

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

**Efeito de peptídeos angiotensina sobre a sinalização
intracelular de células-tronco mesenquimais de medula
óssea de ratos Wistar**

Jousie Michel Pereira

Belo Horizonte - Minas Gerais

2011

Jousie Michel Pereira

Efeito de peptídeos angiotensina sobre a sinalização intracelular de células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos Wistar.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas/ Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre, área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos

Co-orientadora: Prof. Dra. Lucíola da Silva Barcelos

Belo Horizonte – Minas Gerais

2011

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Hipertensão** com a colaboração do **Laboratório de Angiogênese**, ambos do Departamento de Biofísica e Fisiologia (ICB/UFMG) e integrantes do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica (INCT NANO-BIOFAR).

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, À quem recorri inúmeras vezes durante todo o tempo que levei para desenvolver este trabalho.

Aos meu pais, Antônio e Rogéria, pelo amor que me dedicaram, e o apoio emocional e financeiro com que me supriram por toda vida e que foi essencial para a conclusão desta tese.

Ao Marcelo, pelo amor e companheirismo sempre presentes, bem como pela compreensão por minhas ausências.

Ao meu orientador Robson Santos e minha co-orientadora Lucíola Barcelos, pela oportunidade de desenvolver este trabalho bem como por compartilharem suas experiências e conhecimentos comigo.

À todos os colegas de laboratório, em especial aos amigos Antonela, Marilene, Gislaine, Fulvia, Rita, Luiza Michelle, Maria da Gloria, Janaína, Mariana Braga, Junio, Augusto Peluso e Adriana Sato, que muito acrescentaram ao meu crescimento acadêmico e pessoal nestes anos de trabalho em conjunto.

À amiga Leonor, que me convenceu a fazer iniciação científica em Fisiologia, me apresentou ao Laboratório de Hipertensão e me ensinou tudo o que conhecia referente à cultura celular e biologia molecular.

Ao técnico Zezé, sempre disposto a me ajudar com o sacrifício dos animais.

À todos os meus familiares e amigos pela motivação e torcida pelo meu sucesso nessa empreitada.

A conclusão de mais esta etapa não seria possível sem o apoio de todos vocês. MUITO OBRIGADO!

Sumário

1 Resumo	7
2 Glossário	9
3 Lista de figuras e tabelas	11
4 Introdução	13
4.1 Sistema Renina-Angiotensina	13
4.1.1 Angiotensina II	14
4.1.2 Enzimas conversoras de angiotensina	16
4.1.3 Angiotensina (1-7)	16
4.1.4 Vias de sinalização envolvidas nas ações do	18
Sistema Renina - Angiotensina	
4.2 Células-tronco Adultas	21
4.2.1 Células-tronco Mesenquimais	22
4.2.2 Sistema Renina-Angiotensina e Células-tronco	23
5 Objetivos	25
5.1 Objetivo geral	25
5.2 Objetivos específicos	25
6 Metodologia	26
6.1 Animais	26
6.2 Isolamento das células-tronco mesenquimais da medula	26
óssea	
6.3 Imunofenotipagem das células-tronco mesenquimais de	28
medula óssea de ratos	
6.4 Protocolo experimental e extração de proteínas.	29
6.5 Western Blot	29
6.6 Retrotranscrição e PCR	30
6.7 Análise Estatística	32
7 Resultados	33
7.1 Caracterização fenotípica das células-tronco	33
mesenquimais da medula óssea de rato	

7.2 Caracterização das células-tronco mesenquimais quanto a presença dos receptores MAS, AT ₁ e AT ₂	35
7.3 A Ang II estimula a ativação da ERK 1/2	37
7.4 A Ang-(1-7) inibe a ativação da ERK1/2 estimulada pela Ang II	38
7.5 A Ang II não altera a expressão da p38 MAPK total	40
7.6 A Ang II estimula a fosforilação da p38 MAPK	41
7.7 A Ang (1-7) não altera a expressão da p38 MAPK total	42
7.8 A Ang (1-7) não altera a fosforilação da p38 MAPK.	43
7.9 O tratamento concomitante com Ang (1-7) e Ang II não altera a expressão da p38 MAPK total ou a fosforilação da p38 MAPK	44
8 Discussão dos resultados	46
9 Conclusões	51
10 Referências Bibliográficas	52

1 Resumo

Objetivo: Os eventos intracelulares estimulados por angiotensina II (Ang II) mediados por MAPKs estão associados com a proliferação, apoptose, diferenciação celular e contração vascular. Estudos recentes sugerem que a angiotensina-(1-7) pode antagonizar diretamente as vias intracelulares estimuladas pela Ang II. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento com peptídeos angiotensina sobre a expressão e fosforilação das MAPKs ERK1 / 2 e p38, respectivamente, em células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratos.

Metodologia: As células-tronco mesenquimais foram isoladas a partir do cultivo da fração de células mononucleares obtidas da medula óssea dos ossos fêmur e tíbia de ratos Wistar. Para confirmação da identidade das células, foram investigadas a presença de marcadores positivos (Colágeno I, Fibronectina e Integrina β 1) e negativos (CD14 e CD45). A presença dos receptores angiotensinérgicos AT₁, AT₂ e MAS, foram investigadas por meio de Western Blot, além de RT-PCR no caso de receptor MAS. Extratos protéicos de culturas de células previamente estimuladas com peptídeos da Ang-(1-7) e Ang II, em diferentes concentrações (10^{-10} - 10^{-6} mol / L) por 12 horas, foram submetidas à técnica de Western Blot com anticorpos primários para as MAPKs ERK 1 / 2, fosfo p38 e p38 total.

Resultados: A presença dos receptores AT₁, AT₂ e MAS em células-tronco mesenquimais da medula óssea foi documentada por Western Blot e o MAS também por RT-PCR. O tratamento com Ang II, na concentração 10^{-10} M, estimulou a fosforilação da p38 MAPK. O tratamento com Ang II, na concentração 10^{-8} M, induziu um aumento da expressão da ERK 1/2 e este efeito foi revertido pelo co-tratamento com Ang (1-7), na concentração de 10^{-7} M.

Conclusão: Estes resultados sugerem que a Ang-(1-7) pode modular negativamente os efeitos de Ang II em células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos Wistar.

1 Abstract

Objective: The intracellular events stimulated by angiotensin II (Ang II) mediated by MAPKs are associated with proliferation, apoptosis, cell differentiation and vascular contraction. Recent studies suggest that angiotensin-(1-7) (Ang (1-7)) can directly antagonize the intracellular pathways stimulated by Ang II. This study aimed to evaluate the effect of treatment with angiotensin peptides in bone marrow mesenchymal stem cells of Wistar rats on the expression and phosphorylation of MAPKs ERK1/2 and p38.

Methodology: The mesenchymal stem cells were isolated from the cultivation of the mononuclear fraction cells obtained from bone marrow of the femur and tibia bones of rats. To confirm the identity of cells, we investigated the presence of positive (collagen I, fibronectin and integrin β 1) and negative (CD14 and CD45) markers. The presence of receptor AT1, AT2 and MAS in bone marrow mesenchymal stem cells was investigated using Western Blot and RT-PCR from MAS. The protein extracts from cell cultures previously stimulated with the peptides Ang-(1-7) and Ang II at different concentrations (10^{-10} - 10^{-6} mol/L) for 12 hours, were subjected to Western Blot technique using primary antibodies for MAPKs ERK 1/2, phospho p38 and total p38.

Results: The presence of AT1, AT2 and MAS in bone marrow mesenchymal cells was documented by Western Blot and RT-PCR from MAS. Treatment with Ang II at concentration of 10^{-10} M stimulated p38 MAPK phosphorylation. Treatment with Ang II at a concentration of 10^{-8} M induced an increase in ERK1/2 expression, and this effect was reversed by co-treatment with Ang (1-7) at a concentration of 10^{-7} M.

Conclusion: These results suggest that Ang(1-7) can negatively modulate Ang II effects in bone marrow mesenchymal stem cells.

2 Glossário

AT1 – Receptor de angiotensina tipo 1

AT2 – Receptor de angiotensina tipo 2

Ang I – Angiotensina I

Ang II – Angiotensina II

Ang (1-7) – Angiotensina (1-7)

BK - Bradicinina

BSA – Albumina de soro bovino

cDNA – DNA complementar

DEPC – Dietil-pirocarbonato

DMEM-F12 - Dulbecco's Modified Eagles Medium Nutrient Mixture F12

ECA - Enzima Conversora de Angiotensina

ECA2 – Enzima Conversora de Angiotensina 2

ERK – Proteína quinase regulada por sinais extracelulares/ Extracellular signal regulated kinases

FBS - Soro fetal bovino

GEF - Fatores trocadores de nucleotídeo

HBSS - Hank's Balanced Salts

JNK - C-jun NH2-terminal quinases

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógenos/ Mitogen-activated protein kinase

MAP2K - Mek MAP quinase quinase

MAP3K - Raf MAP quinase quinase quinase

Mrg- receptor – Receptores de genes relacionados ao MAS

NEP - Endopeptidase neutra

NO – Óxido Nítrico

PEP - Prolilendopeptidase

PCP - Prolilcarboxipeptidase

PKC - Proteína quinase C

PLD – Fosfolipase D

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SRA – Sistema Renina-Angiotensina

3 Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1. Cascata de ativação da MAPK ERK1/2. Figura modificada de Kolch, 2000.

Figura 2. Ossos fêmur e tíbia extraídos de rato Wistar.

Figura 3. Lavagem do canal medular com DMEM F12 para extração da medula óssea.

Figura 4. Anel de células mononucleares formado por centrifugação em gradiente de densidade.

Figura 5. Ensaio de imunocitoquímica para verificação da expressão do marcador CD45 em células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato Wistar.

Figura 6. Ensaio de imunocitoquímica para verificação da expressão do marcador CD14 em células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato Wistar.

Figura 7. Ensaio de imunocitoquímica para verificação da expressão do marcador Fibronectina em células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato Wistar.

Figura 8. Ensaio de imunocitoquímica para verificação da expressão do marcador Colágeno tipo1 em células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato Wistar.

Figura 9. Ensaio de imunocitoquímica para verificação da expressão do marcador Integrina β 1 em células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato Wistar.

Figura 10. Western Blotting para caracterização da expressão do receptor MAS em células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato Wistar.

Figura 11. PCR para caracterização da presença do mRNA do receptor MAS em células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato Wistar.

Figura 12. Western Blotting para caracterização da expressão do receptor AT1 em células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato Wistar.

Figura 13. Western Blotting para caracterização da expressão do receptor AT2 em células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato Wistar.

Figura 14. Efeito da Ang II na ativação da ERK 1/2 em células-tronco mesenquimais.

Figura 15. Efeito da Ang (1-7) na ativação da ERK 1/2 estimulada pela Ang II em células-tronco mesenquimais.

Figura 16. Efeito da Ang (1-7) na ativação da ERK 1/2.

Figura 17. Efeito da Ang II na expressão da p38 MAPK em células-tronco mesenquimais.

Figura 18. Efeito da Ang II na fosforilação da p38 MAPK em células-tronco mesenquimais.

Figura 19. Efeito da Ang (1-7) na expressão da p38 MAPK em células-tronco mesenquimais.

Figura 20. Efeito da Ang (1-7) na fosforilação da p38 MAPK em células-tronco mesenquimais.

Figura 21. Efeito do co-tratamento com Ang (1-7) e Ang II na expressão da p38 MAPK em células-tronco mesenquimais.

Figura 22. Efeito do co-tratamento com Ang (1-7) e Ang II na fosforilação da p38 MAPK em células-tronco mesenquimais.

Tabela 1: Sequência do *primer* específico para o cDNA de receptor MAS de rato.

4 Introdução

4.1 Sistema Renina-Angiotensina

As primeiras descobertas referentes ao sistema renina-angiotensina (SRA) ocorreram há mais de um século e, desde então, muito se avançou na compreensão de sua fisiopatologia. Em 1898, Tiergersted e Bergman verificaram, a partir da injeção de extratos renais em coelhos, que estes continham uma substância pressórica a qual denominaram de renina. Eles sugeriram que o aumento de sua síntese poderia estar associado com aumento da resistência vascular e com desenvolvimento de hipertrofia cardíaca verificada em algumas patologias renais.

Somente 40 anos depois, Goldblatt *et al.* (1934), corroborando estes dados, observaram que era possível induzir hipertensão persistente em cães através da constrição das artérias renais. Em 1940, um potente agente pressor foi isolado do sangue venoso renal do rim isquêmico do cão hipertenso de Goldblatt, por Braún-Menéndez *et al.*, na Argentina. Simultaneamente, Page & Helmer (1940), nos Estados Unidos, fizeram a mesma observação após a infusão de renina em um animal normal e concluíram que a renina não era a substância pressórica de fato, mas sim uma enzima capaz de formar uma substância com ação pressora a partir de um substrato plasmático. O substrato plasmático da renina foi identificado, posteriormente, como sendo o angiotensinogênio (Braún-Menéndez & Page, 1958). A substância pressórica inicialmente denominada de hipertensina pelo grupo argentino e de angiotonina pelo grupo americano, quase dez anos depois, foi renomeada como angiotensina em decisão conjunta por Braún-Menéndez e Page. Em 1954, Skeggs *et al.*, descreveram as duas formas clássicas da angiotensina, Angiotensina I (Ang I) e Angiotensina II (Ang II) e, posteriormente, em 1956 a enzima conversora de angiotensina (ECA). Desde então, a importância da Ang II no controle da homeostase cardiovascular foi comprovada e inúmeros

estudos permitiram a ampliação dos conhecimentos sobre esse complexo sistema.

Atualmente o SRA é considerado um importante regulador das funções renais e cardiovasculares, agindo, principalmente, na homeostase da pressão arterial e balanço eletrolítico.

4.1.1 Angiotensina II

O octapeptídeo Ang II é o principal componente do SRA e sua formação consiste em dois estágios. Inicialmente, ocorre clivagem da alfa-glicoproteína angiotensinogênio, liberada pelo fígado, através da ação da enzima renina, formando o decapeptídeo Ang I.

A renina é uma aspartil protease secretada pelas células justaglomerulares da arteríola aferente glomerular. Sua secreção é alterada principalmente por quatro fatores interdependentes: queda na pressão de perfusão renal, redução nas concentrações de sódio no túbulo distal do néfron, estimulação do nervo simpático renal e retroalimentação negativa por uma ação direta da Ang II nas células justa glomerulares.

A Ang I é biologicamente inativa e, sob a ação da ECA, forma o octapeptídeo Ang II (Atlas, 2007; Lentz *et al.*, 1956). Atualmente, é aceito que Ang II também pode ser formada a partir de vias independentes de renina/ECA, e que Ang I e Ang II podem ser convertidas em peptídeos angiotensinérgicos menores, biologicamente ativos, como a Ang III, Ang IV e Ang-(1-7) (Santos, 2005).

A Ang II medeia seus efeitos atuando diretamente através de dois tipos de receptores: AT₁ e AT₂. Estes são receptores de sete domínios transmembrana acoplado à proteína G que podem ser distinguidos através da inibição com antagonistas específicos. Receptores AT₁ são antagonizados

seletivamente por bimefilmidazoles, enquanto tetra-hidroimidazopiridinas inibem especificamente receptores AT₂. Ang II também pode exercer seus efeitos atuando indiretamente através da liberação de outros fatores e através de *cross-talk* com cascatas de sinalização intracelulares de outros agentes vasoativos, fatores de crescimento e citocinas (Berry, 2001).

