012.

WANG, J.; LU, X.; SAKK, V. KELIN, C.A.; RUDOLPH, K.L. Senescence and apoptosis block hematopoietic activation of quiescent hematopoietic stem cells with short telomeres. **Blood**, v. 124, p. 3237-3240, 2014.



WINKLER, J.; HESCHELER, J.; SACHINIDIS, A. Embryonic stem cells for basic research and potential clinical applications in cardiology. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1740, p. 240-248, 2005.

XIE, M.; LU, C.; WANG, J.; McLELLAN, M.D.; JOHNSON, K.J.; WENDL, M.C.; McMICHAEL, J.F.; SCHMIDT, H.K.; YELLAPANTULA, V.; MILLER, C.A.; OZENBERGER, B.A.; WELCH, J.S.; LINK, D.C.; WALTER, M.J.; MARDIS, E.R.; DIPERSIO, J.F.; CHEN, F.; WILSON, R.K.; LEY, T.J.; DING, L. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. **Nature**, v. 20, p. 1472-1478, 2014.

YAHATA, T.; TAKANASHI, T.; MUGURUMA, Y.; IBRAHIM, A.A.; MATSUZAWA, H.; UNO, T.; SHENG, Y.; ONIZUKA, M.; ITO, M.; KATO, S.; ANDO, K. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 118, p. 2941-2950, 2011.

YENDLE, J.E.; TINWELL, H.; ELLIOTT, B.M.; ASHBY, J. The genetic toxicity of time: Importance of DNA-unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assays. **Mutat. Res.**, v. 375, p. 125-136, 1997.