Os receptores AT₁, predominantes em adultos, medeiam a maioria das ações clássicas da Ang II nos tecidos dos sistemas cardiovascular e neuro-endócrino, onde se encontram amplamente distribuídos. Dentre as principais ações via AT₁, a Ang II induz vasoconstrição vascular, retenção renal de sódio e água (por ação direta ou via liberação de aldosterona ou vasopressina, respectivamente), supressão da renina, diminuição da sensibilidade do reflexo pressorreceptor, proliferação celular (angiogênese), remodelamento da matriz extracelular, liberação de noradrenalina pelas terminações simpática e adrenal, aumento da atividade simpática no sistema nervoso central, hipertrofia de músculo liso e cardiomiócitos, estimulação de fibrose no miocárdio e vasos sanguíneos e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Keidar *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 1995; Zhong *et al.*, 2005).

O receptor AT₂, por sua vez, é claramente distinto do receptor AT₁ na expressão, mecanismos de sinalização intracelular e peso molecular. Presente durante todo o desenvolvimento do indivíduo, ele parece ter um papel fisiológico importante no adulto, mediando várias ações da Ang II (De Gasparo *et al.*; 2000; Gallinat *et al.*, 2000). É expresso no coração e nos vasos sanguíneos e pode desencadear uma resposta vasodilatadora, influenciando no controle da pressão arterial (Carey & Siragy, 2003). Outros importantes efeitos de sua ativação são: antiproliferativo, inibição do crescimento e diferenciação celular, desenvolvimento dos rins e trato urinário e proteção contra isquemia cardíaca (Batenburg *et al.*, 2004).

Estudos *in vivo* baseando-se na superexpressão ou deleção genética do receptor AT₂ demonstraram, ainda, que este receptor é capaz de inibir várias ações mediadas pelo receptor AT₁ (Hein, 1998). Abdalla *et al.* (2001) demonstraram que o receptor AT₂ pode formar heterodímeros com o receptor

AT₁ independentemente da ligação da Ang II, sugerindo que a interação entre esses dois receptores possa promover uma alteração estrutural em AT₁, impossibilitando a ativação de suas vias de sinalização.

4.1.2 Enzimas Conversoras de Angiotensinas

Duas formas distintas de ECA (dipeptidil – carboxipeptidase I) são expressas em humanos: uma forma somática, que é particularmente abundante na superfície endotelial dos vasos pulmonares e uma forma germinal, que é produzida exclusivamente nos testículos (Fleming *et al.*, 2006). Ambas as formas são expressas na superfície externa da membrana celular.

Todas as enzimas ECA hidrolisam um espectro de peptídeos circulantes, por exemplo, podem inativar os peptídeos vasodilatadores bradicinina (BK) e calidina e clivar Ang I em Ang II.

Em 2000, uma nova carboxipeptidase homóloga a ECA, a ECA 2, foi descrita simultaneamente por Donoghue *et al.* e por Tipnis *et al.* Sua porção do domínio amino-terminal exibe aproximadamente 40% de seqüência idêntica com a ECA (Lambert *et al.*, 2007). A ECA 2 é associada à membrana e secretada nos tecidos cardiovasculares, neural e órgãos reprodutores (Ferrario *et al.*, 2005). Ela é capaz de hidrolisar com alta eficiência catalítica a Ang II, entretanto, outros componentes do SRA como, por exemplo, Ang I, Ang(1-9), Ang(1-7) e Ang(1-5), são pobremente ou não são hidrolisados pela ECA 2.

4.1.3 Angiotensina (1-7)

A Ang-(1-7) é um heptapeptídeo que pode ser formado diretamente da Ang II pela ação da prolilendopeptidase (PEP), de carboxipeptidases como a prolilcarboxipeptidase (PCP) (Santos *et al.*, 2005) ou da ECA 2 (Vickers *et al.*,

2002). O peptídeo pode também ser formado por via independente da ECA, que corresponde à clivagem da ligação Pro⁷-Phe⁸ da Ang I pelas enzimas PEP e endopeptidase neutra (NEP) (Santos *et al.*, 2005). A ECA2 também cliva a Ang I em Ang-(1-9) podendo originar, posteriormente, Ang-(1-7) (Santos *et al.*, 2003).

Recentemente, Santos *et al.* (2003) caracterizaram o receptor MAS acoplado à proteína G como o receptor de Ang-(1-7), que pode estar envolvido em suas ações biológicas. A ligação da Ang-(1-7) ao receptor MAS pode ser bloqueada por um antagonista específico, o A-779, mas não pelos antagonistas dos receptores AT₁ ou AT₂ da Ang II, CV11974 e PD123319, respectivamente (Tallant *et al.*, 1997).

A Ang-(1-7) parece atuar como um peptídeo contra-regulador da Ang II através da oposição aos seus efeitos, especialmente, vasoconstrição e proliferação celular. Enquanto um aumento crônico da Ang II pode induzir muitos efeitos deletérios no coração, Ang-(1-7) parece exercer um papel cardioprotetor, podendo prevenir o remodelamento cardíaco, via redução da hipertrofia e fibrose. Esse peptídeo tem atividade vasodilatadora dependente do endotélio. Pode estimular a produção de óxido nítrico (NO) (Ferrario *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2007) através de uma via dependente de AKT (Sampaio *et al.*, 2007), prostaglandinas ou fator relaxante derivado do endotélio, além de potencializar a ação da BK. Possui, também, efeito antiproliferativo em células de músculo liso vascular e tecido fibrovascular, é antitrombótico e antiarritmogênico e inibe a expressão da ECA (Ferrario *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2007). Além disso, pode atuar como um importante neuromodulador, especialmente em áreas relacionadas com o controle tônico e reflexo da pressão arterial (Santos *et al.*, 2000).

O desequilíbrio na interação entre Ang II e Ang (1-7) parece contribuir para o início e desenvolvimento de diversas patologias. De fato, tem-se acumulado evidências que reforçam a hipótese de que as principais ações do SRA na regulação da pressão arterial sejam dependentes de um balanço entre os efeitos da Ang II e os da Ang (1-7), sugerindo um importante papel para a

Ang (1-7) na manutenção dos níveis pressóricos (Tallant *et al.*, 1997; Ferrario *et al.*, 1997).

4.1.4 Vias de sinalização envolvidas nas ações do Sistema Renina-Angiotensina

Cada vez mais, estudos tem se voltado para a compreensão das vias intracelulares envolvidas nas ações dos peptídeos angiotensina, principalmente, nos mecanismos moleculares advindos da interação da Ang II com o receptor AT₁, uma vez que esta ligação possui maior relevância fisiopatológica.

Inicialmente, foram identificados os mensageiros intracelulares derivados de fosfolipases envolvidos na sinalização do receptor AT₁. Alexander *et al.* (1985), observaram que a ligação da Ang II ao receptor AT₁ induz à rápida hidrólise do fosfatidilinositol-3,4-bifosfato pela PLC, produzindo 1,4,5-inositol trifosfato e culminando na mobilização de cálcio do retículo sarcoplasmático. Este processo medeia o efeito vasoconstritor da Ang II.

A sinalização mediada pela fosfolipase D (PLD), por sua vez, está envolvida na proliferação vascular e hipertrofia, bem como na regulação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzida pela Ang II (Dhalla *et al.*, 1997; Touyz & Schiffrin, 1999). A PLD hidrolisa a fosfatidilcolina gerando colina e ácido fosfatídico. Este é convertido em diacilglicerol, através da fosfolipase, que por sua vez ativa a proteína quinase C. Os metabólitos da PLD também ativam tirosina quinases e modulam os níveis de cálcio intracelular (Touyz & Schiffrin, 1999).

A Ang II induz, ainda, a ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). As MAPKs pertencem à família das quinases de serina/treonina e possuem estrutura bi-lobular, sendo um lóbulo amino-terminal

e um lóbulo-carboxil-terminal, entre os quais repousa o sítio catalítico. Os dois domínios adotam diferentes conformações e orientações estruturais, regulando a exposição do sítio catalítico de acordo com estado ativo ou inativo da enzima. (Huse & Kuriyan, 2002).

A Ang II ativa as três principais subfamílias das MAPKs: Extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), c-jun NH2-terminal quinases (JNK) e p38MAPK (Garrington & Jhonson, 1999). Sabe-se que as MAPKs medeiam mecanismos intracelulares que culminam, principalmente, na ativação de fatores de transcrição, no aumento da expressão gênica e em respostas tróficas. Dessa maneira, estão associadas à proliferação, apoptose, e diferenciação celular (Kolch, 2000). Usualmente, a via de sinalização das MAPK's JNK e p38 medeiam, principalmente, as ações em resposta à lesões e ao estresse, enquanto a ERK 1/2 é ativada pela estimulação de fatores de crescimento e mitogênicos (Keshet & Seger, 2010).

A cascata de ativação das MAPKs melhor caracterizada é a da Ras/Raf/Mek/ERK1/2 que transmite sinais advindos da membrana celular para o núcleo em resposta a fatores de crescimento e estresse celular. Quando um agente estimulante como a Ang II se liga ao seu receptor, este se associa a fatores trocadores de nucleotídeos (GEFs) e, através da troca GDP/GTP, converte a proteína Ras-GTP à sua conformação ativa, favorecendo a interação com proteínas efetoras subseqüentes (Kolch, 2000).

Estudos sugerem que a ERK-1 e a ERK-2 (também conhecidas como p44 e p42 MAPK's) agem como a quinase terminal numa cascata de três quinases. A Raf MAP quinase quinase (MAP3K) fosforila e ativa a Mek MAP quinase quinase (MAP2K), que por sua vez ativa a MAPK ERK 1/2, via fosforilação do sítio Thr-Glu-Tyr encontrado na alça de ativação (Pearson *et al.*, 2001; Kolch, 2000) (Figura 1). Estudos demonstraram que tanto a ERK-1 quanto a ERK-2 são funcionalmente equivalentes (Molkentin, 2004).

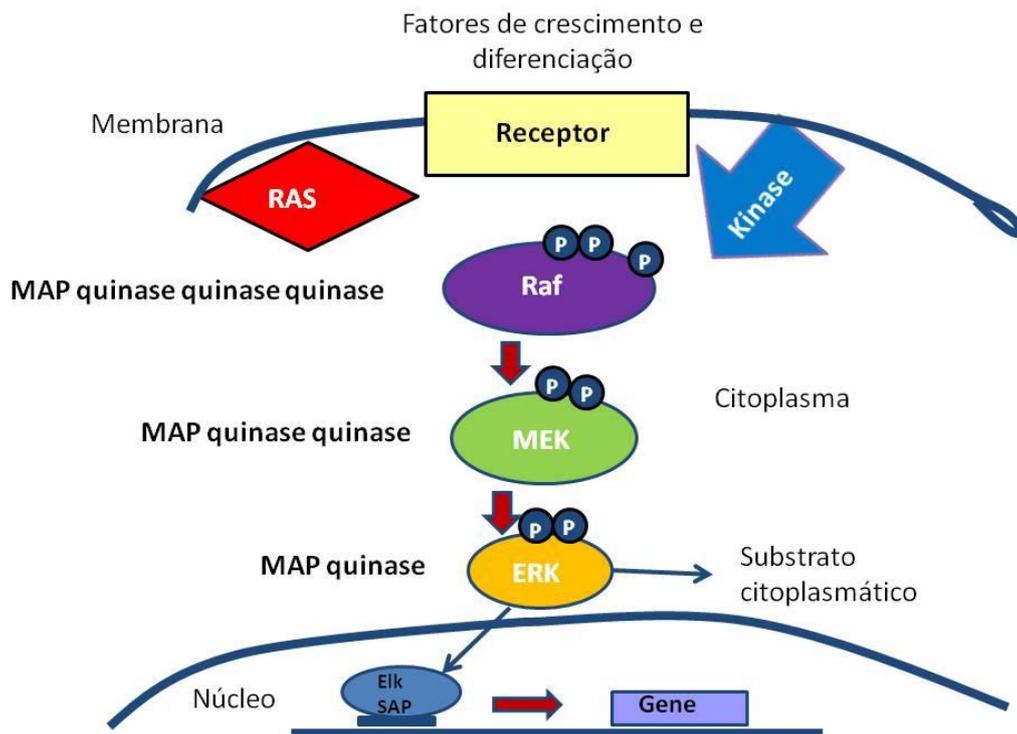


Figura 1: Cascata de ativação da MAPK ERK1/2. Figura modificada de Kolch, 2000.

.A fosforilação da ERK 1/2 desencadeia sua liberação e, eventualmente, sua translocação para o núcleo celular. Uma vez no núcleo, a ERK 1/2 é retida por uma proteína de ancoragem induzida pela própria MAPK (Kolch, 2000) e induz a ativação de fatores de transcrição e proto-oncogenes, assim como proteínas citoplasmáticas relacionadas à progressão do ciclo celular e proliferação (Chen *et al.*, 2000).

Além da cascata da ERK1/2, a Ang II também ativa a p38 MAPK, que parece ter ligação importante com vias de sinalização de oxi-redução ativadas pelo peptídeo (Ushio-Fukai *et al.*, 1998). O aumento dos níveis de Ang II contribui para a disfunção vascular endotelial ao induzir a diminuição da produção de óxido nítrico e o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio. Estes efeitos são inibidos na presença de um inibidor da p38 MAPK (Shatanawi *et al.*, 2010; Bao M. *et al.*, 2007). Em fibroblastos aórticos de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), ocorre a fosforilação da p38 MAPK induzida pela Ang II (Beltrán, *et al.*, 2009). Além disso, a via p38 MAPK também medeia respostas inflamatórias, fibrose e apoptose, associando-se,

portanto, a vários processos patológicos como isquemia, hipertrofia cardíaca, aterosclerose e remodelamento arterial (Schieven, 2005; Clerk & Sugden, 2006).

Por outro lado, alguns trabalhos demonstram que a Ang-(1-7) pode antagonizar diretamente as vias intracelulares estimuladas pela Ang II (Zhu *et al.*, 2002; Zhang, *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2006). Uma vez que as respostas da Ang II são mediadas por inúmeros e complexos sistemas efetores e que vias intracelulares, como a Ras/MAPK/ERK, transmitem o sinal até o núcleo, regulando a expressão gênica e estimulando a proliferação celular (Touyz & Schiffrin, 2000; Kolch, 2000), antagonistas que possam inibir a ativação dessas cascatas intracelulares podem ser considerados uma importante estratégia terapêutica para patologias mediadas pela Ang II.

4.2 Células-tronco adultas

Células-tronco adultas podem ser isoladas de uma diversa quantidade de tecidos. Acredita-se que elas possam agir localmente como uma ferramenta de reparo tecidual, pronta para se mobilizar e diferenciar em resposta a sinais extracelulares ou lesões (Raff, 2003). Dentre suas capacidades, destaca-se a de auto-renovação, transformação em células progenitoras ou diferenciação em células de tecidos especializados.

Acreditava-se que células-tronco adultas diferenciavam-se unicamente em determinadas linhagens celulares, todas relacionadas ao seu tecido de origem. No entanto, a partir de 1998, cada vez mais estudos apontaram para uma maior plasticidade destas, dando um fim a esta crença. Atualmente, sabe-se que elas podem se diferenciar em tipos celulares fora de sua linhagem original em resposta a estímulos do meio extracelular (Ferrari *et al.*, 1998; Wollert *et al.*, 2005).

Na medula óssea coexistem diferentes populações de células-tronco e progenitoras, entre elas as células-tronco hematopoéticas, mesenquimais e progenitoras endoteliais. Teoricamente, todos os tipos podem ser usados para terapia celular, sendo que cada tipo celular possui suas vantagens e limitações no uso em pesquisas clínicas (Wollert *et al.*, 2005).

A plasticidade das células-tronco adultas é menor do que a das células-tronco embrionárias, entretanto, seu uso terapêutico não enfrenta o problema ético que envolve o uso das células-tronco embrionárias, advindas da destruição de embriões humanos (Raff, 2003). Além disso, há uma redução no risco de formação de tumores, fato que ocorre com frequência quando células-tronco embrionárias são transplantadas em camundongos adultos histocompatíveis (Martin, 1980; Smith, 2001). O fato das células poderem ser retiradas do próprio paciente também é benéfico, pois evita que se desenvolva um quadro de rejeição imunológica (Raff, 2003).

4.2.1 Células-tronco Mesenquimais

As células-tronco mesenquimais representam um grupo distinto de população de células-tronco encontrado na medula óssea. Foram identificadas pela primeira vez em 1966, por Friedenstein e Petrakova, num estudo pioneiro em que isolaram células progenitoras da medula óssea de ratos. Atualmente, elas podem ser isoladas da medula facilmente e expandidas *in vitro* sem qualquer aparente modificação no fenótipo ou perda da função pluripotente (Shi *et al.*, 2008).

As células-tronco mesenquimais tem despertado o interesse do meio científico, pois pesquisas evidenciaram sua capacidade de se diferenciarem em células cartilaginosas, musculares, tendíneas, adiposas, além de outras linhagens mesenquimais (Pereira *et al.*, 1995; Prockop *et al.*, 1997; Ferrari *et al.*, 1998; Pittenger *et al.*, 1999). Estudos demonstram ainda seu potencial para

a diferenciação em células de outros tipos teciduais, como o hepático (Pettersen *et al.*, 1999), o renal (Poulson *et al.*, 2003), o cardíaco (Orlic *et al.*, 2001) e o neural (Mezey *et al.*, 2000; Brazelton *et al.*, 2000). Por este fato, o transplante de células-tronco mesenquimais vem emergindo como uma terapia potencial na medicina regenerativa (Shi *et al.*, 2008).

Gussoni *et al.* (1999) demonstraram que, quando injetadas no músculo quadríceps de camundongos *mdx*, as células-tronco mesenquimais de medula óssea passam a expressar distrofina em associação com o sarcolema da fibra muscular, tornando-as uma potencial terapia para a distrofia muscular. Toma *et al.* (2002) observaram que células-tronco mesenquimais expressando β -galactosidase humana, quando injetadas no ventrículo esquerdo de camundongos CB17 SCID/*beige*, se dispersaram pelo miocárdio e passaram a expressar desmina, troponina-T e α -actina, todas indicativas de diferenciação em células de miocárdio maduras.

Um importante obstáculo para o sucesso da terapia com células-tronco, entretanto, é a dificuldade de sobrevivência e diferenciação celular nos tecidos ou órgãos lesados. A redução da apoptose das células-tronco mesenquimais transplantadas é essencial para viabilizar esse tratamento (Shi *et al.*, 2008).

Wang *et al.* (2008) observaram que a idade do animal doador das células influencia na taxa apoptótica após transplante em modelo de lesão isquêmica do miocárdio em ratos Sprague-Dawley. Por outro lado, a atividade parácrina das células transplantadas também é outro fator importante; células-tronco mesenquimais derivadas de animais jovens, por exemplo, melhoraram significativamente a função cardíaca ao induzir angiogênese e diminuir a apoptose de cardiomiócitos quando transplantadas para áreas infartadas.

4.2.2 Sistema Renina-Angiotensina e Células-tronco

As ações de peptídeos vasoativos do SRA sobre as células-tronco da medula óssea tem sido motivo de interesse crescente nos últimos anos. Rodgers *et al.* (2000) demonstraram que a Ang II induz a proliferação de células-tronco progenitoras hematopoéticas, via receptor AT₁. A mesma ação proliferativa foi observada por Imanishi *et al.* (2004) em células progenitoras endoteliais, ação que pode potencializar o remodelamento vascular. Bahlmann *et al.* (2005), no entanto, demonstraram que o tratamento com antagonistas do receptor AT₁ de Ang II aumenta o número de células progenitoras endoteliais em pacientes com diabetes mellitus tipo 2. Estudos demonstram, ainda, que a Ang II estimula a eritropoese, via receptor AT₁, em culturas de células progenitoras de eritróides na presença de eritropoetina (Rodgers *et al.*, 2000; Mrug *et al.*, 1997).

Em 2004, Willian *et al.*, demonstraram que células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratos Lewis expressavam constitutivamente os receptores AT₁ e AT₂, bem como ECA, angiotensinogênio e renina. Também constataram que estas células produzem Ang II, sugerindo a presença de um mecanismo autócrino-parácrino para a regulação da hematopoese mediada por um sistema Renina- Angiotensina local.

Já os efeitos da estimulação com Ang (1-7) em células indiferenciadas é pouco conhecido. Recentemente, Qian *et al.* (2008) observaram que o peptídeo, em baixas doses, estimula o aumento do número de células progenitoras hematopoéticas e endoteliais *in vivo* e *in vitro*, via receptor MAS. O mesmo efeito foi observado em células progenitoras hematopoéticas humanas por Whalter *et al.* (2009), indicando que a Ang (1-7) possa ter função importante no processo de hematopoese. Entretanto, o transplante de células estimuladas com Ang (1-7) em ratos transgênicos para a fosfatase alcalina humana (R26 Fischer 344 (F344)), submetido a infarto agudo do miocárdio,

não produziu maior remodelamento cardíaco do que as células progenitoras não tratadas com o peptídeo (Qian *et al.*, 2008).

A possibilidade do isolamento de células-tronco seja da medula óssea ou de outros tecidos, bem como sua capacidade de diferenciação, nos permite antever inúmeras perspectivas terapêuticas. Neste projeto, pretendemos explorar os possíveis efeitos da Ang (1-7) e de Ang II na sinalização intracelular de células-tronco mesenquimais de ratos. Esses dados poderão abrir nova perspectiva em relação ao papel fisiológico, farmacológico e terapêutico das angiotensinas.

5 Objetivos

5.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos dos peptídeos Angiotensina II e Angiotensina (1-7) sobre a sinalização intracelular mediada por MAPK's das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos Wistar.

5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar fenotipicamente as células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratos Wistar;
- Avaliar a presença dos receptores AT₁, AT₂ e MAS em células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos Wistar;
- Avaliar o efeito dos tratamentos com Angiotensina II e Angiotensina (1-7) sobre a expressão e ativação das proteínas de sinalização intracelular ERK 1/2 e p38 MAPK.

6 Metodologia

6.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, pesando entre 250-350g, mantidos sob dieta normal e com livre acesso à água, obtidos no Centro de Bioterismo (CEBIO) do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG. Os animais foram sacrificados pelo método de deslocamento cervical após anestesiamento por Tiopentano. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA - UFMG), protocolo n°: 233/2010.

6.2 Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea

Após o sacrifício do animal, a medula óssea foi imediatamente extraída do fêmur e tíbia esquerdos e direitos, mediante a lavagem do canal medular com o meio Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DEMEM/F12, Gibco, Invitrogen Corporation), a 37°C (Figuras 2 e 3). As células-tronco mesenquimais foram selecionadas e expandidas através de cultura da fração de células mononucleares isoladas por centrifugação em gradiente de densidade (Figura 4). A centrifugação foi a 1500 rpm, por 30 minutos, em temperatura ambiente, na presença de Histopaque 1083 (Sigma-Aldrich, Inc.).



Figura 2. Ossos fêmur e tíbia extraídos de rato Wistar.



Figura 3. Lavagem do canal medular com DMEM F12 para extração da medula óssea.

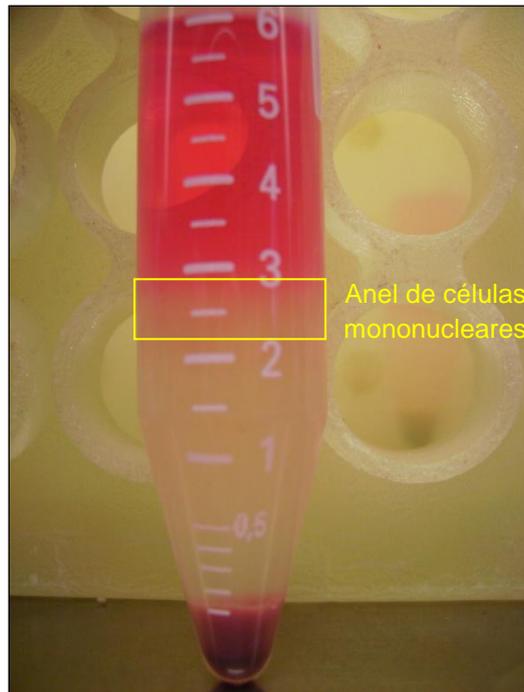


Figura 4. Anel de células-tronco mononucleares formado por centrifugação em gradiente de densidade.

As células extraídas foram então ressuspensas em meio DMEM F12, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab Mat. Cult. Cel LTDA) e 1% de solução de penicilina/estreptomicina/ anfotericina B (Cultilab Mat. Cult. Cel LTDA) e depositadas em uma garrafa de cultura celular de 25 cm² (TPP) previamente tratada com Poli-Lisyne (Sigma-Aldrich, Inc.).

Após estes procedimentos, as células foram mantidas em estufa com injeção de CO₂ 5% e temperatura de 37° C, durante três dias. Após este período, as células-tronco mesenquimais encontravam-se aderidas à garrafa de cultura e os outros tipos celulares retirados através de lavagem com Hanks'balanced salts (HBSS, Sigma Aldrich, Inc.). Foi novamente adicionado o meio DMEM F12 suplementado à cultura e este procedimento foi então repetido a cada dois dias até ser alcançada confluência igual ou superior a 90%.

6.3 Imunofenotipagem de células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos

Células cultivadas sobre lamínulas de vidro (Glasscyto) previamente tratadas com Poli-Lisyne (Sigma-Aldrich, Inc.), e com confluência igual a 80% foram fixadas com solução 4% paraformaldeído em PBS 1x e bloqueadas com soro de carneiro (5% normal goat serum, 0,3% Triton x-100 em PBS 1x), *overnight*, a 4°C.

No dia seguinte, as células foram incubadas com os anticorpos primários que compõe o Kit para caracterização de células-tronco mesenquimais de ratos Wistar (Millipore®): anti-integrin β 1, anti-colágeno I, anti-fibronectina, anti-CD45 e anti-CD14 (nas diluições indicadas pelo fabricante). Poços controles foram incubados com os anticorpos mouse IgG e rabbit IgG. A incubação com os anticorpos primários foi *overnight*, a 4°C.

No dia seguinte, no escuro, as células foram incubadas com os apropriados anticorpos secundários ALEXA 488, anti-mouse ou anti-rabbit, na diluição de 1:200, por 2 horas em temperatura ambiente. As lamínulas foram montadas em uma lâmina de vidro contendo 10 μ l de meio de montagem para fluorescência contendo DAPI (Vectashield® mountin medium with DAPI, Vector Laboratories.) para a visualização dos núcleos celulares. Então, foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Zeiss, Axio Vision).

6.4 Protocolo experimental e extração de proteínas

Para a caracterização das células-tronco mesenquimais da medula óssea de rato quanto à presença dos receptores de membrana AT₁, AT₂ e MAS, as células, previamente plaqueadas em placas de cultura de 100/20mm e com confluência maior ou igual a 90%, foram submetidas a extração de proteínas. Também se verificou a expressão das proteínas marcadoras de sinalização intracelular ERK1/2, p38 total, p38 fosforilada, em culturas estimuladas por 12 horas com os peptídeos Ang (1-7) e Ang II, nas concentrações 1×10^{-6} , 1×10^{-8} , 1×10^{-10} molar ou concomitantemente nas concentrações 1×10^{-7} e 1×10^{-8} molar, respectivamente. Para interromper o estímulo, as células foram lavadas com PBS gelado.

Para a extração de proteínas, as células foram homogeneizadas em tampão de lise (0,5% Triton X-100, 50mM Na Pyrophosphate, 50mM NaF, 5mM NaCl, 5mM Na₂ EDTA, 5mM EGTA, 10mM Hepes, 2µl/ml de leupeptina, 1,2µl/ml de aprotinina, 2µl/ml de Pepstatina A preparada em metanol, 40µl/ml de orthovanadato de sódio, 20µl/ml de PMSF preparado em Isopropanol). O material extraído foi coletado e submetido a ultrassom. A concentração das proteínas totais foi determinada em espectrofotômetro através da comparação com curva de solução de albumina (BSA), em concentrações conhecidas, coradas com Comassie Blue.

6.5 Western Blot

O volume referente a 40 µg dos extratos protéicos foram aplicados em gel de poliacrilamida/SDS 10% e fracionados em aparelho de eletroforese a 100V por 1,5 h. Após este procedimento, o gel foi submetido a nova corrida eletroforética para que as proteínas fossem transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Em seguida, as ligações não específicas foram bloqueadas com Tris-Base 1M pH 7,6 (1x) contendo 0,1% de Tween 20 (TBS-T), contendo

5% de leite em pó desnatado. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpo primários para as proteínas desejadas, AT1(Rabbit Anti-Angiotensin II Receptor Type-1, 1:1000, Alamone Lab.), AT2 (Rabbit Anti-Angiotensin II Receptor Type-2 (extracellular), diluição de 1:1000, Alamone Labs.), MAS (Mice anti-MAS, diluição de 1:500), ERK 1/2 (Mouse monoclonal [MAPK-YT] to ERK 1+ ERK 2 (phospho T183 +Y185), diluição de 1:500, Abcam Inc.), p38 total (Rabbit p38 MAP Kinase, diluição de 1:500, Cell Signaling Technology®.) e p38 fosforilada (Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (28B10) Mouse monoclonal antibody, diluição de 1:500, Cell Signaling Technology®.), suspenso em TBST 1x, over night, a 4°C. Lavou-se então as membranas com TBS-T 1x e estas foram incubadas com o anticorpo secundário (IRDye® 680 Conjugated Goat(polyclonal) Anti-Mouse IgG (H+L) e IRDye® 680 Conjugated Goat(polyclonal) Anti-Rabbit IgG (H+L), diluição 1:10.000, Li-cor Biosciences.) diluído em TBS-T 1x por 1 hora. Após nova lavagem com TBS-T 1x, as membranas foram visualizadas e quantificadas no aparelho scanner Odyssey.

6.6 Retrotranscrição e PCR

Para caracterizar as células-tronco mesenquimais quanto a presença do RNA mensageiro dos receptores MAS, culturas de células foram mantidas em garrafas de cultura até alcançarem confluência maior ou igual a 90%.

Para a extração do RNA total foi utilizado o método guanidinoisotiocianato-fenol-clorofórmio. Retirou-se o meio DMEM e lavou-se rapidamente com PBS gelado cada garrafa, acrescentando em seguida 1 mL de Trizol (Invitrogen laboratories). As amostras foram homogeneizadas com movimentos manuais vigorosos, transferidas para eppendorfs e mantidas a 4°C por 5 minutos.

Após esse procedimento, foi adicionado clorofórmio (Merck®) a cada eppendorf e estes foram levemente agitados. Após certo tempo de repouso, estes foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos. A camada superior

(fase aquosa) foi retirada e acondicionada em novo eppendorf, com subsequente adição de isopropanol. As amostras passaram por novo repouso seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos, após a qual descartou-se o sobrenadante e adicionou-se etanol 75%, gelado (solução manufaturada em água tratada com dietil-pirocarbonato - DEPC). Foi feita nova centrifugação, desta vez a 9.500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi então descartado e os eppendorfs mantidos a temperatura ambiente até a secagem das amostras. A redissolução do RNA total foi realizada acrescentando-se água tratada com DEPC.

Após os procedimentos descritos acima, as amostras de RNA foram diluídas 50X e analisadas em espectrofotômetro a 260nm (HITACHI® UV 160 A) para estimar-se sua concentração.

Para a síntese de DNA complementar (cDNA) foram utilizados volume referente a 1µg de RNA total, 0,2 µg de hexadesoxinucleotídeos, tampão para RT, 5 µl de MgCl₂ 50 mM, DTT 15 mM, dNTPs 1,8 mM e 150UI de transcriptase reversa. O cDNA foi sintetizado em termociclador durante um período de 60 minutos, a 37°C.

As reações de PCR foram feitas utilizando *primer* específico para o cDNA do gene MAS (Tabela 1) de rato, sintetizados pela empresa Integrated Technologies®.

Proteína	Sequência Sense	Sequência Anti-sense
MAS	5' ACT GTC GGG CGG TCA TCA TC 3'	5' GGT GGA GAA AAG CAA GGA GA 3'

Tabela 1 - Sequências do *primer* específico para o cDNA de receptor MAS de rato utilizado.

6.7 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média±erro padrão da média. Comparações foram realizadas utilizando teste One-Way anova, seguido do pós-teste de Newman-Keuls. O critério para significância estatística foi fixado em $p < 0.05$.

7 Resultados

7.1 Caracterização das células-tronco mesenquimais de rato.

Para confirmar a identidade das células utilizadas no presente estudo, bem como a ausência de contaminação por outros tipos celulares nas culturas, verificou-se a expressão de alguns marcadores positivos (colágeno tipo I, fibronectina e integrina $\beta 1$) e negativos (CD45 e CD14) de células-tronco de rato. Como mostrado nas figuras 5 e 6, as células utilizadas não expressam os marcadores de células tronco hematopoiéticas CD45 e CD14. Já nas figuras 7, 8 e 9, é possível observar a expressão dos marcadores fibronectina, colágeno tipo1 e integrina $\beta 1$.

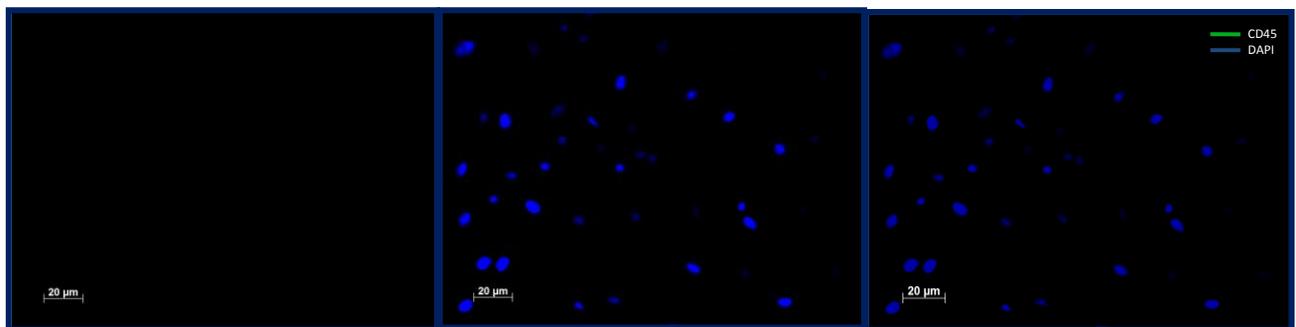


Figura 5 - Ensaio de imunocitoquímica para verificação da expressão do marcador CD45 em células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato Wistar. Aumento: 200x. Escala = 20μm. Núcleo corado com DAPI. Anticorpo para CD45 Alexa Fluor 488.

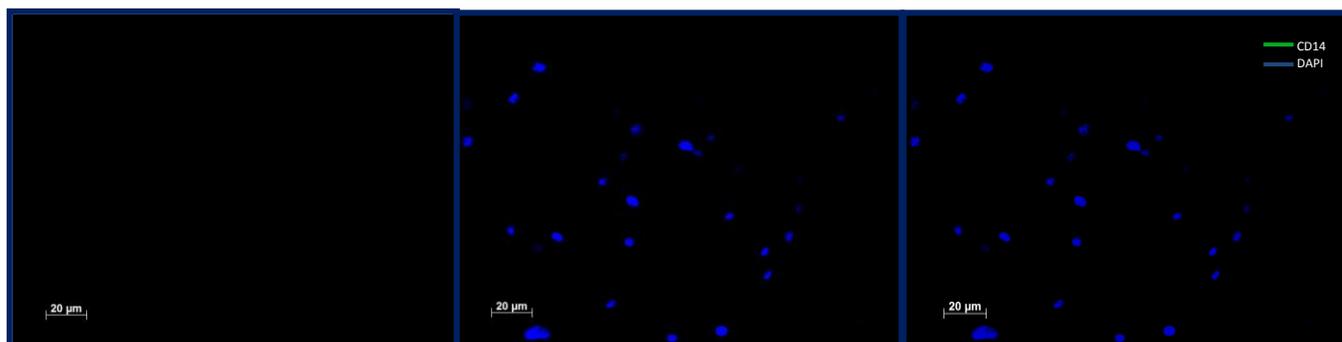


Figura 6 - Ensaio de imunocitoquímica para verificação da expressão do marcador CD14 em células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato Wistar. Aumento: 200x. Escala = 20µm. Núcleo corado com DAPI. Anticorpo para CD14 Alexa Fluor 488.

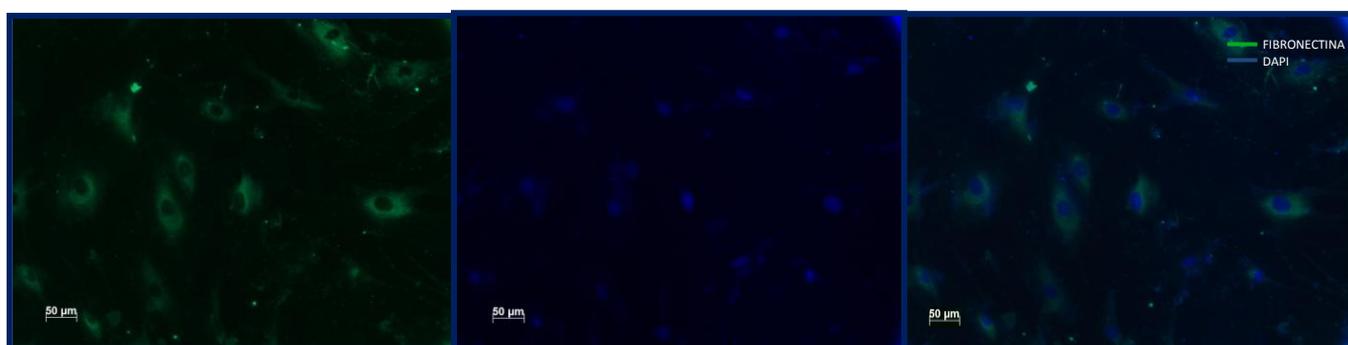


Figura 7 - Ensaio de imunocitoquímica para verificação da expressão do marcador Fibronectina em células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato Wistar. Aumento: 200x. Escala = 50µm. Núcleo corado com DAPI. Anticorpo para Fibronectina Alexa Fluor 488.

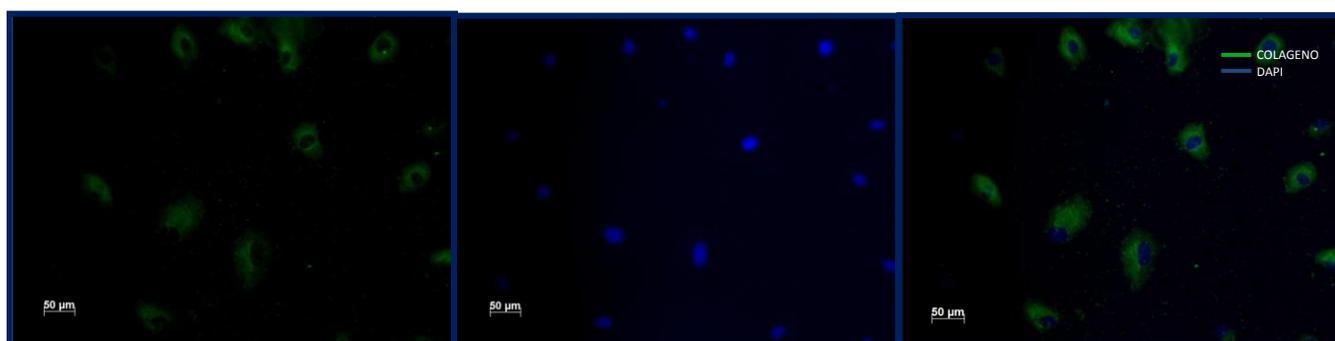


Figura 8 - Ensaio de imunocitoquímica para verificação da expressão do marcador Colágeno tipo 1 em células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato Wistar. Aumento: 200x. Escala = 50µm. Núcleo corado com DAPI. Anticorpo para Colágeno tipo 1 Alexa Fluor 488.

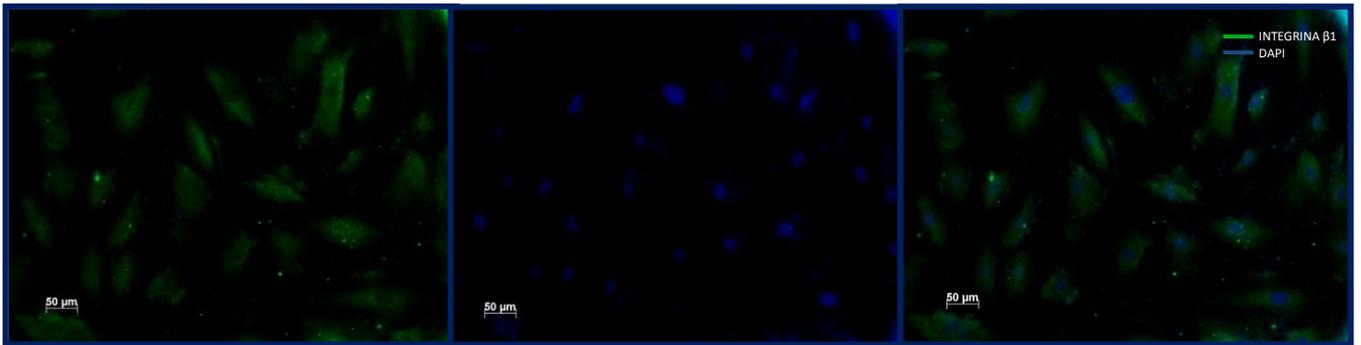


Figura 9 - Ensaio de imunocitoquímica para verificação da expressão do marcador Integrina $\beta 1$ em células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato Wistar. Aumento: 200x. Escala = 50 μ m. Núcleo corado com DAPI. Anticorpo para Integrina $\beta 1$ Alexa Fluor 488.

7.2 Caracterização das células-tronco mesenquimais quanto à presença dos receptores MAS, AT₁ e AT₂.

Para caracterizar as células-tronco mesenquimais quanto à expressão dos receptores angiotensinérgicos MAS, AT₁ e AT₂, foi utilizada a técnica de Western Blot na presença de controles positivos adequados para cada receptor (testículo ou ventrículo esquerdo), acrescido de retrotranscrição seguido por PCR para o receptor MAS. Foi constatado que as células-tronco de medula óssea de rato Wistar expressam constitutivamente os receptores MAS (Figuras 10 e 11), AT₁ (Figura 12) e AT₂ (Figura 13).

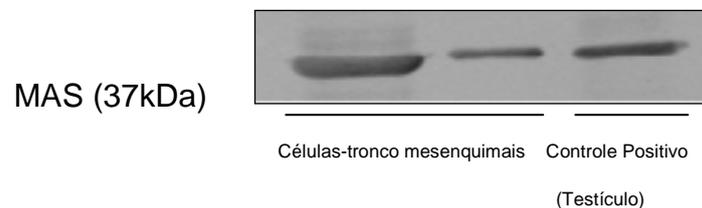


Figura 10 - Western Blotting para caracterização da expressão do receptor MAS em células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato Wistar.

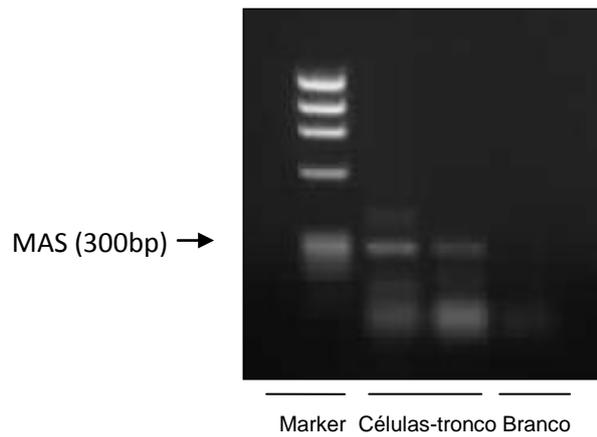


Figura 11 - PCR para caracterização da presença do mRNA do receptor MAS em células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato Wistar.

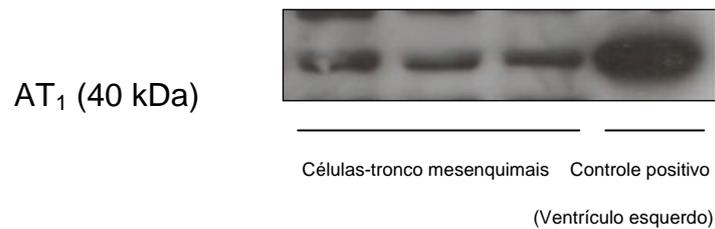


Figura 12 - Western Blotting para caracterização da expressão do receptor AT₁ em células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato Wistar.

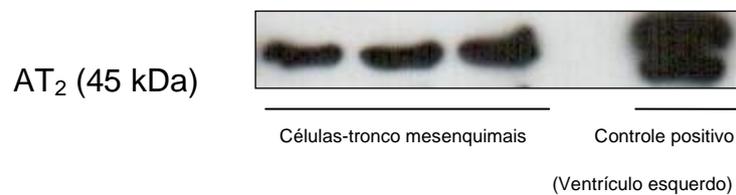


Figura 13 - Western Blotting para caracterização da expressão do receptor AT₂ em células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato Wistar.

7.3 A Ang II estimula a ativação de ERK 1/2.

Para avaliar o efeito Ang II sobre a ativação da ERK 1/2 em células-tronco mesenquimais de medula, estas foram tratadas com o peptídeo em diferentes concentrações (1×10^{-10} - 1×10^{-6} M, 12h de incubação). Como mostra a Figura 14, a presença de Ang II, na concentração 1×10^{-8} M, estimula a ativação de ERK 1/2 nas células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos Wistar.

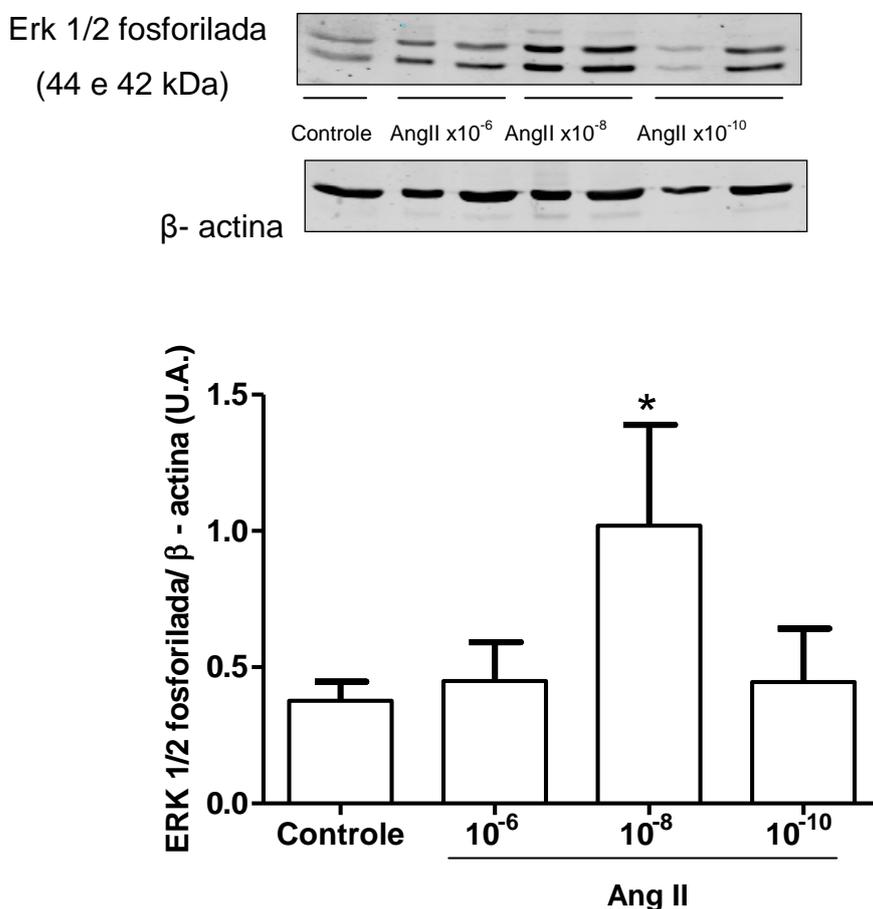


Figura 14 - Efeito da Ang II na ativação da ERK 1/2 em células-tronco mesenquimais. Exemplo de western blotting realizado no lisado de células-tronco mesenquimais de medula óssea tratadas com Ang II (1×10^{-10} - 1×10^{-6} M, 12h de incubação). A Ang II estimula a ativação da ERK1/2 na concentração de 1×10^{-8} M. O gráfico de barras representa a média \pm EPM de 3 experimentos. * P < 0.05 vs controle.

7.4 A Ang(1-7) inibe a ativação de ERK1/2 estimulada pela Ang II.

Para avaliar o efeito de Ang (1-7) sobre a ativação da ERK 1/2 estimulada pela Ang II, as células-tronco foram tratadas com Ang II (1×10^{-8} M, 12h de incubação). Em alguns experimentos, as células foram concomitantemente tratadas com Ang (1-7) (1×10^{-7} M, 12h de incubação). Como mostra a Figura 15, a presença de Ang-(1-7) reduz significativamente a ativação da ERK1/2 estimulada pela Ang II (na concentração 1×10^{-8} M) nas células-tronco mesenquimais de medula. O uso do antagonista do receptor MAS, A779, não reverte o efeito inibitório da Ang (1-7). O tratamento apenas com Ang-(1-7) não estimula a ERK 1/2, como observado na figura 16.

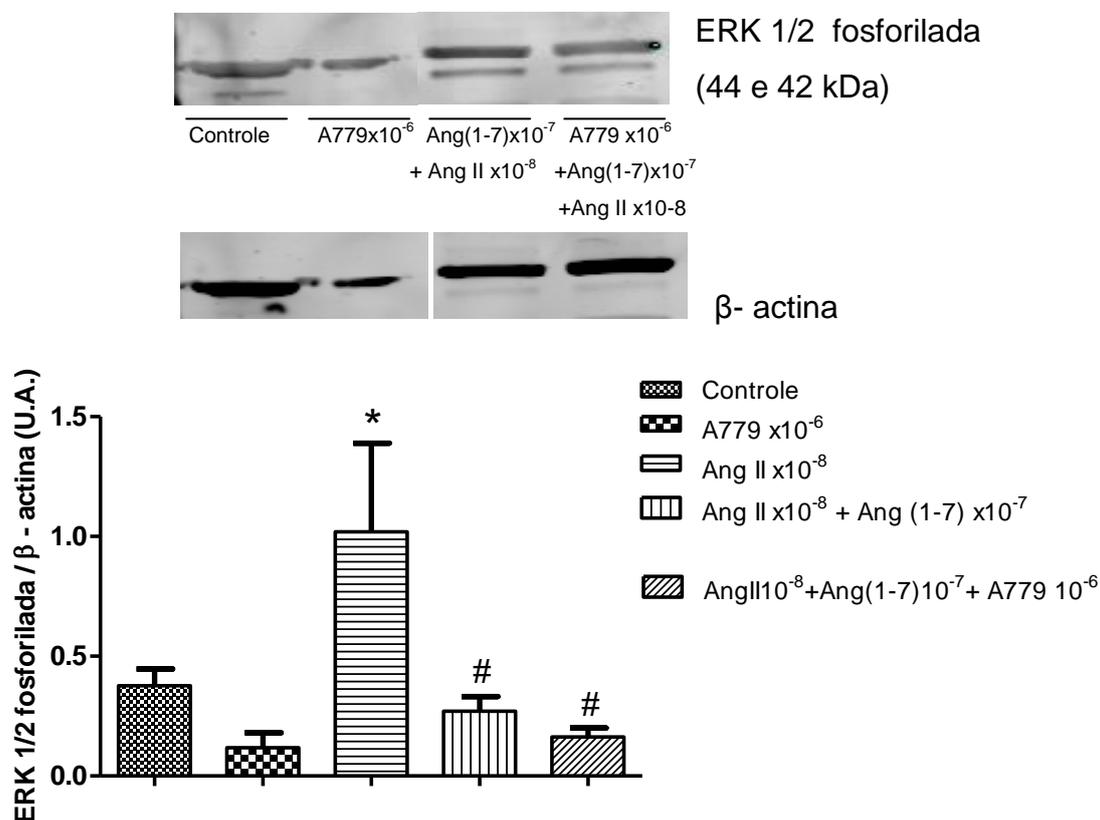


Figura 15 - Efeito da Ang (1-7) na ativação da ERK 1/2 estimulada pela Ang II em células-tronco mesenquimais. Exemplo de western blotting realizado no lisado de células-tronco mesenquimais de medula óssea incubadas ou não com Ang (1-7) (1×10^{-7} mol/L, 12h de incubação) e expostas à Ang II (1×10^{-8} mol/L, 12h de incubação). A Ang II estimula a ativação da ERK1/2, sendo esse efeito completamente revertido pela presença de Ang (1-7). O uso do antagonista da Ang (1-7), A779, não reverte este efeito inibitório. O gráfico de barras representa a média \pm EPM de 3 experimentos. * $P < 0.05$ vs controle. # $P < 0.05$ vs Ang II 1×10^{-8} .

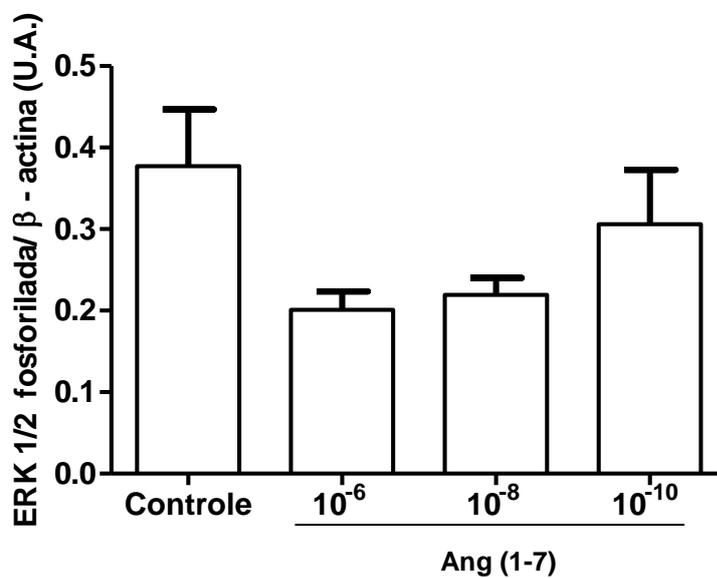
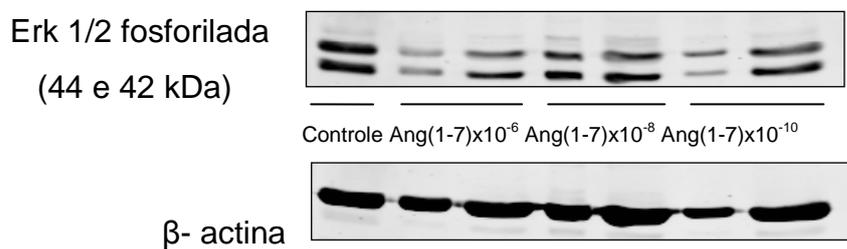


Figura 16 - Efeito da Ang (1-7) na ativação da ERK 1/2. Exemplo de western blotting realizado no lisado de células-tronco mesenquimais de medula óssea incubadas com Ang (1-7) (1×10^{-10} - 1×10^{-6} mol/L, 12h de incubação). A Ang (1-7), per si, não ativa a ERK 1/2. O gráfico de barras representa a média \pm EPM de 3 experimentos. * $P < 0.05$ vs controle.

7.5 A Ang II não altera a expressão da p38 MAPK total.

Para avaliar o efeito de Ang II sobre a expressão da enzima p38 MAPK total em células-tronco mesenquimais de medula, estas foram tratadas com o peptídeo em diferentes concentrações (1×10^{-10} - 1×10^{-6} M, 12h de incubação). Como mostra a Figura 17, a presença de Ang II não altera a expressão da p38 MAPK nas células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos Wistar.

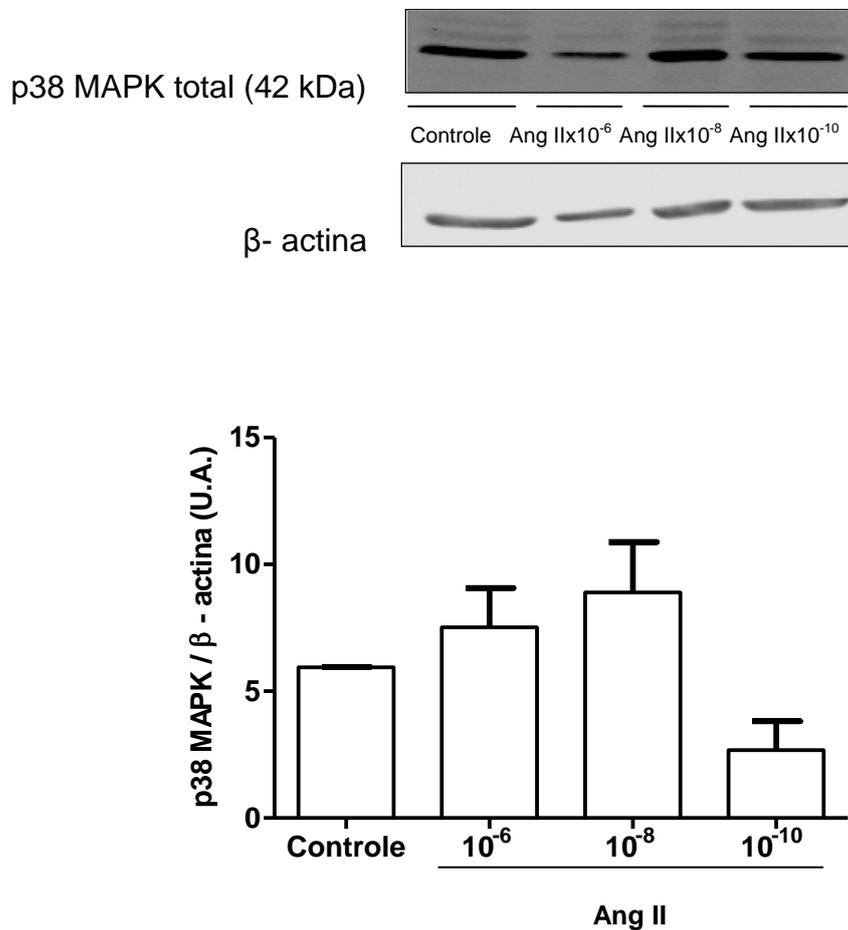


Figura 17 - Efeito da Ang II na expressão da p38 MAPK em células-tronco mesenquimais. Exemplo de western blotting realizado no lisado de células-tronco mesenquimais de medula óssea tratadas com Ang II (1×10^{-10} - 1×10^{-6} M, 12h de incubação). A Ang II não altera a expressão da p38 MAPK. O gráfico de barras representa a média ± EPM de 3 experimentos.

* P < 0.05 vs controle.

7.6 A Ang II estimula a fosforilação de p38 MAPK.

Para avaliar o efeito de Ang II sobre a fosforilação da enzima p38 MAPK em células-tronco mesenquimais de medula, estas foram tratadas com o peptídeo em diferentes concentrações (1×10^{-10} - 1×10^{-6} M, 12h de incubação). Como mostra a Figura 18, a presença de Ang II aumenta significativamente a fosforilação da p38 MAPK (na concentração 1×10^{-10}) nas células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos Wistar.

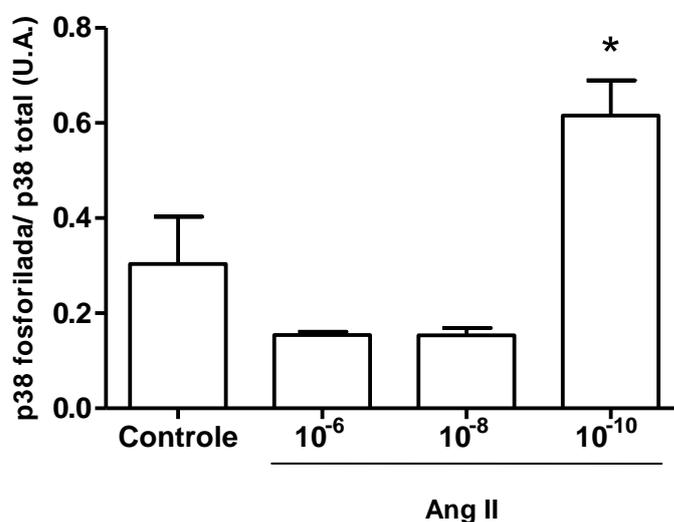
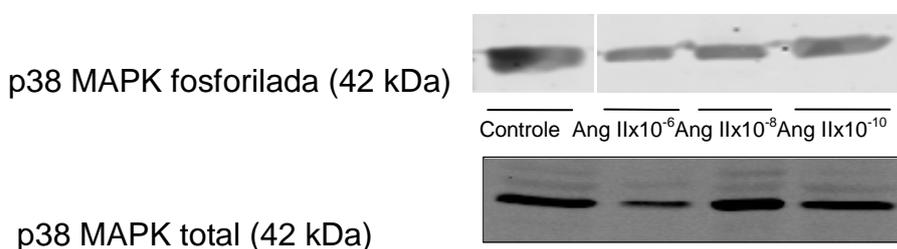


Figura 18 - Efeito da Ang II na fosforilação da p38 MAPK em células-tronco mesenquimais. Exemplo de western blotting realizado no lisado de células-tronco mesenquimais de medula óssea tratadas com Ang II (1×10^{-10} – 1×10^{-6} M, 12h de incubação). A Ang II estimula a fosforilação da p38 MAPK na concentração de 1×10^{-8} M. O gráfico de barras representa a média \pm EPM de 3 experimentos. * $P < 0.05$ vs controle.

7.7 A Ang (1-7) não altera a expressão de p38 MAPK total.

Para avaliar o efeito de Ang (1-7) sobre a expressão da enzima p38 MAPK total em células-tronco mesenquimais de medula, estas foram tratadas com o peptídeo em diferentes concentrações (1×10^{-10} - 1×10^{-6} M, 12h de incubação). Como mostra a Figura 19, a presença de Ang (1-7) não altera a expressão da p38 MAPK total nas células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos Wistar.

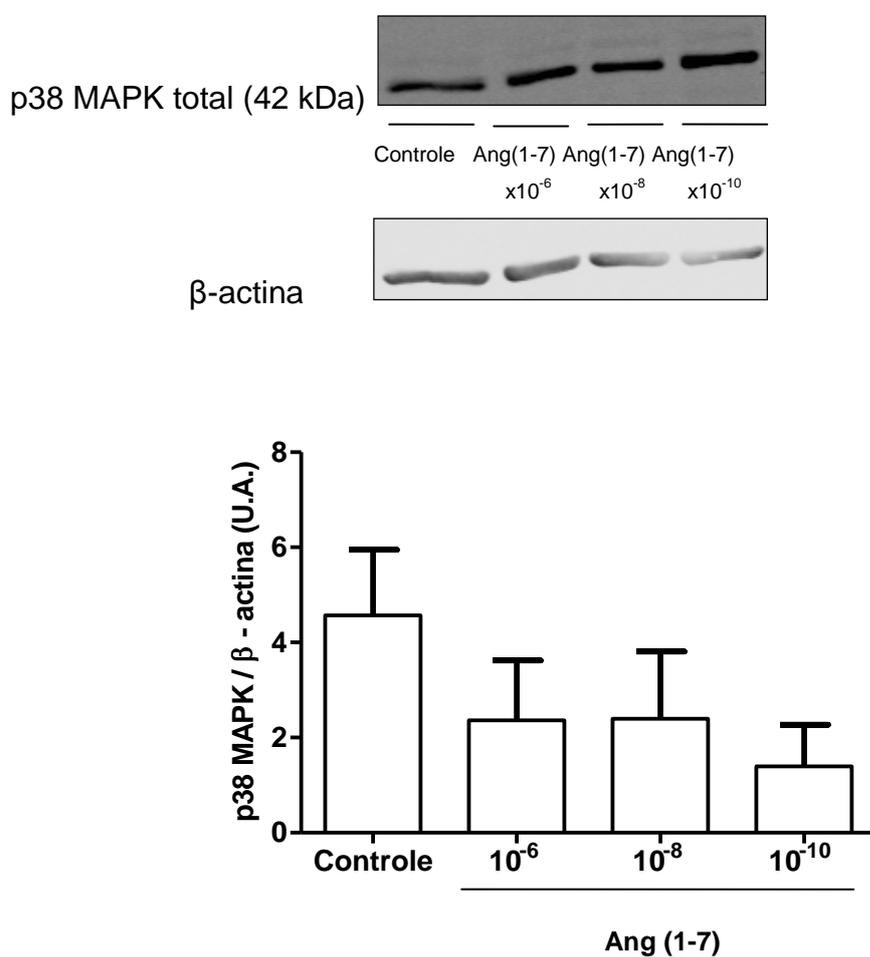


Figura 19 - Efeito da Ang (1-7) na expressão da p38 MAPK em células-tronco mesenquimais. Exemplo de western blotting realizado no lisado de células-tronco mesenquimais de medula óssea tratadas com Ang (1-7) (1×10^{-10} – 1×10^{-6} M, 12h de incubação). A Ang (1-7) não altera a expressão da p38 MAPK. O gráfico de barras representa a média ± EPM de 3 experimentos. * P< 0.05 vs controle.

7.8 A Ang (1-7) não altera a fosforilação da p38 MAPK.

Para avaliar o efeito da Ang (1-7) sobre a fosforilação da enzima p38 MAPK em células-tronco mesenquimais de medula, estas foram tratadas com o peptídeo em diferentes concentrações (1×10^{-10} - 1×10^{-6} M, 12h de incubação). Como mostra a Figura 20, a presença de Ang (1-7) não altera a fosforilação da p38 MAPK nas células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos Wistar.

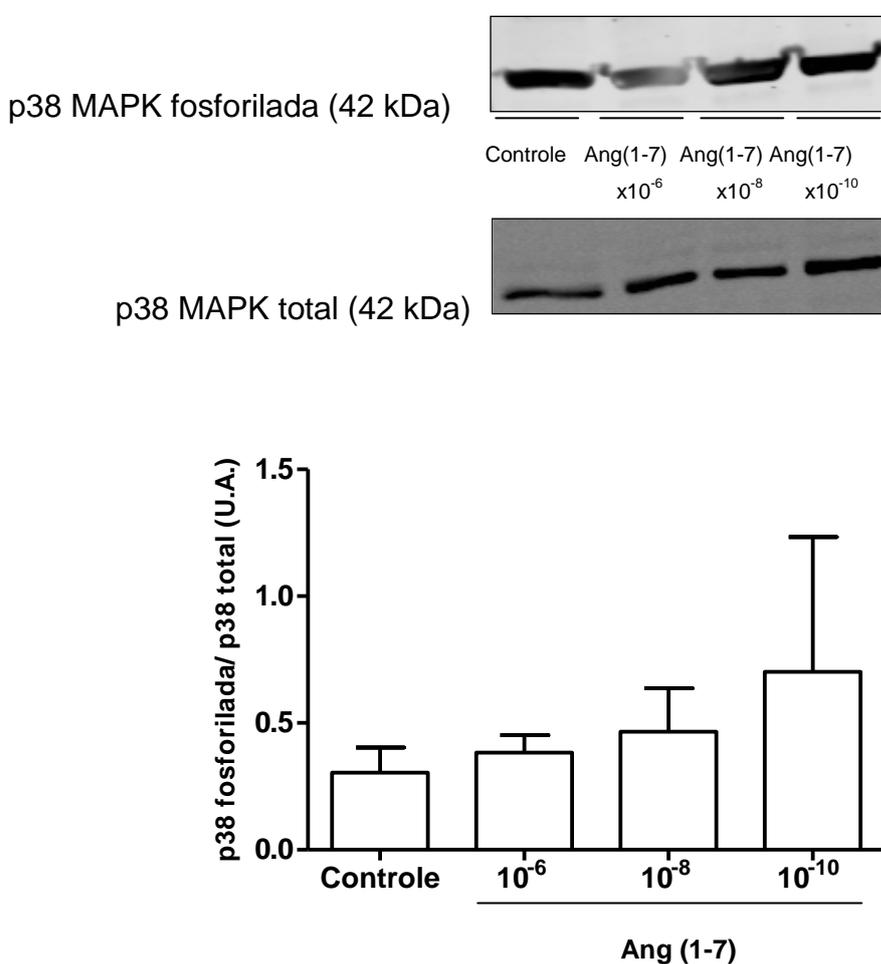


Figura 20 - Efeito da Ang (1-7) na fosforilação da p38 MAPK em células-tronco mesenquimais. Exemplo de western blotting realizado no lisado de células-tronco mesenquimais de medula óssea tratadas com Ang (1-7) (1×10^{-10} – 1×10^{-6} M, 12h de incubação). A Ang (1-7) não altera a fosforilação da p38 MAPK. O gráfico de barras representa a média \pm EPM de 3 experimentos. * $P < 0.05$ vs controle.

7.9 O tratamento concomitante com Ang (1-7) e Ang II não altera a expressão da p38 MAPK total ou a fosforilação da p38 MAPK.

Para avaliar o efeito do tratamento concomitante da Ang (1-7) e Ang II sobre a expressão da p38 MAPK total em células-tronco mesenquimais de medula, estas foram tratadas com os peptídeo nas concentrações 1×10^{-7} M e 1×10^{-8} M (12h de incubação) respectivamente. Como mostram as figuras 21 e 22, a presença dos peptídeos não altera a expressão da p38 MAPK total, assim como não altera a fosforilação da p38 MAPK nas células-tronco mesenquimais de medula, respectivamente.

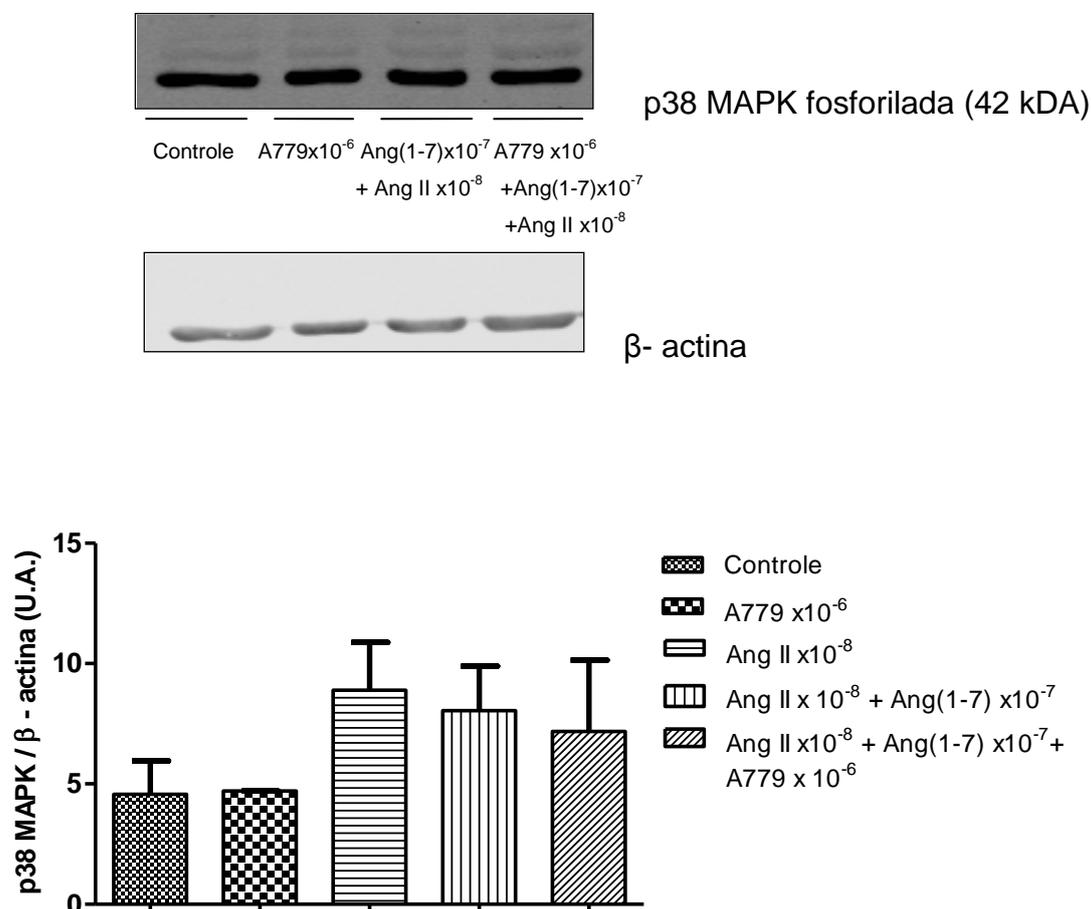


Figura 21 - Efeito do co-tratamento com Ang (1-7) e Ang II na expressão da p38 MAPK em células-tronco mesenquimais. Exemplo de western blotting realizado no lisado de células-tronco mesenquimais de medula óssea tratadas com Ang (1-7) (1×10^{-7} M) e Ang II (1×10^{-8} M), 12h de incubação. O co-tratamento não altera a expressão da p38 MAPK. O gráfico de barras demonstra a média \pm EPM de 3 experimentos. * $P < 0.05$ vs controle.

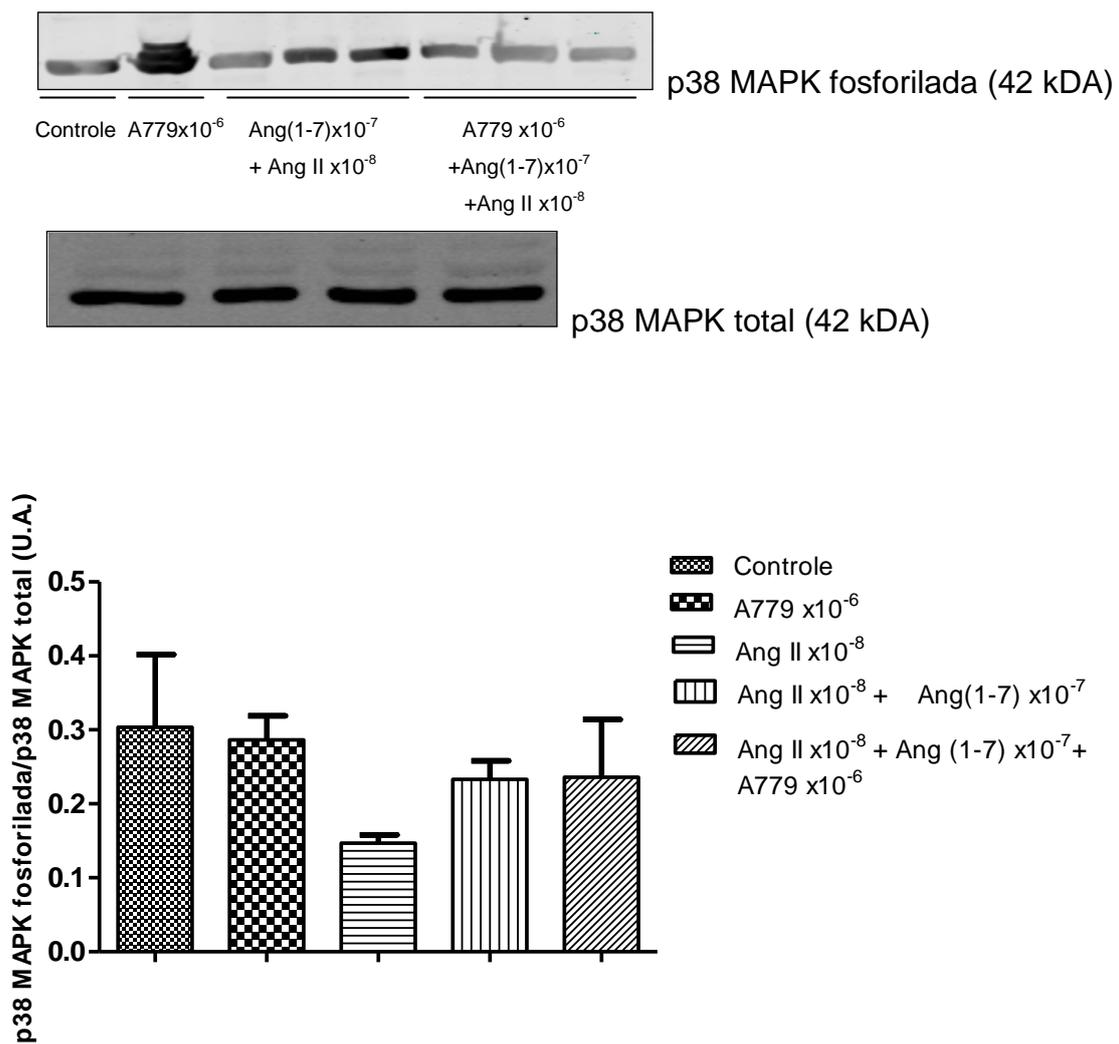


Figura 22 - Efeito do co-tratamento com Ang (1-7) e Ang II na fosforilação da p38 MAPK em células-tronco mesenquimais. Exemplo de western blotting realizado no lisado de células-tronco mesenquimais de medula óssea tratadas com Ang (1-7) (1×10^{-7} M) e Ang II (1×10^{-8} M), 12h de incubação. O co-tratamento não altera a fosforilação da p38 MAPK. O gráfico de barras demonstra a média \pm EPM de 3 experimentos. * $P < 0.05$ vs controle.

8 Discussão

Células-tronco mesenquimais são conhecidas por sua capacidade de auto-renovação e diferenciação em várias linhagens celulares. Em experimentos *in vitro*, foi demonstrada sua diferenciação em células de linhagem mesenquimal, como células tendíneas, musculares, osteócitos, condrócitos e adipócitos (Pereira *et al.*, 1995; Prockop *et al.*, 1997; Ferrari *et al.*, 1998; Pittenger *et al.*, 1999), bem como em células de outros tipos teciduais, como o hepático (Pettersen *et al.*, 1999), renal (Poulson *et al.*, 2003), cardíaco (Orlic *et al.*, 2001) e neural (Mezey *et al.*, 2000; Brazelton *et al.*, 2000).

Historicamente, as células-tronco mesenquimais de medula óssea tem sido isoladas por sua capacidade de aderência ao plástico, não presente em outros tipos celulares da medula, como as células-tronco hematopóéticas e as derivadas destas. Entretanto, células isoladas apenas por aderência de células totais da medula óssea se mostraram bastante heterogêneas, podendo conter osteoblastos, fibroblastos, adipócitos e macrófagos, entre outros tipos celulares (Alhadlaq & Mao, 2004). O uso de um gradiente de densidade para isolamento de fração de células mononucleares durante a seleção das células tronco mesenquimais diminui significativamente essa contaminação, bem como a submissão das células isoladas à um maior número de passagens (Pittenger *et al.*, 1999). Entretanto apenas a caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais pode garantir sua pureza.

Ao contrário de outros tipos celulares que expressam marcadores específicos de membrana, a identificação fenotípica das células-tronco mesenquimais é baseada na expressão concomitante de múltiplos marcadores e na não expressão de outros.

Células-tronco mesenquimais podem apresentar um grande número de marcadores de membrana, moléculas de adesão e receptores de citocinas, que incluem CD166, CD54, CD121a e b, CD123, CD 29 (Integrina β 1), CD124 e

CD49, assim como moléculas de matriz extracelular, como fibronectina e colágeno tipo 1. (Pittenger et al., 2001; Alhadlaq & Mao, 2004; Prockop, 1997).

Por outro lado, células-tronco mesenquimais não possuem os marcadores CD31 (células endoteliais), CD14 (monócitos e macrófagos), CD11a/LFA1 (linfócitos), CD45 (leucócitos), CD3, CD19, CD34, CD 38 e CD66 (outras células hematopóéticas), entre outros (Alhadlaq & Mao, 2004). A presença de qualquer um destes marcadores numa cultura de células-tronco mesenquimais indica contaminação por outro tipo celular.

No presente estudo constatou-se, por imunocitoquímica, a presença dos marcadores positivos Integrina β 1, Colágeno tipo 1 e Fibronectina, bem como a ausência dos marcadores CD45 e CD14. Desta maneira, pôde-se confirmar a identidade das culturas primárias estabelecidas e utilizadas nos demais experimentos como células-tronco mesenquimais de medula óssea.

Em 1996, Haznedaroglu *et al.*, sugeriu a hipótese da existência de um SRA atuando localmente na medula óssea, afetando o crescimento de colônias hematopoética e a produção, proliferação e diferenciação de células sob condições fisiológicas ou patológicas. Trabalhos recentes corroboram esta hipótese ao mostrar que os peptídeos Ang II e Ang (1-7) exercem um efeito regulatório na regeneração tecidual e proliferação celular em diversos modelos experimentais. Estudos *in vivo* têm demonstrado que ambos os peptídeos aumentam a recuperação hematopoética após mielosupressão e transplantes de células progenitoras (Ellefson *et al.*, 2004; Rodgers *et al.*, 2003). O aumento no número de células é particularmente significativo e duradouro na medula óssea e este efeito parece atingir múltiplas linhagens sanguíneas. Juntamente à estimulação da regeneração da medula óssea *in vivo*, a Ang II demonstrou estimular a proliferação de células progenitoras hematopoéticas em culturas isoladas da medula óssea de camundongos e cordão umbilical humano (Rodgers *et al.*, 2002; Rodgers *et al.*, 2003).

Os experimentos de caracterização das células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos Wistar, verificando expressão dos receptores do SRA,

mostram que essas células expressam constitutivamente os receptores AT₁ e AT₂, resultado similar ao descrito por Willian, *et al.* (2004), que observaram a presença destes receptores em células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratos Lewis. Nosso estudo, por outro lado, é o primeiro a demonstrar a presença do receptor MAS nas células-tronco mesenquimais, tanto por Western Blot como por PCR. A presença dos receptores angiotensinérgicos nestas células corroboram a hipótese de um SRA atuante na medula óssea.

Estudos tem demonstrado que muitas das ações da Ang II são mediadas via p38, ERK 1/2 e JNK, MAPKs da família serina/treonina que transmitem sinais advindos da membrana celular para o núcleo em resposta a fatores de crescimento e estresse celular. Desta maneira, essas vias de transdução de sinal estão envolvidas em inúmeros processos biológicos, entre eles a proliferação e diferenciação celular (Kolch, 2000).

Dados recentes na literatura apontam que a Ang-(1-7), além de produzir um efeito vasodilatador que se opõe à vasoconstrição estimulada pela Ang II, é capaz de modular diretamente as vias intracelulares estimuladas pelo peptídeo. As fosforilações das MAPKs ERK 1/2, p38 e JNK, induzidas pela Ang II, foram observadas em células do túbulo proximal de ratos Sprague–Dawley, por Su, *et al* (2006). Este efeito foi completamente inibido após o pré-tratamento das células com Ang (1-7) e esta inibição foi revertida na presença do antagonista do receptor MAS, A779.

Em células de músculo liso vascular, o tratamento com Ang II induziu a ativação da ERK 1/2 enquanto estimulava a proliferação e migração celular via receptor AT₁ (Zhang, *et al.*, 2010). Na presença da Ang (1-7) estes efeitos foram suprimidos, sugerindo que o efeito inibitório da Ang (1-7) na migração e proliferação induzidas pela Ang II estão, parcialmente, ligadas à modulação negativa da atividade da ERK1/2 induzida pela Ang II.

No presente estudo, foi observado que, em células-tronco de medula óssea, a Ang II estimula a fosforilação de p38 MAPK, assim como a ativação de ERK 1/2. O tratamento com Ang (1-7) não produziu efeito sobre a expressão

destas MAPKs. Entretanto, a incubação com Ang (1-7) inibiu a ativação da ERK1/2 induzida pela Ang II. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos citados acima e sugerem que o balanço Ang II / Ang (1-7) pode estar implicado na expressão/ativação dessas quinases, também em células-tronco mesenquimais.

No entanto, ao contrário do encontrado na literatura, o tratamento com o antagonista do receptor MAS, A779, não reverteu o efeito inibitório da Ang (1-7) sobre a fosforilação da ERK 1/2 induzida pela Ang II. Pelo menos duas hipóteses poderiam ser consideradas para explicar esse achado: 1) O A779 poderia sofrer degradação num período de tempo menor que a Ang (1-7); desta maneira o bloqueio do receptor MAS não seria efetivo durante as 12 horas de tratamento, permitindo que a Ang(1-7) continuasse a modular os efeitos da Ang II. 2) Outra hipótese envolve a ação da Ang (1-7) através da ligação a um receptor diferente do MAS, por exemplo AT₂. Essa hipótese merece ser testada no futuro, considerando que alguns efeitos da Ang (1-7) podem ser bloqueados pelo antagonista do receptor AT₂, PD123319 (Santos *et al.*, 2000). Além disso, na última década foram identificados receptores que possuem 30% à 41% de homologia com o receptor MAS. Esses receptores, órfãos em sua maioria, foram reunidos na família dos genes relacionados ao MAS (Mrg-receptor family). Gembardt *et al.* (2008) observaram que, ainda que menos pronunciado do que via receptor MAS, dois de seis receptores Mrg estudados iniciaram significativa liberação de ácido aracdônico após estimulação com Ang (1-7). Este resultado abre a possibilidade de que o peptídeo possa exercer seus efeitos também através de receptores pertencentes a esta família e que podem não ser bloqueados por A779.

Em resumo, neste estudo mostramos pela primeira vez que células-tronco mesenquimais da medula óssea expressam o receptor MAS. Os dados obtidos em nosso estudo também demonstram que a Ang II estimula a fosforilação da p38 MAPK e a ativação da ERK1/2 em células-tronco mesenquimais de medula óssea, sendo este último efeito inibido pela Ang(1-7). Este fato reforça o conceito de que o peptídeo Ang (1-7) está envolvido nos

mecanismos de modulação das ações da Ang II, agora também abrindo uma perspectiva no âmbito das células-tronco.

9 Conclusões

- Células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos Wistar expressam constitutivamente os receptores angiotensinérgicos MAS, AT1 e AT2.
- A Ang II estimula a ativação da MAPK ERK 1/2 e a fosforilação da p38 MAPK em células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos Wistar.
- A Ang (1-7) inibe a ativação da MAPK ERK1/2 induzida pela Ang II.
- A Ang (1-7) não tem efeito sobre a ativação da MAPK ERK 1/2 ou da p38 MAPK.
- O antagonista da Ang (1-7), A779, não bloqueou a modulação negativa da Ang (1-7) à ativação da MAPK ERK 1/2 induzida pela Ang II, sugerindo que o receptor MAS ou não foi efetivamente bloqueado ou que os efeitos observados ocorreram via outro receptor que não o MAS.

10 Referências Bibliográficas

Abdalla, S.; Lothar, H.; Quitterer, U. *AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration.* Nature, **407**(6800): 94-98, 2000.

Alexander, R.W.; Brock, T.A.; Gimbrone-JR, M.A.; Rittenhouse, S.E. *Angiotensin increases inositol trisphosphate and calcium in vascular smooth muscle.* Hypertension, **7**: 447-451, 1985.

Alhadlaq, A.; Mao, J. J. *Mesenchymal stem cells: Isolation and therapeutics.* Stem Cells and Development, **13**:436-448 , 2004.

Atlas, S.A. *The renin-angiotensin aldosterone system: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition.* J. Managed Care Pharmacy, **13**(8): 9-20, 2007.

Bahlmann, F. H.; Groot, K., Mueller, O.; Hertel, B.; Haller,H.; Fliser, D. *Stimulation of Endothelial Progenitor Cells: A new putative therapeutic effect of Angiotensin II receptor antagonists.* Hypertension, **45**: 526-529, 2005.

Bao, W.; Behm, D.J.; Nerurkar, S.S.; Ao, Z.; Bentley, R.; Mirabile, R.C.; Johns, D.G.; Woods, T.N.; Doe, C.P.; Coatney, R.W.; Ohlstein, J.F.; Douglas, S.A.; Willette, R.N., Yue, T.L. *Effects of p38 MAPK Inhibitor on angiotensin II-dependent hypertension, organ damage, and superoxide anion production.* J. Cardiovasc. Pharmacol., **49**(6):362-8, 2007.

Batenburg, W.W.; Garrelds, I.M.; Bernasconi. C.C.; Juillerat-Jeanneret, L.; van Kats, J.P., Saxena; P.R.; Danser, A.H. *Angiotensin II type 2 receptor- mediated vasodilation in human coronary microarteries.* Circulation, **109**: 2296-2301, 2004.

Beltrán, A.E; Briones, A.M.; Garcia-Redondo, A.B.; Rodriguez, C.; Miguel, M.; Alvarez, Y.; Alonso.M.J, Martinez- Gonzales, J.; Salaices, M. *p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats.* J. Hypertens., **27**(1):142-54, 2009.

Berry, C.; Touyz, R.; Dominiczak, A.F.; Webb, R.C.; Johns, D.G. *Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., **281**:H2337- 2365, 2001.

Brazelton, T.R.; Rossi, F.M.; Keshet, G.I.; Blau, H.M. *From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice*. Science, **290**:1775-1779, 2000.

Braun-Menendez, E. & Page, I.H. *Suggested revision of the nomenclature*. Science, **127**: 242, 1958.

Braun-Menendez, E.; Fasciolo, J.C.; Leloir, L.F.; Muñoz, J.M. *The substance causing renal hypertension*. J. Physiol., **98**:283, 1940.

Carey, R.M.; Siragy, H.M. *Newly recognized components of the rennin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation*. Endocrine Reviews, **24**(3): 261-267, 2003.

Chen S.; Patel, J.M.; Block, E.R. *Angiotensin IV -mediated pulmonary artery vasorelaxation due to endothelial intracellular calcium release*. J. Physiol. Lung Cell.Mol.Physiol., **279**(5):L849-56, 2000.

Clerk, A.; Sudgen, P.H. *Inflame my heart (by p38-MAPK)*. Circ.Res., **99**(5):455-8, 2006.

Dahlla, N.S.; Xu, Y-J.; Sheu S.S.; Tappia, P.S.; Panagia, V. *Phosphatidic acid: a potential signal transducer for cardiac hypertrophy*. J. Mol. Cell. Cardiol., **29**: 2865-2871, 1997.

De Gasparo, M.; Catt, K.J.; Inagami, T.; Wright, J.W.; Unger, T. *International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors*. Pharmacol. Rev. **52**(3):415-72, 2000.

Donoghue, M.; Hsieh, F.; Baronas, E.; Godbout, K.; Gosselin, M.; Stagliano, N.; Donovan, M.; Woolf, B.; Robison, K.; Jeyaseelan, R.; Breitbart, R.E.; Acton, S. *A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9*. Circ. Res., **87**(5): E1-9, 2000.

Ellefson, D.D.; diZerega, G.S.; Espinoza, T.; Roda, N.; Maldonado, S.; Rodgers, K.E. *Synergistic effects of co-administration of angiotensin 1-7 and Neupogen on hematopoietic recovery in mice*. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **53**:15-24, 2004.

Ferrari, G.; Angelis, G.C.; Coletta, M.; Paolucci, E.; Stornaiuolo, A.; Cossu, G.; Mavilio, F. *Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors*. *Science*, **279**: 1528-1530, 1998.

Ferrario, C. M., Jessup, J.; Chappell, M.C.; Averill, D.B.; Brosnihan, K.B.; Tallant, E.A.; Diz, D.I.; Gallagher, P.E. *Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and Angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2*. *Circulation*, **111**: 2605-2610, 2005.

Ferrario, C.M.; Chappell, M.C.; Tallant, E.A.; Brosnihan, K.B.; Diz, D.I. *Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7)*. *Hypertension*, **27**: 523 – 528, 1997.

Fleming, I.; Kohlstedt, K.; Busse, R. *The tissue renin-angiotensin system and intracellular signaling*. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertension*, **15**: 8–13, 2006.

Friendstein, A.J.P-S.I.; Petrakova, K.V. *Osteogenesis in transplants of bone marrow cells*. *J. of Embryol. Experiment. Morphol.*, **16**: 381-390, 1966.

Gallinat, S.; Busche, S.; Raizada, M.K.; Sumners, C. *The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations*. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **278**: E 357-E374, 2000.

Garrington, T.P.; Johnson, G.L. *Organization and regulation of mitogenactivated protein kinase signaling pathways*. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**:211 – 218, 1999.

Gembard, F.; Grajewski, S.; Vahl, M.; Schultheiss, H.P.; Walther, T. *Angiotensin metabolites can stimulate receptors of the Mas-related genes family*. *Mol. Cell Biochem.*, **319**:115–123, 2008.

Goldblatt, H.; Linch, J.; Hanzal, R.F.; Summerville, W.W. *Studies on experimental hypertension: I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia.* J. Exp. Med., **59**: 347, 1934.

Gussoni, E.; Soneoka, Y.; Strickland, C.D.; Buzney, E. A.; Khan, M.K.; Flint, A.F.; Kunkel, L.M.; Mulligan, R.C. *Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation.* Nature, **401**: 390-394, 1999.

Hazdenaroglu, C.; Tuncer, S.; Gursoy, M. *A local renin-angiotensin system in the bone marrow.* Med. Hypotheses, **46**, 507-510, 1996.

Hein, L. *Genetic deletion and overexpression of angiotensin II receptors.* J. Molecular Med., **76**(11): 756-763, 1998.

Huse, M.; Kuriyan, J. *The conformational plasticity of protein kinases.* Cell, **109**(3):275-82, 2002.

Imanishi, T.; Hano, T.; Nishio, I. *Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced proliferation and network formation of endothelial progenitor cells.* Hypertension Research, **27**: 101–108, 2004.

Keidar, S.; Kaplan, M.; Gamiliel-Lazarovich, A. *ACE2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin (1–7).* Cardiovascular Research, **73**(3): 463–469, 2007.

Keshet, Y.; Seger, R. *The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions.* Methods Mol. Biol., **661**: 3-38, 2010.

Kolch, W. *Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactors.* Biochem. J., **352** (2): 289-305, 2000.

Lambert, D.W.; Hooper, N.M.; Turner, A.J. *Angiotensin-converting enzyme 2 and new insights into the renin–angiotensin system.* Biochem. Pharmacol., Feb 15; **75**(4):781-786, 2008.

Lentz, K.E.; Skeggs, L.T.Jr.; Woods, K.R.; Kahn, J.R.; Shumway, N.P. *The amino acid composition of hypertensin II and its biochemical relationship to hypertensin I.* J. Exp. Med., **104**(2): 183-191, 1956.

Martin, G.R. *Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis.* Science, **209**: 768-776, 1980.

Mezey, E.; Chandross, K.J.; Harta, G.; Maki, R.A.; Mc-Kercher, S.R. *Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow.* Science, **290**:1779-1782, 2000.

Molkentin, J.D. *Calcineurin–NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs.* Cardiovascular Research, **63**: 467– 475, 2004.

Mrug, M.; Stopka, T.; Julian, B.A.; Prchal, J.F.; Prchal, J.T. *Angiotensin II Stimulates Proliferation of Normal Early Erythroid Progenitors.* J. Clin. Invest., **100** : 2310-2314, 1997.

Orlic, D.; Kajstura, J.; Chimenti, S.; Jakoniuk, I.; Anderson, S.M.; Li, B.; Pickel, J.; McKay, R.; Nadal-Ginard, B.; Bodine, D.M.; Leri, A.; Anversa, P. *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium.* Nature, **410**:701-705, 2001.

Page, I.; Helmer. O.M. *A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from reaction between rennin activation.* J. Exp. Med., **71**: 29, 1940.

Pearson, G.; Robinson, F.; Beers Gibson, T.; Xu, B.E.; Karandikar, M.; Berman, K.; Cobb, M.H. *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions.* Endocr. Rev., **22**(2):153-83, 2001.

Pereira, R.F.; Halford, K.W.; O'Harat, M.D.; Leepert, D.B.; Sokolov, B.P., Pollardt, M.D; Bagasrat, O.; Prockop, D.J. *Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**: 4857-4861, 1995.

Petersen, B.E.; Bowen, W.C.; Patrene, K.D; Mars, W.M.; Sullivan, A.K.; Murase, N.; Boggs, S.S; Greenberger, J.S.; Goff, J.P. *Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells.* Science, **284**:1168-1170, 1999.

Pittenger, M.F.; Mackay, A.M.; Beck, S.C.; Jaiswal, R.K., Douglas, R. Joseph D. Mosca, Moorman, M.A.; Simonetti, D.W; Craig, S.; Marshak, D.R. *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, **284**: 143-147, 1999.

Poulsom, R.; Alison, M.R; Cook, T.; Jeffery,R.; Ryan, E.; Forbes, S.J.; Hunt, T.; Wyles, S.; Wright, N.A. *Bone marrow stem cells contribute to healing of the kidney*. J. Am. Soc. Nephrol., **14**: 48S-54S, 2003.

Prockop, D.J. *Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues*. Science, **276**: 71, 1997.

Qian, C.; Roks, A.; Wang, Y.; Eckert, K.; Uharek, L.; Westermann, D.; Schumacher, S.M.; Schoemaker, R.; Wulf-Goldenberg, A.; Gilst, W.H.; Fichtner, I.; Tschöpe, C.; Rodgers, K.; Schultheiss, H.P.; Walther, T. *Angiotensin (1-7) stimulates bone marrow-derived progenitor cells in vitro and in vivo*. The effect of angiotensin (1-7) on bone marrow stem cells: Adjunctive pharmacological therapy for cell transplantation in heart failure, **2**: 19-38, 2008.

Qian, C.; Roks, A.J.M; Schoemaker, R.G.; Yu, L.; Beusekom, H.M.M.; Giessen, W.J.; Yu, B.; Gilst, W.H. *Transplantation of angiotensin (1-7) stimulated bone marrow-derived progenitors does not additionally improve cardiac function*. The effect of angiotensin (1-7) on bone marrow stem cells: Adjunctive pharmacological therapy for cell transplantation in heart failure, **4**: 57-78, 2008.

Raff, M. *Adult stem cell plasticity: Fact or Artifact?* Annu. Rev. Cell.Dev. Biol,**19**:1-22, 2003.

Rodgers, K.E.; Xiong, S.; diZerega, G.S. *Accelerated recovery from irradiation injury by angiotensin peptides*. Cancer Chemother Pharmacol, **49**:403-11, 2002.

Rodgers, K.E.; Xiong, S.; diZerega, G.S. *Effect of angiotensin II and angiotensin (1-7) on hematopoietic recovery after intravenous chemotherapy*. Cancer Chemother. Pharmacol., **51**:97-106, 2003.

Rodgers, K. E.; Xiong, S., Steer, R., Dizerega, G.S. *Effect of Angiotensin II on hematopoietic progenitor cell proliferation*. Stem Cells, **18**: 287-294, 2000.

Sampaio, W.O.; Souza dos Santos, R.A.; Faria-Silva, R.; da Mata Machado, L.T.; Schiffrin, E.L.; Touyz, R.M. *Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways*. Hypertension, **49**: 185-192, 2007.

Santos, R.A.S.; Ferreira, J.A. *Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system*. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. **16**: 122-128, 2007.

Santos, R.A.; Campagnole-Santos, M.J.; Andrade, S.P. *Angiotensin(1-7): an update*. Regulatory peptides, **91**: 45-62, 2000.

Santos, R.A.; Ferreira, A.J.; Pinheiro, S.V.; Sampaio, W.O. Touyz, R.; Campagnole-Santos, M.J. *Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs*. Expert Opin Investig Drugs, **14**(8): 1019-1031, 2005.

Santos, R.A.; Frezard, F.; Ferreira, A.J. *Angiotensin-(1-7): Blood, Heart, and Blood Vessels*. Cardiovascular e Hematological Agents, **3**: 173-179, 2005.

Santos, R.A.; Simoes e Silva, A.C.; Maric, C.; Silva, D.M.; Machado, R.P.; de Buhr, I.; Heringer-Walther, S.; Pinheiro, S.V.; Lopes, M.T.; Bader, M.; Mendes, E.P.; Lemos, V.S.; Campagnole-Santos, M.J.; Schultheiss, H.P.; Speth, R.; Walther, T. *Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **100**(14): 8258-8263, 2003.

Santos, R.A.S.; Silva, A.N.C. *Controle humoral da pressão arterial*. Hiperativo, **2**(3): 14-22, 1995.

Schieven, G.L. *The biology of p38 kinase: a central role in inflammation*. Curr. Top. Med. Chem., **5**(10):921-8, 2005.

Shi, R.Z.; Wang, J.C.; Huang, S.H.; Wang, X.J.; Li, Q.P. *Angiotensin II induces vascular endothelial growth factor synthesis in mesenchymal stem cells*. Exp. Cell. Res., **315**(1):10-15, 2009.

Shatanawi, A; Romero, M.J.; Chandra, S.; Yao, L.; Flores Toque, H.; Iddings, J.A.; Caldwell, R.B.; Caldwell, R.W. *p38 MAPK inhibition prevents angiotensin II-induced elevation of arginase (ARG) activity and impaired vasorelaxation.* J. Sex. Med., **7**:3857-3867, 2010.

Skeggs, L.T.; Kahn, J.R.; Shumway, N.P. *Preparation and function of the hypertensin converting-enzyme.* J. Exp. Med. **103**: 295, 1956.

Skeggs, L.T.J.R.; Marsh, W.H.; Kahn, J.R.; Shumway, N.P. *The existence of two forms of hypertensin.* Journal of Experimental Medicine, **99**(3): 275-282, 1954.

Smith, A.G. *Embryo-derived stem cells: of mice and men.* Annu. Rev. Cell. Dev. Biol., **17**: 435-462, 2001.

Su, Z.; Zimpelmann, J.; Burns, K.D. *Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-stimulated phosphorylation of MAP kinases in proximal tubular cells.* Kidney Int., **69**(12):2212-8, 2006.

Tallant, E.A.; Lu, X; Weiss, R.B.; Chappell, M.C.; Ferrario, C.M. *Bovine aortic endothelial cells contain an angiotensin-(1-7) receptor.* Hypertension, **29**(Part 2):388-393, 1997.

Tigerstedt, R.; Bergman, P.G. *Niere und Krieslauf.* Scand. Arch. Physiol., **8**: 223, 1898.

Tipnis, S.R.; Hooper, N.M.; Hyde, R.; Karran, E.; Christie, G.; Turner, A.J; *A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase.* J. Biol. Chem., **275**(43): 33238-33243, 2000.

Toma, C.; Pittenger, M.F.; Cahill, K.S.; Byrne, B.J.; Kessler, P.D. *Human mesenchymal stem cell differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart.* Circulation, **105**: 93-98, 2002.

Touyz, R.M.; Schiffrin, E.L. *Ang II-stimulated generation of reactive oxygen species in human vascular smooth muscle cells is mediated via PLD-dependent pathways*. *Hypertension*, **34**(2): 976-982, 1999.

Touyz, R.M.; Schiffrin, E.L. *Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells*. *Pharmacol. Rev.* **52**(4):639-72, 2000.

Ushio-Fukai, M.; Alexander, R.W.; Akers, M. & Grielding, K.K. *p38 Mitogenic-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by Angiotensin II. Role in vascular muscle cell hypertrophy*. *J. Biol. Chem.* **270**: 15022-15029, 1998.

Vickers, C.; Hales, P.; Kaushik, V.; Dick, L.; Gavin, J.; Tang, J.; Godbout, K.; Parsons, T.; Baronas, E.; Hsieh, F.; Acton, S.; Patane, M.; Nichols, A.; Tummino, P. *Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase*. *J. Biol. Chem.*, **277**(17): 14838-14843, 2002.

Heringer-Walther, S.; Eckert, K.; Schumacher, S.M.; Uharek, L.; Wulf-Goldenberg, A.; Gembardt, F.; Fichtner, I.; Schultheiss, H.P.; Rodgers, K.; Walther, T. *Angiotensin-(1-7) stimulates hematopoietic progenitor cells in vitro and in vivo*. *Haematologica*, **94**(6):857-860, 2009.

Wang, Y.; Wang, M.; Zhang, P.; Song, J.; Li, Y.; Hou, S; Huang, C. *Effect of transplanted mesenchymal stem cells from rats of different ages on the improvement of heart function after acute myocardial infarction*. *Chin. Med. J.*, **121**(22): 2290-2298, 2008.

William B. William, Renee S. Richmond, E. Ann Tallant, Patricia E. Gallagher, Carlos M. Ferrario. *Renin-angiotensin system expression in rat bone marrow haematopoietic and stromal cells*. *British Journal of Haematology*, **126**: 120-126, 2004.

Wollert, K.C.; Drexler, H. *Clinical applications of stem cells for the heart*. *Circulation Research*, **96**: 151-163, 2005.

Zhang F.; Hu, Y.; Xu, Q.; Ye, S. *Different effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) on vascular smooth muscle cell proliferation and migration*. *PLoS One.*, **5**(8): E12323, 2010.

Zhong, J.C.; Vapaatalo, H.; Mervaala, E. *Angiotensin II and vascular inflammation*. *Med. Sci. Monit* **11**(6): 194-205, 2005.

Zhu, Z.; Zhong, J.; Zhu, S.; Liu, D.; Van Der Giet, M.; Tepel, M. *Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-induced signal transduction*. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **40**(5):693-700, 2002.